

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES, DA PREVALÊNCIA DE  
GENES DE ENTEROTOXINAS E DO PERFIL DE RESISTÊNCIA A  
ANTIBIÓTICOS DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVOS  
ISOLADOS DE CARNE DE FRANGO RESFRIADA E CONGELADA**

PAULA DALCIN MARTINS  
Bacharel em Biomedicina

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil  
Setembro de 2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES, DA PREVALÊNCIA DE  
GENES DE ENTEROTOXINAS E DO PERFIL DE RESISTÊNCIA A  
ANTIBIÓTICOS DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVOS  
ISOLADOS DE CARNE DE FRANGO RESFRIADA E CONGELADA**

PAULA DALCIN MARTINS  
Bacharel em Biomedicina

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia Agrícola e do Ambiente  
como um dos requisitos para a  
obtenção do Grau de Mestre em  
Microbiologia do Ambiente.

Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil  
Setembro de 2012

## AGRADECIMENTOS

Agradeço:

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse realizado. Em especial, agradeço a meus pais, Dorotea Therezinha Dalcin Martins e Auri Martins, e à minha irmã, Patrícia Dalcin Martins, pelo amor, apoio incondicional e pelo forte incentivo à educação que recebi desde criança. Vocês formaram minha base emocional e meus valores e lutaram para que tivéssemos educação de qualidade nos tempos mais difíceis. Portanto, antes de tudo, dedico esta vitória a vocês, minha família.

À minha família querida, Vó Natália, Vô Orlando, Tio Darci, Tia Mita, Bruna, João Roque, Rodolfo, Tio Sady, Tia Ivete, Gabi, Lucas, Camila, Nono, Nona, Tia Ni, Tia Sônia, Tia Marlene, Tio Aldo, Ariel, Antonielli, Annielli, Vó Rosa, Vô Costante, Tia Isa, Tio Alemão, Camila e Letícia: a vocês todos, meu muito obrigada de todo o meu coração por todo apoio e pela constatare torcida pelo meu sucesso.

Ao meu namorado Francielo Gustavo Krahn Hanke, que acompanhou este trabalho do início ao fim, me ouvindo com grande interesse após as jornadas de laboratório, me incentivando quando eu estava cansada e tornando o meu dia-a-dia muito mais leve com seu carinho e bom humor. A você que acompanhou este trabalho tão de perto, o meu muito obrigada por me segurar no colo quando alguma coisa não dava certo e por comemorar comigo a cada etapa deste trabalho realizada.

Às minhas amigas Camila Rosat Consiglio e Tássia Machado Medeiros pela amizade, pelo apoio, pelas risadas, pelos desabaços. Vocês foram partes fundamentais desse trabalho e da minha vida.

À professora Ana Paula Guedes Frazzon, por toda atenção, apoio e paciência, e pelos quase 5 anos de orientação acadêmica nos quais dei início prático ao meu sonho de ser microbiologista. Foi você quem possibilitou todo conhecimento prático que adquiri no Laboratório 164 e a realização deste trabalho no período de tempo em que foi realizado.

À professora Sueli Teresinha Van der Sand, que foi praticamente minha co-orientadora durante todo esse tempo e minha orientadora oficial por 1 ano. Obrigada por toda atenção e apoio.

Ao professor Eduardo César Tondo, que deu a ideia deste trabalho e foi, portanto, o iniciador desta pesquisa. Obrigada por toda atenção, pela disponibilização de materiais e pela co-orientação.

A todas as queridas colegas do Laboratório 164 e, em especial, à colega e amiga Ana Paula Basso, que me auxiliou muitíssimo durante este trabalho e acompanhou de perto cada experimento, compartilhando comigo suas experiências e dando dicas muito valiosas. Agradeço também pela amizade dentro e fora do laboratório, e por todo o apoio e carinho.

À colega de microbiologia Tiane Martin de Moura, que de toda boa vontade me passou todo o conhecimento prático necessário para a realização deste trabalho e me forneceu muitos materiais. Agradeço muito pela sua gentileza e generosidade.

À IC mais querida que eu poderia ter tido, Taiana Trindade de Almeida, sem a qual este trabalho jamais teria sido realizado no período de tempo em que foi. Tai, deixo meu muitíssimo obrigada a você não somente pela contribuição vital a este trabalho, mas pela sua boa vontade, bom humor e entusiasmo.

Aos funcionários, professores e colegas da UFRGS, muitíssimo obrigado.

Ao CNPq, pelos recursos fomentados para a realização deste estudo.

# ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DAS ESPÉCIES, DA PREVALÊNCIA DE GENES DE ENTEROTOXINAS E DO PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVOS ISOLADOS DE CARNE DE FRANGO RESFRIADA E CONGELADA<sup>1</sup>

Autor: Paula Dalcin Martins

Orientadora: Ana Paula Guedes Frazzon

Co-orientador: Eduardo César Tondo

## RESUMO

Estafilococos Coagulase Positivos são os agentes etiológicos da Intoxicação Alimentar Estafilocócica, uma das Doenças Transmitidas por Alimentos de maior ocorrência no mundo, que está frequentemente associada a alimentos de origem animal. Essa intoxicação ocorre devido à ingestão de Enterotoxinas Estafilocócicas, as quais são proteínas termorresistentes que apresentam atividade superantigênica, causando vômito, dor abdominal e disenteria. Estas bactérias também causam uma vasta gama de outras doenças, incluindo infecções hospitalares. Sua resistência a muitos antimicrobianos é motivo de preocupação, especialmente quanto aos *Staphylococcus aureus* Resistentes à Meticilina. Este estudo objetivou identificar os isolados em nível de espécie e avaliar a prevalência de genes de enterotoxinas e o perfil de resistência a antimicrobianos de estafilococos coagulase positivos isolados de carne de frango congelada e resfriada. Trinta carcaças de frango foram amostradas e, os estafilococos, quantificados. Os isolados foram identificados através de testes bioquímicos e submetidos à Reação em Cadeia da Polimerase para a identificação de genes de enterotoxinas clássicas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*). O perfil de resistência frente a onze antimicrobianos foi avaliado. Ao todo, 50 isolados foram identificados. *S. aureus* foi a espécie mais prevalente (62%), seguida de *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. delphini* e *S. schleiferi* subsp. *coagulans*. Genes de enterotoxinas foram encontrados em 70% dos isolados, e *sea* (68%) e *sed* (26%) mostraram-se os mais prevalentes. Oitenta por cento dos isolados apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados e 40% demonstraram multirresistência. Os índices mais elevados de resistência foram aqueles à penicilina, teicoplanina, oxacilina e clindamicina. *S. aureus* Resistentes à Vancomicina e *S. intermedius* Resistentes à Vancomicina foram isolados e apresentaram Concentrações Inibitórias Mínimas de 512 e 54 µg/mL, respectivamente. Conclui-se que tais isolados de carne de frango podem representar riscos à segurança alimentar em nível de saúde pública, uma vez que genes de enterotoxinas e resistência a antimicrobianos foram amplamente encontrados. Além disso, estes achados, somados à detecção de estafilococos resistentes à vancomicina, podem indicar a disseminação de micro-organismos potencialmente patogênicos e de genes de resistência à vancomicina fora das barreiras clínicas.

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente - Microbiologia do Ambiente, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (93 p.) Setembro, 2012.

# ANALYSIS OF SPECIES DISTRIBUTION, ENTEROTOXIN GENES PREVALENCE AND ANTIBIOTIC RESISTANCE PROFILE OF COAGULASE POSITIVE STAPHYLOCOCCI ISOLATED FROM FROZEN AND CHILLED CHICKEN MEAT<sup>2</sup>

Author: Paula Dalcin Martins  
Supervisor: Ana Paula Guedes Frazzon  
Co-supervisor: Eduardo César Tondo

## ABSTRACT

Coagulase-Positive Staphylococci are the causative agents of Staphylococcal Food Poisoning, one of the most common foodborne diseases, which are frequently related to foods of animal origin. This food poisoning occurs due to the ingestion of Staphylococcal Enterotoxins, which are thermo-resistant proteins that display superantigen activity, causing vomit, abdominal pain and diarrhea. These bacteria also cause a wide range of other diseases, including nosocomial infections. Their resistance to innumerable antimicrobials has been reason of concern, especially regarding Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. This study aimed to identify the isolates at species level and to evaluate enterotoxin genes prevalence and antimicrobials resistance profile of Coagulase-Positive Staphylococci isolated from chilled and frozen raw chicken meat. Thirty chicken carcasses were sampled and staphylococci were quantified. The isolates were identified by biochemical tests and submitted to Polymerase Chain Reaction identification of classical enterotoxin genes (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* and *see*). The resistance to 11 antimicrobials was assessed. Fifty isolates were identified. *S. aureus* was the most prevalent species (62%), followed by *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. delphini* and *S. schleiferi coagulans*. Enterotoxin genes were found in 70% of isolates, and *sea* (68%) *sed* (26%) were most encountered genes. Eighty percent of the isolates were resistant at least to one antimicrobial and 40% were multiresistant. The highest resistance rates were those to penicillin, teicoplanin, oxacillin and clindamycin. Vancomycin-Resistant *S. aureus* and Vancomycin-Resistant *S. intermedius* were isolated and they presented Minimum Inhibitory Concentrations of 512 and 54 µg/mL, respectively. In conclusion, such isolates from raw chicken meat may represent food safety hazards regarding public health, since staphylococcal enterotoxin genes and antibiotic resistance were abundantly encountered. Moreover, these findings, summed to vancomycin-resistant staphylococci detection, may point out the dissemination of potentially pathogenic microorganisms and vancomycin resistance genes outside clinical boundaries.

<sup>2</sup>Master of Science dissertation in Environment Microbiology, Institute of Basic Health Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (93 p.) September, 2012.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>viii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS</b> .....	<b>x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 – Objetivo geral .....	3
1.2 – Objetivos específicos.....	3
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>4</b>
2.1 – Produtos de origem animal .....	4
2.2 – A carne de frango .....	5
2.3 – Os Estafilococos Coagulase Positivos (EcoP).....	10
2.4 – Resistência a Antimicrobianos .....	15
2.5 – Intoxicação Alimentar Estafilocócica .....	21
2.6 – Enterotoxinas Estafilocócicas.....	24
2.6.1 – Aspectos moleculares das enterotoxinas estafilocócicas .....	27
2.7 – Legislação brasileira para alimentos .....	30
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
3.1 – Coleta das amostras.....	31
3.2 – Contagens e Isolamento .....	31
3.3 – Provas bioquímicas .....	32
3.3.1 – Ágar Sal Manitol .....	33
3.3.2 – Teste da Catalase.....	33
3.3.3 – Teste de Voges-Proskauer (VP).....	33
3.3.4 – Teste de fermentação de açúcares .....	34
3.3.5 – Susceptibilidade à Polimixina B.....	34
3.3.6 – Controle de qualidade das provas de identificação .....	34
3.4 – Teste de susceptibilidade a antimicrobianos .....	34
3.5 – Extração de DNA total .....	35
3.6 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção do gene da coagulase ( <i>coa</i> ) .....	36
3.7 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção dos genes das enterotoxinas A ( <i>sea</i> ) e D ( <i>sed</i> ) .....	37
3.8 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) Multiplex para detecção dos genes das enterotoxinas B ( <i>seb</i> ), C ( <i>sec</i> ) e E ( <i>see</i> ) .....	38
3.9 – Eletroforese em gel de agarose .....	38
3.10 – Detecção dos genes <i>vanA</i> , <i>vanB</i> , <i>vanC1</i> e <i>vanC2/3</i> .....	38
3.11 – Detecção de <i>S. aureus</i> resistentes à metilicina .....	39

<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
4.1 – Contagens estafilocócicas .....	41
4.2 – Isolamento de Estafilococos Coagulase Positivos (EcoP) .....	42
4.3 – Identificação bioquímica .....	42
4.4 – Enterotoxinas estafilocócicas.....	43
4.5 – Resistência a antimicrobianos.....	44
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>46</b>
5.1 – Contagens e Isolamento .....	46
5.2 – Identificação bioquímica .....	47
5.3 – Enterotoxinas estafilocócicas.....	50
5.4 – Perfil de resistência aos antimicrobianos dos isolados .....	52
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>59</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>61</b>
<b>VITA.....</b>	<b>82</b>

## LISTA DE TABELAS

		Página
TABELA 1	Características moleculares das enterotoxinas estafilocócicas (SEs) clássicas.....	29
TABELA 2	Descrição dos <i>primers</i> , temperaturas de anelamento e tamanho dos produtos relativos aos ensaios de PCR .....	40
TABELA 3	Contagens de estafilococos totais em amostras de carne de frango congelada e resfriada.....	42
TABELA 4	Prevalência de genes de enterotoxinas estafilocócicas dentre espécies de EcoP em carnes de frango congeladas e resfriadas.....	43
TABELA 5	Perfil de resistência dos EcoP isolados de carne de frango .....	44

## LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 Exemplos de ligações de antígenos convencionais e superantígenos com Receptores de Células T e MCH de classe II .....	26

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
ATCC: "American Type Culture Collection"  
BHI: Infusão Cérebro Coração  
CDC: "Centers for Disease Control and Prevention"  
CFL: Cefalotina  
CIP: Ciprofloxacina  
CLI: Clindamicina  
CLO: Cloranfenicol  
CLSI: "Clinical and Laboratory Standards Institute"  
DNA: Ácido Desoxirribonucleico  
DTA: Doenças Transmitidas por Alimentos  
ECoN: Estafilococos Coagulase Negativo  
ECoP: Estafilococos Coagulase Positivo  
EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético  
Fig.: Figura  
g: unidades de gravidade  
GEN: Gentamicina  
gene *coa*: Gene da coagulase  
gene *sea*: Gene da enterotoxina A  
gene *seb*: Gene da enterotoxina B  
gene *sec*: Gene da enterotoxina C  
gene *sed*: Gene da enterotoxina D  
gene *see*: Gene da enterotoxina E  
h: Hora  
IAE: Intoxicação Alimentar Estafilocócica  
IFN: Interferon  
IL: Interleucina  
Kb: Kilobases  
KDa: Kilodalton  
M: marcador  
mg: miligrama  
MgCl<sub>2</sub>: Cloreto de Magnésio  
Min.: minutos  
mL: mililitros  
mM: milimolar  
mPCR: multiplex PCR  
MRSA: *Staphylococcus aureus* Resistentes à Meticilina  
n.: Número  
ng: Nanogramas  
°C : Graus Celsius  
OXA: Oxacilina  
p.: Página  
pb: Pares de Bases  
PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PEN: Penicilina  
PF: Oligonucleotídeo “Forward”  
pH: Potencial de Hidrogênio Iônico  
PLPs: Proteínas de Ligação à Penicilina  
PR: Oligonucleotídeo “Reverse”  
%: Porcentagem  
RDC: Resolução da Diretoria Colegiada  
RIF: Rifampicina  
rRNA: Ácido Ribonucleico Ribossomal  
RS: Rio Grande do Sul  
s: Segundo  
SAg: Superantígenos  
SDS: Dodecil Sulfato de Sódio  
SE: Enterotoxina Estafilocócica  
SEA: Enterotoxina A  
SEB: Enterotoxina B  
SEC: Enterotoxina C  
SED: Enterotoxina D  
SEE: Enterotoxina E  
SPE: Exotoxinas Pirogênicas Estreptocócicas  
SUT: Sulfazotrim  
Tab.: Tabela  
TAE: Tampão Tris-Acetato-EDTA  
Taq polimerase: Enzima polimerase extraída da bactéria *Thermus aquaticus*  
TCR Receptores de células T  
TE: Tampão Tris-EDTA  
TEI: Teicoplanina  
TET: Tetraciclina  
TGI: Trato Gastrointestinal  
TNF: Fator de Necrose tumoral  
TSST-1: Toxina da Síndrome do Choque Tóxico  
UFC: Unidade Formadora de Colônia  
UFRGS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
µg: micrograma  
µL: microlitro  
µm: micrômetro  
µM: micromolar  
v.: Volume  
VAN: Vancomicina  
VP: Voges-Proskauer  
VRSA: *Staphylococcus aureus* resistentes à vancomicina  
VRSI: *Staphylococcus intermedius* resistentes à vancomicina

## 1. INTRODUÇÃO

Os estafilococos são um gênero de bactérias Gram positivas de forma esférica, que formam arranjos semelhantes a cachos de uva, distribuídas ubiquamente na natureza. São anaeróbios facultativos e sua faixa temperatura de crescimento ótima é de 30 a 35°C. Os estafilococos são divididos em dois grupos quanto à capacidade de coagulação de plasma: os coagulase negativos e os coagulase positivos. O grupo dos estafilococos coagulase positivos (EcoP) é composto por 7 espécies: *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. delphini*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. intermedius*, *S. pseudointermedius* e *S. lutrae*.

*Staphylococcus aureus* é a principal espécie representante dos EcoP. Seu reservatório é o trato nasal inferior de mamíferos e aves. Cerca de 20% da população humana saudável são carreadores persistentes deste micro-organismo, enquanto 60% são carreadores temporários e 20% provavelmente jamais serão carreadores. É um patógeno humano capaz de causar uma vasta gama de doenças: terçol, sinusite, carbúnculo, furúnculo, pneumonia, bacteremia, endocardite, artrite séptica, erisipela, diarreia, síndrome da pele escaldada, osteomielite, síndrome do choque tóxico, infecção do trato urinário, entre outras.

A Intoxicação Alimentar Estafilocócica (IAE) é umas das Doenças Transmitidas por Alimento (DTAs) mais frequentes a nível global. É

caracterizada por vômito, dor abdominal e diarreia, geralmente dentro de até 6 horas após a ingestão de Enterotoxinas Estafilocócicas (SE), as quais são proteínas termorresistentes que apresentam atividade superantigênica. Dentre todas as SEs já descritas, SEA e SED são as enterotoxinas mais comumente envolvidas em surtos. Leite e derivados do leite, assim como carnes, especialmente alimentos manipulados, possuem papel fundamental em IAEs, uma vez que SEs são frequentemente isoladas destes alimentos e muitos surtos são decorrentes de sua ingestão.

Estafilococos isolados de diversas fontes, como alimentos, animais e indivíduos saudáveis e hospitalizados, têm apresentado altos níveis de resistência a antimicrobianos. *S. aureus* Resistentes à Meticilina (MRSA) tem recebido atenção particular. MRSA são resistentes a todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e, apesar de causarem infecções similares a outros *S. aureus*, seu tratamento é mais desafiador. Além disso, a resistência a  $\beta$ -lactâmicos tem sido encontrada cada vez mais dentre *S. aureus* isolados mundialmente. MRSA resistentes à vancomicina (VRSA) – a droga de escolha para o tratamento dos MRSA – foram raramente relatados na literatura. Os poucos isolados descritos abrigavam o gene *vanA*, um determinante genético originário de enterococos. Pesquisadores sugeriram que o custo biológico da resistência do tipo *vanA* é alto quando a resistência é induzida na presença de vancomicina, mas que é baixo na ausência de indução, e que, portanto, o potencial para a disseminação de isolados clínicos de VRSA não deveria ser subestimado.

A falta de dados em relação à qualidade microbiológica da carne de frango crua e industrializada e às diversas espécies de EcoP justifica estudos

que buscam um melhor entendimento de seu papel em IAE e da cadeia de transferência de resistência a antimicrobianos entre alimentos e seres humanos. Uma vez que, no Brasil, não existem limites legais para as quantidades de EcoP em carne crua de frango congelada e resfriada, necessita-se estabelecer se existem ou não riscos de segurança em relação a este tipo de alimento.

### **1.1 – Objetivo geral**

Este estudo objetivou avaliar a qualidade microbiológica de carnes cruas de frango, congeladas e resfriadas, quanto à presença de EcoP, sua capacidade enterotoxigênica e seu perfil de resistência a antimicrobianos.

### **1.2 – Objetivos específicos**

A – Realizar as contagens de estafilococos em amostras de carne de frango comercializadas em Cruz Alta e Porto Alegre, RS.

B – Isolar estafilococos coagulase positivos e identificá-los em nível de espécie através de testes bioquímicos.

C – Avaliar a prevalência de 5 genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas clássicas (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*).

D – Avaliar o perfil de susceptibilidade dos isolados a 11 antimicrobianos.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 – Produtos de origem animal**

Dentre os vários alimentos que podem ser fonte de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), os produtos de origem animal – leites, carnes e seus subprodutos – destacam-se como importantes fontes de infecção alimentar em seres humanos. Tais infecções podem ser causadas por uma variedade de patógenos, tais como, *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. Estes microrganismos são membros da microbiota do Trato Gastrointestinal de animais, e podem persistir, nos mesmos, após o abate e até mesmo após o processamento do alimento (Toldrá, 2009).

Durante o processamento de um alimento, normas de higiene devem ser respeitadas para que se promovam e se mantenham alimentos livres de micro-organismos patogênicos. Eventuais deficiências no processamento dos alimentos podem levar à permanência de patógenos no alimento final, bem como inconformidades na sua manipulação e conservação podem levar à sua contaminação. Condições sanitárias deficientes durante o abate dos animais, o cozimento, a linha de processamento de produtos cárneos e o armazenamento são fatores que favorecem a transmissão de patógenos a humanos através dos

alimentos (Mesquita *et al.*, 2006). A rota de transmissão desta microbiota animal para os seres humanos se dá no consumo de carnes e leite contaminados ou de seus derivados. Os manipuladores de alimentos podem ser portadores assintomáticos de vários micro-organismos e transferi-los para os alimentos. Um estudo brasileiro observou que 30% dos manipuladores de alimentos possuíam passagem nasal colonizada por *S. aureus*, reforçando que medidas de controle e higiene são pré-requisitos fundamentais para a produção de alimentos de origem animal (Acco *et al.*, 2003).

## **2.2 – A carne de frango**

O Ministério da Agricultura do Brasil constatou que “Nas últimas três décadas, a avicultura brasileira tem apresentado altos índices de crescimento. Seu bem principal, o frango, conquistou os mais exigentes mercados. O Brasil se tornou o um dos países que mais o produz e o líder em exportação mundial. Atualmente, a carne de frango chega a 142 países. O mercado interno detém 70% a carne de frango produzida no Brasil e cerca de 40% da carne exportada no mundo é de origem brasileira. Em 2018/ 2019, as exportações de carne de frango deverão representar 90% do comércio mundial, o que indica que o Brasil continuará a manter sua posição de primeiro exportador mundial de carne de frango” (Brasil, 2012).

De acordo com o Relatório Anual 2010/2011 da União Brasileira de Avicultura (UBABEF), a produção de carne de frango chegou a 12.230 milhões de toneladas em 2010, o que representa um crescimento de 11,38% em relação a 2009. Com esse desempenho, o Brasil é o terceiro maior produtor mundial de carne de frango, ficando atrás da China, que está em segundo

lugar, com produção de 12.550 milhões de toneladas em 2010, e dos Estados Unidos, com produção de 16.648 milhões de toneladas em 2010. O Oriente Médio é o principal importador da carne de frango brasileira. Em segundo lugar está a Ásia e, em terceiro, a África. A região sul do Brasil destaca-se na produção de carne frango. Em 2010, a região sul deteve 62,59% da participação no abate de frangos no Brasil. O Paraná foi o estado que mais abateu frangos, seguido de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Já no quesito exportações, Santa Catarina foi o estado brasileiro que mais exportou a carne de frango em 2010, seguido do Paraná e Rio Grande do Sul (UBABEF, 2010/2011).

A composição da carne de frango varia conforme a idade, o sexo, a linhagem e a parte analisada, dentre outros fatores. Um estudo que avaliou frangos das linhagens Paraíso Pedrês e Pescoço Pelado chegou aos seguintes valores para a carne do peito da ave abatida aos 85 dias de vida: 73,53% de umidade, 23,03% de proteínas, 0,77% de extrato etéreo, 1,08% de cinzas e pH em torno de 5,8 (Faria *et al.*, 2009).

Todo o processo pelo qual a carne de frango passa foi descrito por Vânia Ferreira Roque (1996). O processamento da carne de frango inicia-se na recepção dos animais. As aves chegam ao frigorífero em caminhões dentro de gaiolas – em geral, há cinco ou mais frangos por gaiola. Após a descarga, os caminhões e as gaiolas são lavados e desinfetados com hipoclorito de sódio 5% e vistoriados pela Inspeção Federal. Os frangos ficam parados por aproximadamente duas horas ou mais na plataforma, a qual deve ser protegida do sol e de chuva e dotada de um sistema de ventilação e de higienização

constante do local. Em seguida, os frangos são pendurados pelos pés em uma linha contínua e passam pelo insensibilizador, onde a cabeça fica imersa em um tanque com água, pelo qual passa uma corrente elétrica de baixa voltagem e alta frequência. Esta voltagem pode variar de 40 a 80 watts conforme o tamanho, idade e tipo de aves. Em alguns países, como a Suécia, utiliza-se como agente insensibilizador o gás carbônico. Esta operação não mata a ave, e sim provoca uma espécie de ataque epilético que a leva a um relaxamento muscular.

Após a insensibilização, procede-se à sangria. A sangria manual é feita por empregados que cortam as veias por meio de faca; já a mecânica é feita por sangrador automático. Depois da secção das veias, os frangos percorrem um túnel de gotejamento de sangue revestido de azulejo que possui fundo inclinado para o recolhimento do sangue, o qual corre por gravidade para a graxaria. Logo após o esgotamento do sangue no túnel de sangria, os frangos seguem para a escaldadeira, um tanque com água à temperatura média de 60°C. A escaldadeira tem a finalidade de realizar uma lavagem prévia da ave e de afrouxar as penas para facilitar a depenagem.

Para a retirada das penas, utilizam-se, em geral, três depenadeiras em série, removendo-se as penas e a cutícula da superfície dos pés dos frangos. Logo após a saída da máquina de depenagem, cortam-se mecanicamente os pés dos frangos através de um disco afiado girando em torno do próprio eixo. Os pés são encaminhados para a graxaria ou separados para a venda.

Em seguida, procede-se à evisceração, que é uma das operações mais importantes na linha de abate, pois, se bem feita, implicará a durabilidade e a qualidade da carcaça. Primeiramente, as vísceras são expostas para que sejam examinadas pela Inspeção Federal. Todas as operações do processo de evisceração podem ser feitas através de evisceradora automática.

Posteriormente, a carcaça é pré-resfriada em dois equipamentos: o pré-resfriador ou pré-*chiller*, que inicia o resfriamento, assim como a limpeza e a reidratação da carcaça, e o resfriador ou *chiller*, que finaliza o processo. A diminuição da temperatura para 4 a 6°C evita a proliferação da microbiota das carcaças. Os frangos saem do *chiller* através de uma esteira e caem em uma mesa, ao redor da qual, funcionários os penduram em ganchos. Esta é a etapa de gotejamento, cuja finalidade é eliminar o excesso d'água adquirida na operação de pré-resfriamento.

Finalmente, as carcaças são classificadas e destinadas ao processo de embalagem ou à sala de cortes, de acordo, principalmente, com sua aparência externa. As carcaças "mais perfeitas" são embaladas inteiras; já as demais são destinadas ao corte. O espostejamento é o processo pelo qual ocorre o corte das carcaças em diversas partes, podendo ser feito manualmente ou mecanicamente. Após serem embaladas, as carcaças inteiras ou partes são resfriadas e estocadas até o pedido de expedição (Roque, 1996).

Ao contrário do que a população assume como informação verdadeira, a carne de frango brasileira não possui hormônios. A UBABEF alega que, além de o uso de hormônios na produção de carne de frango ser proibido no Brasil, o curto processo de produção – em média de 45 dias – não

permite que tais substâncias façam qualquer efeito. Soma-se a isso o fato de que a aplicação de hormônios de crescimento seria inviável na produção comercial (UBABEF, 2012). O Plano Nacional de Controle de Resíduos do Ministério da Agricultura, que monitora, continuamente, a presença de medicamentos veterinários de uso proibido no país em carnes, incluindo hormônios, atestou que, nos últimos quatro anos, foram realizadas mais de 2,8 mil análises em frangos e que, "a partir dos resultados obtidos, a conclusão é de que não há indícios da utilização dessas substâncias nas carnes de aves consumidas pela população brasileira e exportadas a mais de cem países" (Brasil, 2008).

Já quanto aos antimicrobianos, o mesmo não pode ser dito. No Relatório do "Monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil", que faz parte do Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF), consta que "Tanto em relação a salmonelas quanto aos enterococos, resistência cruzada foi observada entre drogas de última geração de uso exclusivo veterinário, com aquelas empregadas na clínica humana, provavelmente relacionada ao emprego de antimicrobianos nos animais, com finalidades terapêuticas, profiláticas ou como promotores do crescimento. (...) Com relação ao possível impacto à saúde pública diante da situação aqui relatada, não se pode descartar que os perfis de resistência encontrados estejam associados ao uso não controlado ou não assistido de antimicrobianos na avicultura de corte (frango), propiciando o aparecimento de cepas

resistentes dos microrganismos pesquisados, dificultando o seu controle”(ANVISA, 2008a).

A Secretaria de Estado da Saúde do Paraná publicou o documento “Levantamento do Uso e Comercialização de Medicamentos Veterinários em Frango de Corte”, que faz parte do Programa Estadual de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal (PAMvet-PR). No documento consta o seguinte: “Este estudo demonstrou o uso das tetraciclina e olaquinox como promotores de crescimento e, como terapêuticas as tetraciclina, penicilina e sulfonamidas proibidas pelo Ministério da Agricultura na produção de frango de corte” (Paraná, 2005). Portanto, se, por um lado, a carne de frango brasileira é livre de hormônios, por outro, ela contém resíduos de medicamentos veterinários – os antimicrobianos.

### **2.3 – Os Estafilococos Coagulase Positivos (EcoP)**

Os micro-organismos do gênero *Staphylococcus* pertencem à família *Micrococcaceae*, que inclui quatro gêneros: *Planococcus*, *Micrococcus*, *Stomatococcus* e *Staphylococcus* (Boone *et al.*, 2001). Os *Staphylococcus* são cocos Gram positivos que tendem a formar agrupamentos semelhantes a cachos de uva. Apresentam diâmetro entre 0,5 e 1,5 µm, são imóveis e não formam esporos. São anaeróbios facultativos e, portanto, produzem a enzima catalase (Varnam & Evans, 1996) (Murray *et al.*, 2003).

Os estafilococos são capazes de secretar enzimas e citotoxinas tais como quatro hemolisinas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ), nucleases, proteases, lipases, hialuronidases, colagenases (Dinges *et al.*, 2000), fibrolisina, coagulase e  $\beta$ -lactamase (Spicer, 2002). Estas enzimas e citotoxinas são encontradas em

elementos genéticos como plasmídeos, transposons e prófagos (Novick *et al.*, 2001).

Atualmente, existem 46 espécies e 24 subespécies de *Staphylococcus* spp. descritas. O gênero *Staphylococcus* é dividido em dois grupos baseado na habilidade de coagular o plasma: Estafilococos Coagulase Positivos (ECoP) e Estafilococos Coagulase Negativos (ECoN) (Euzéby, 2012). A atividade de coagulase é considerada um fator de virulência, pois o coágulo consiste em um acúmulo de fibrina ao redor das células bacterianas que isola a área infectada, o que dificulta o acesso das células do sistema imune do hospedeiro às bactérias (Madigan *et al.*, 2004). O coágulo ajuda a impedir a fagocitose, pois os leucócitos não conseguem penetrar adequadamente nos coágulos (Schaechter *et al.*, 2002).

Os ECoN são o maior grupo e entre estas espécies, *S. epidermidis* é a mais prevalente e persistente na pele e membranas mucosas de humanos e *S. hominis* é a segunda mais frequente, enquanto que *S. saccharolyticus* é a única espécie anaeróbia estrita residente na pele. Outras espécies de ECoN menos frequentes e membros da população residente encontradas transitoriamente na pele são *S. haemolyticus*, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. lugdunensis* e *S. cohnii*. Existem espécies localizadas em nichos específicos como *S. capitis* (cabeça), *S. auricularis* (canal auditivo) e *S. saprophyticus* (trato geniturinário) (Cordeiro, 2007).

*Staphylococcus carnosus* e *S. equorum* desempenham um papel importante nos processos de fabricação de vários produtos derivados de

carnes, especialmente salames, em que são usados como culturas *starter* – iniciadores de fermentação (Place *et al.*, 2003) (Leroy *et al.*, 2010).

*Staphylococcus epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. hominis* são as espécies mais frequentemente isoladas de amostras clínicas. Nos EUA, cerca de 30 % de todas as infecções nosocomiais da corrente sanguínea são causadas por ECoN. A incidência de infecções hospitalares causadas por ECoN tem aumentado nos últimos anos (Piette & Verschraegen, 2009).

Os EcoP são o menor grupo, abrangendo 7 espécies: *S. aureus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. hyicus*, *S. delphini*, *S. lutrae*, *S. intermedius* e *S. pseudointermedius* (Euzéby, 2012).

*Staphylococcus aureus* é a espécie mais prevalente em doenças em seres humanos (Koneman & Cury, 2001). Seu reservatório é o trato nasal inferior de mamíferos e aves. Cerca de 20% da população humana saudável são carreadores persistentes deste micro-organismo, enquanto 60% são carreadores temporários e 20% provavelmente jamais serão carreadores (Kluytmans *et al.*, 1997). Carreadores nasais apresentam maior risco de infecções por este micro-organismo (Wertheim *et al.*, 2005).

*Staphylococcus hyicus* é o agente causador da Síndrome da Pele Escaldada em porcos através da produção de exotoxinas (Tanabe *et al.*, 1996). Um estudo da prevalência de exotoxinas em 8 países encontrou que 32% dos *S. hyicus* isolados de porcos saudáveis e doentes e de outros animais eram exotoxigênicos (Andresen, 2005). *S. hyicus* também já foi descrito como causador de infecções em galinhas poedeiras (Chenier & Lallier, 2012) e bacteremia em um fazendeiro (Casanova *et al.*, 2011).

*Staphylococcus delphini* é uma espécie pouco estudada. Desde sua descrição pelo isolamento deste micro-organismo de golfinhos (Varaldo *et al.*, 1988), dois trabalhos relataram especificamente esta espécie. Um deles avaliou as propriedades de virulência de *S. delphini* isolados de pombas, encontrando resistência a alguns antimicrobianos, mas não genes para toxinas (Sudagidan & Aydin, 2012). Por outro lado, *S. delphini* foi o agente causador de diarreia em visons (*Mustella vison*) devida à colonização e produção de enterotoxina. De 36.000 animais, 5.000 adoeceram e 2.000 morreram. A produção das enterotoxinas SEA e SEE foi identificada por ELISA, mas as reações de PCR amplificaram somente see (Sledge *et al.*, 2010).

*Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* foi descrito em 1990 como uma nova espécie isolada da orelha externa de cães com otite (Igimi *et al.*, 1990). Desde então, alguns estudos identificaram a espécie em cães com otite ou pioderma, assim como em cães saudáveis (May *et al.*, 2005) (Foster & Barley, 2007) (Rich *et al.*, 2007). Dois casos de infecção humana já foram relatados: um de bacteremia em paciente imunocomprometido em diálise e outro de endocardite em paciente também imunocomprometido (Khanal *et al.*, 2011) (Kumar *et al.*, 2007).

*Staphylococcus lutrae* foi proposto como espécie em 1997 e, desde então, nenhum estudo se deteve nesta espécie. Enquanto realizavam estudos *post mortem* em lontras, pesquisadores britânicos encontraram esta nova espécie (Foster *et al.*, 1997).

*Staphylococcus intermedius* é a espécie predominante entre os EcoP na pele canina saudável e é o agente causador de pioderma e otite

externa em cães (Berg *et al.*, 1984) (Ihrke, 1987). Além de produzir toxina exfoliativa, esta espécie possui potencial enteroxigênico e já foi relatada em surtos de intoxicação alimentar (Lautz *et al.*, 2006) (Becker *et al.*, 2001) (Khambaty *et al.*, 1994). Casos de infecção zoonótica foram relatados nos últimos anos, gerando preocupação sobre este micro-organismo. *S. intermedius* foi identificado como agente etiológico de infecções em humanos, tais como meningite, septicemia, abscesso na pele, em que o micro-organismo foi inoculado pela saliva, e sinusite por isolado resistente à meticilina, cujo clone foi posteriormente encontrado no cão da paciente (Durdik *et al.*, 2010) (Hatch *et al.*, 2012) (Kelesidis & Tsiodras, 2010) (Kempker *et al.*, 2009). Além disso, a preocupação aumenta perante os níveis de resistência aos antimicrobianos desta espécie, especialmente em relação ao grupo dos  $\beta$ -lactâmicos. Inúmeros casos de *S. intermedius* resistentes à meticilina têm sido relatados com prevalência crescente (Chrobak *et al.*, 2009) (Kizerwetter-Swida, *et al.*, 2009).

Grande confusão foi gerada com a descrição da espécie *S. pseudointermedius* em 2005 (Devriese *et al.*, 2005). Baseados em análises moleculares, os autores separaram *S. interdemedius* de *S. pseudointermedius*, sendo, este último, geneticamente muito semelhante a *S. delphini*. A sugestão atual é que, bioquimicamente, considere-se nomear as três espécies como “Grupo do *S. intermedius*”, e que se identifiquem isolados de cães, gatos e humanos como *S. pseudointermedius*, isolados de equinos e pombos domésticos como *S. delphini* e isolados de pombos selvagens como *S. intermedius* (Devriese *et al.*, 2009). Desta forma, a maioria dos trabalhos até o

momento descritos em medicina veterinária e os problemas relacionados a infecções e resistência a antimicrobianos atribuídos a *S. intermedius* podem, de fato, estar se referindo a *S. pseudintermedius* (Bond & Loeffler, 2012).

#### **2.4 – Resistência a Antimicrobianos**

Bactérias presentes em alimentos constituem uma ameaça em relação à resistência aos antimicrobianos, pois bactérias resistentes podem se inserir na cadeia alimentar humana por meio de alimentos contaminados e transferir os genes de resistência às bactérias da microbiota normal ou às bactérias potencialmente patogênicas do trato gastrointestinal dos seres humanos (Teuber, 1999) (Witte, 2000).

A resistência a antimicrobianos é um fenômeno comum na natureza decorrente da competição pela sobrevivência entre as espécies. A grande maioria dos antimicrobianos utilizados como tratamento médico ou veterinário é produzida por um grupo de bactérias denominado actinomicetos. Cerca de 85% dos antibióticos são moléculas originárias ou derivadas de compostos deste grupo (Sykes & Skinner, 1973). O micro-organismo produtor de antibiótico deve apresentar também mecanismo de proteção contra a sua ação. Acredita-se que os genes de resistência originários de micro-organismos produtores de antibióticos sejam a origem da disseminação da resistência através da transferência de material genético (Demain, 1974) (Cundliffe, 1984) (Saunders, 1984).

Portanto, antes da introdução de antimicrobianos na clínica, a resistência bacteriana já existia em níveis baixos. Contudo, a partir da introdução da penicilina e demais antibióticos, os níveis de resistência têm

aumentado mundialmente. A evolução e a disseminação de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos são o resultado da pressão seletiva imposta pelo homem, seja pela prescrição necessária dessas drogas ou pelo uso incorreto em tratamentos sem diagnóstico estabelecido, automedicação, desperdício de restos de antimicrobianos no meio ambiente e emprego desses fármacos como promotores de crescimento em animais de produção. Quanto maior o uso de antibióticos, maiores os índices de resistência – como, por exemplo, vê-se no ambiente hospitalar – em decorrência da maior pressão seletiva. De maneira geral, os micro-organismos de importância médica vêm se tornando cada vez mais resistentes, sendo que seus índices de resistência variam de acordo com o país ou região e com o uso de determinados antimicrobianos. Contudo, os estafilococos – particularmente *S. aureus* – apresentam resistência amplamente difundida pelo mundo (Tavares, 2000).

Os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas – tais como a cefalotina, uma cefalosporina de primeira geração) causam danos às bactérias através na inativação de Proteínas de Ligação à Penicilina (PLPs), enzimas essenciais à montagem da parede celular bacteriana. Quatro PLPs nativas são encontradas em estafilococos; todas podem ser inativadas pelos  $\beta$ -lactâmicos. Como resultado da parede celular enfraquecida, as bactérias se tornam suscetíveis à lise osmótica e morrem (Pinho *et al.*, 2001). A proteína  $\beta$ -lactamase estafilocócica, a qual cliva o anel estrutural dos  $\beta$ -lactâmicos e pode estar codificada no cromossomo, em plasmídeo ou em transposon, confere resistência à penicilina e às cefalosporinas, mas não a penicilinas semissintéticas, como a metecilina, oxacilina ou cloxacilina. A aquisição do gene

*mecA*, que codifica para uma PLP2a, virtualmente confere resistência a todos os  $\beta$ -lactâmicos (Weese *et al.*, 2005).

A PLP2a tem afinidade muito baixa pelos  $\beta$ -lactâmicos, e acredita-se que ela auxilie a montagem da parede celular quando PLPs normais estão inativadas (Duquette & Nuttall, 2004). O gene *mecA* é encontrado em um grande elemento genético móvel chamado Cassete Cromossomal Estafilocócico ou SCCmec (do inglês “*Staphylococcal Chromosomal Cassette mec*”). Existem vários tipos de SCCmec, cuja tipagem molecular é utilizada para rastreamento epidemiológico de infecções associadas a hospitais ou à comunidade (Tenover & Goering, 2009) (Otter & French, 2010). A presença do gene *mecA* define MRSA. Contudo, alguns estudos o definem através do teste de susceptibilidade ao antibiótico (Van Duijkeren *et al.*, 2004).

Apesar de rara, a resistência a glicopeptídeos (vancomicina e teicoplanina) tem sido relatada. Até o momento, existem 11 casos clínicos de *S. aureus* resistentes à vancomicina (VRSA) bem descritos, sendo 9 nos Estados Unidos, um no Irã e um na Índia (Sievert *et al.*, 2008) (Finks *et al.*, 2009) (Aligholi *et al.*, 2008) (Saha *et al.*, 2008). Contudo, isolados apresentando susceptibilidade reduzida e resistência intermediária já haviam sido relatados anteriormente, sendo que os primeiros relatos deste tipo datam de 1997, no Japão (Hiramatsu *et al.*, 1997) (Hiramatsu *et al.*, 1997).

O mecanismo de resistência à vancomicina dos isolados de susceptibilidade reduzida ou resistência intermediária se dá no espessamento da parede celular. A vancomicina age através da ligação irreversível ao terminal D-alanil-D-alanina dos precursores da parede celular bacteriana,

inibindo sua síntese. Estes isolados de resistência intermediária sintetizam peptidoglicano extra com quantidades maiores de resíduos de D-alanil-D-alanina, que sequestram moléculas de vancomicina (Sieradzki *et al.*, 1999). Já os isolados clínicos completamente resistentes à vancomicina apresentam um mecanismo de resistência distinto. Análises genéticas sugerem que a transferência *in vivo* da resistência à vancomicina de *E. faecalis* para um MRSA ocorreu para produzir o isolado VRSA de Michigan. A aquisição do gene *vanA* no isolado VRSA de Michigan ocorreu via transferência interespecie do transposon *Tn1546*, carreador do gene, do co-isolado *E. faecalis* resistente à vancomicina (Weigel *et al.*, 2003). A partir desta transferência, o VRSA passou a sintetizar D-alanil-D-lactato ao invés de D-alanil-D-alanina (Lowy, 2003).

A família de genes de resistência à vancomicina inclui *vanA*, *vanB*, *vanB2*, *vanC1*, *vanC2*, *vanC3*, *vanD*, *vanE*, e *vanG* (Satake *et al.*, 1997). A resistência do tipo VanA é caracterizada por altos níveis de resistência tanto à vancomicina quanto à teicoplanina, enquanto a do tipo VanB é caracterizada por níveis variáveis de resistência à vancomicina e susceptibilidade à teicoplanina (Leclercq *et al.*, 1988) (Arthur *et al.*, 1996). Isolados do tipo VanD são caracterizados por níveis moderados de resistência à vancomicina e à teicoplanina (Depardieu *et al.*, 2004). Isolados do tipo VanC, VanE e VanG exibem resistência de baixo nível somente à vancomicina (Dutkamalen *et al.*, 1992) (Fines *et al.*, 1999) (Depardieu *et al.*, 2003).

A resistência à ciprofloxacina, uma droga da classe das quinolonas, resulta da mutação cromossomal dos genes codificadores da DNA girase e topoisomerase IV, sítios de ação das quinolonas. Mutações na topoisomerase

IV são mais críticas, uma vez que ela é alvo de ação primário da ciprofloxacina em estafilococos. Muitas vezes a troca de um único aminoácido já é suficiente para conferir resistência clínica, mas para fluoroquinolonas mais ativas, mutações adicionais parecem ser necessárias. O acúmulo de mutações aumenta o nível de resistência e é bastante comum que o DNA codificador das duas enzimas apresente mutações de resistência (Hooper, 2002). Um mecanismo de resistência adicional em *S. aureus* é a indução da bomba de efluxo de multidroga resistência NorA (Ng, *et al.*, 1994).

A classe dos aminoglicosídeos engloba antibióticos tais como: gentamicina, tobramicina, estreptomicina, neomicina e canamicina, dentre outros. O mecanismo principal de resistência aos aminoglicosídeos é a inativação da droga através de Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos (EMAs) codificadas dentro de elementos genéticos móveis (Vakulenko & Mobashery, 2003). A resistência à gentamicina, e coincidente resistência à tobramicina e canamicina, é mediada por uma enzima bifuncional com atividade de acetiltransferase e fosfotransferase codificada pelo determinante genético *aacA-aphD* (Lyon & Skurray, 1987). Os aminoglicosídeos matam as bactérias através da inibição da síntese proteica através da ligação ao RNA ribossômico 16S e através do rompimento da membrana celular bacteriana (Shakil *et al.*, 2008).

O mecanismo que confere resistência a macrolídeos e azalídeos (por exemplo, eritromicina, claritromicina, azitromicina), lincosamidas (lincomicina, clindamicina) e estreptograminas do grupo B (quinupristina, dalfopristina) em estafilococos é o mesmo e envolve a modificação do sítio de

ligação da droga no ribossomo bacteriano (Ross *et al.*, 1989) (Roberts *et al.*, 1999). Um gene *erm*, geralmente *ermC* ou *ermA*, codifica a metilação do sítio de ligação ao RNA ribossômico 23S que é compartilhado por estas três classes de drogas, cujos mecanismos de ação envolvem a inibição da síntese proteica. A resistência pode ser induzida ou constitutiva (Weisblum, 1995).

Os antimicrobianos do grupo das sulfonamidas, como o sulfazotrim, agem como inibidores competitivos da enzima diidropteroato sintase, uma enzima envolvida na síntese do folato. Derivados de folato são cofatores essenciais à biossíntese de ácidos nucleicos e proteínas em todas as células. Sulfonamidas são compostos análogos ao ácido para-aminobenzóico, que é substrato da enzima diidropteroato sintase e, portanto, competem com o substrato pela enzima e impedem a produção do folato. Sem a produção de folato, o micro-organismo não poderá sintetizar os ácidos nucleicos e morrerá. O sulfazotrim é a combinação de sulfametoxazol, uma sulfonamida, e trimetropim, um composto que também interfere na síntese do folato, especificamente com a enzima diidrofolato redutase (Hampele *et al.*, 1997) (Kent, 2000). Mutações na diidropteroato sintase estafilocócica podem levar à resistência às sulfonamidas (Skold, 2000).

A rifampicina é um antibiótico da classe das ansamicinas e inibe a ação da enzima RNA polimerase dependente de DNA bacteriana, ligando-se à subunidade  $\beta$  dentro do canal de ligação ao DNA ou RNA (Wehrli, 1983) (Campbell *et al.*, 2001). Análises genéticas de estafilococos resistentes à rifampicina revelaram que as mutações ocorrem nas regiões do gene *rpoB*, que

codifica subunidade  $\beta$  da enzima (Aubry-Damon *et al.*, 1998) (Wichelhaus *et al.*, 1999).

O cloranfenicol é um inibidor altamente específico e potente da biossíntese de proteínas. Seu mecanismo de ação reside na prevenção da alongação da cadeia peptídica. Sua atividade bacteriostática é baseada na sua ligação reversível ao centro da enzima peptidiltransferase da subunidade ribossomal 50S bacteriana (Schlunzen *et al.*, 2001). Dentre os diferentes mecanismos de resistência ao cloranfenicol, o mais frequentemente detectado é a inativação enzimática via acetilação da droga por diferentes tipos de enzimas cloranfenicol acetiltransferases (CATs) (Murray & Shaw, 1997). Em estafilococos, os genes *cat* dos grupos A-7, A-8 e A-9 predominam, sendo todos codificados por plasmídios (Schwarz *et al.*, 2004).

## **2.5 – Intoxicação Alimentar Estafilocócica**

A intoxicação alimentar estafilocócica (IAE) é um quadro clínico geralmente caracterizado por dor abdominal, náusea, vômito e diarreia, e, mais raramente, por febre. O início dos sintomas pode ocorrer em menos de uma hora até mais de 8 horas, com média de 4,4 horas após a ingestão de alimento contaminado. Cerca de 10% das pessoas que adoecem visitam hospitais ou são internadas, e mortes, especialmente de pacientes idosos, podem ocorrer (Holmberg & Blake, 1984).

A IAE é causada pela ingestão de alimentos contaminados com enterotoxinas estafilocócicas. Não são as bactérias em si, mas sim suas toxinas que provocam a doença. Estima-se que 100 a 1.000 ng de toxina sejam suficientes para produzir a doença em indivíduos susceptíveis (Bergdoll, 1990).

Surtos causados até mesmo por 0,5 ng/mL de enterotoxina já foram relatados (Evenson *et al.*, 1988). Enquanto alguns autores estimam que as contagens estafilocócicas mínimas para que haja a produção de enterotoxinas em alimentos devem ser  $10^5$  UFC/g de alimento (Mossel & García, 2003), outros estimam que possam ser  $10^4$  a  $10^8$  UFC/g (Docarmo & Bergdoll, 1990).

No Brasil, no estado de Minas Gerais, um grande surto de infecção alimentar em uma festa comunitária ocorreu em 1998. Dentre as 8.000 pessoas presentes, 4.000 pessoas adoeceram de IAE. A contagem estafilocócica encontrada nos alimentos (frango, bife, arroz e feijão) foi de  $2 \times 10^8$  UFC/g e estes continham 6 µg de SEA por grama de alimento. Análises moleculares revelaram a presença de *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *seh* e do gene *femA*, relevando a identidade do agente etiológico como *S. aureus*. As pessoas que haviam manipulado os alimentos para preparo foram investigadas, e *S. aureus* idênticos foram encontrados. Dos 4.000 doentes, 2.000 buscaram ajuda médica, 396 foram internados e, destes, 81 foram para a Unidade de Tratamento Intensivo (UTI). Destes 81, 16 morreram: 6 eram crianças de 0 a 5 anos de idade e 10 eram idosos de 65 a 90 anos. Este episódio retrata que a severidade da IAE não deve ser subestimada, e que as parcelas mais sensíveis da população são as crianças e os idosos (Do Carmo *et al.*, 2004).

No Brasil, entre 1999 e 2009, 6.349 surtos de DTAs foram registrados, dos quais 20,5% foram causados por *Staphylococcus*. No estado do Rio Grande do Sul, entre 1999 e 2005, 1.275 surtos foram notificados, dos quais *Salmonella* foi responsável por 64,2% e *S. aureus* por 11,7% (Brasil, 2009). Pelos dados do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), nos

Estados Unidos, *S. aureus* foi responsável pelas seguintes porcentagens de surtos: 5.18% em 1993, 8.78% em 1994, 3.87% em 1995, 6.25% em 1996 e 8.57% em 1997 (Olsen, Mackinon *et al.*, 2000). Em 1999, o CDC afirmou que, como casos de IAE não são sistematicamente relatados, estima-se que o número total seria 10 vezes maior, e que 185.060 casos/ano de IAE ocorram nos Estados Unidos (Mead *et al.*, 1999).

No Reino Unido, entre 1969 e 1990, 359 surtos de IAE ocorreram, sendo em todos causados por *S. aureus*. Isolados destes surtos e de casos esporádicos de IAE foram analisados, e 79% deles produziam SEA. As contagens estafilocócicas em alimentos variaram entre nenhum *S. aureus* viável detectado e  $1.5 \times 10^{10}$  UFC/g de alimento, com mediana de  $3 \times 10^7$ . Carnes ou seus produtos foram os veículos em 75% dos incidentes, sendo a carne de frango e o presunto as mais frequentemente implicadas (Wieneke *et al.*, 1993).

No Japão, de 1962 a 1988, *S. aureus* foi o segundo patógeno mais frequentemente envolvido em surtos, ficando atrás apenas da bactéria *Vibrio parahaemolyticus*. Durante este período, as notificações de IAEs quase chegaram a 300 surtos por ano; contudo, desde 1992, não passam de 100 surtos por ano. Em 2009, 1.048 surtos ocorreram, dos quais 948 tiveram as causas identificadas. Destes, 536 foram de origem bacteriana, sendo 41 causados por *S. aureus*, em que 690 pessoas foram envolvidas e nenhuma morte ocorreu (Japão, 2009).

Na França, *S. aureus* vem sendo o agente etiológico mais frequente de IAEs nos últimos anos. Em 2008, 32% dos casos de IAE com agente etiológico identificado foram atribuídos à espécie e, em 2009, 31% (Sanitaire,

2011). No boletim de vigilância sanitária de 2012 da região francesa da Bretanha, consta que as IAEs veiculadas por carnes contribuem para 12% dos casos, assim como peixes e frutos do mar (12%). Dos 178 surtos até agora registrados, 35% foram de natureza desconhecida, e, entre os surtos com agente etiológico identificado, *S. aureus* foi responsável por 21% dos casos, seguido pelas salmonelas (12%) e vírus entéricos (11%) (Sanitaire, 2012).

## **2.6 – Enterotoxinas Estafilocócicas**

As Enterotoxinas Estafilocócicas (SEs) são produzidas pelos EcoP, predominantemente por *S. aureus*, bem como por espécies de ECoN (Jay, 1996). As SEs são proteínas do grupo dos superantígenos (SAg) devido à capacidade de estimular grandes populações de células T, gerando superprodução de citocinas. As SE pertencem à família das toxinas pirogênicas, originárias de espécies de estafilococos e estreptococos. Nesta família, também estão incluídas toxinas que apresentam determinadas estruturas, funções e sequências de nucleotídeos similares, como a toxina da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1), as toxinas esfoliativas tipos A e B e as exotoxinas pirogênicas estreptocócicas (Choi *et al.*, 1989) (Balaban & Rasooly, 2000).

Até o momento, já foram descritos 43 diferentes superantígenos microbianos, dentre os quais muitos são relacionados à espécie *S. pyogenes* (Proft & Fraser, 2003), 19 são SEs e um é a toxina da Síndrome do Choque Tóxico (TSST-1). Segundo a sorologia, as SEs foram classificadas em cinco tipos (SEA, SEB, SEC<sub>1, 2, 3</sub>, SED e SEE – as enterotoxinas clássicas) até a descrição de várias outras enterotoxinas: SEG, SEH, SEI, SEJ, SEK, SEL,

SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER e SEU (Omoie *et al.*, 2005). A relação entre a presença destas últimas enterotoxinas e intoxicações alimentares ainda não é totalmente esclarecida (Omoie *et al.*, 2002), exceto para SEG, SEH e SEI (Mclauchlin *et al.*, 2000).

SAGs são os mitógenos de células T mais poderosos já descobertos, pois concentrações menores que 0.1 pg/mL de um SAG bacteriano já são suficientes para estimular linfócitos T de maneira descontrolada, resultando em febre, choque e morte (Bohach *et al.*, 1990) (Marrack & Kappler, 1990) (Miethke *et al.*, 1992). SAGs se ligam a moléculas de MHC de classe II expressas em células apresentadoras de antígenos do lado de fora do local de ligação peptídica, e subsequentemente ao receptor de célula T (TCR) via região variável da cadeia  $\beta$  ( $\beta V$ ) (Dellabona *et al.*, 1990) (Seth *et al.*, 1994) (Figura 1).

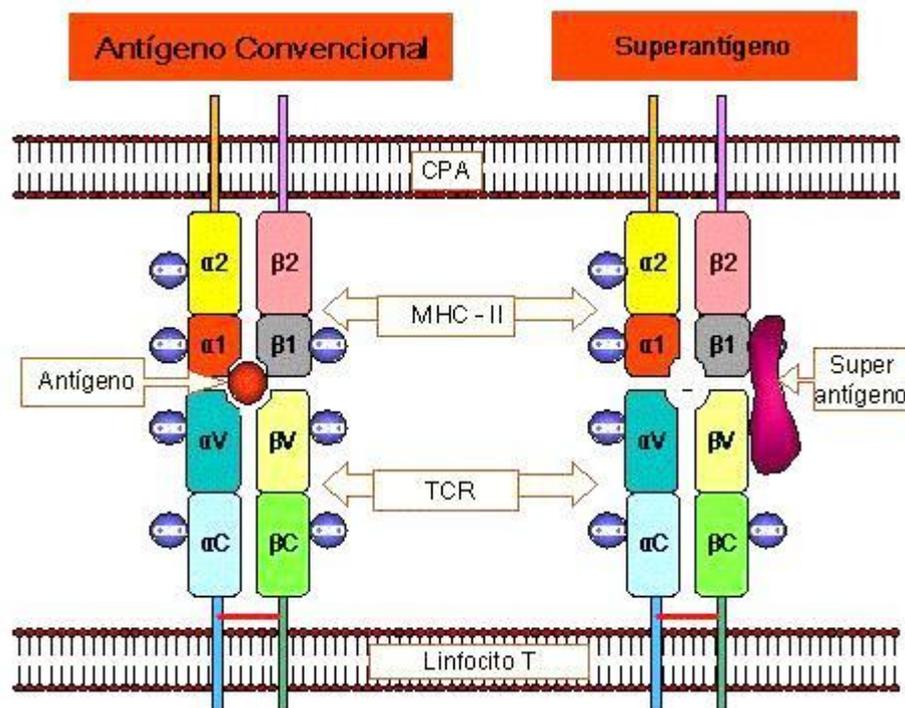


FIGURA 1: Exemplos de ligações de antígenos convencionais e superantígenos com Receptores de Células T e MCH de classe II. Fonte:

([http://epidemiologiamolecular.com/reconocimiento-del-antigeno-i/#\\_Toc222662842](http://epidemiologiamolecular.com/reconocimiento-del-antigeno-i/#_Toc222662842)).

Cada SAg se liga a um subconjunto de domínios  $\beta V$  dos TCRs e, como o número de regiões  $\beta V$  no repertório de células T humanas é restrito a aproximadamente 50, compreendendo cerca de 24 tipos principais de elementos  $\beta V$ , cerca de 20% da população de células T são ativados. Isto resulta na massiva liberação sistêmica de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$  e IL-1  $\beta$ , e mediadores de célula T, como IL-2, o que pode levar à febre e ao choque (Jupin *et al.*, 1988) (Fast *et al.*, 1989) (Herman *et al.*, 1991) (Miethke *et al.*, 1992).

As enterotoxinas são resistentes à hidrólise por proteases gastrintestinais, tais como pepsina, tripsina, renina, papaína e proteases jejunais (Bergdoll *et al.*, 1971) (Hui, 1994) (Schad *et al.*, 1997), o que permite sua passagem pelo trato gastrintestinal sem perder atividade. Além disso, apresentam uma grande capacidade de resistência ao calor. A termorresistência foi observada após o aquecimento de enterotoxinas a 100°C durante 30 minutos e sob temperaturas de pasteurização lenta e rápida (Murray, 2006) (Franco & Landgraf, 2005). Também se verificou que as atividades biológicas das SEs permanecem inalteradas mesmo após o processamento térmico usual dos alimentos (Holeckova *et al.*, 2002). Portanto, por mais que as bactérias sejam destruídas com a temperatura de cozimento dos alimentos, as enterotoxinas muitas vezes se mantêm inalteradas e podem causar quadros de intoxicação alimentar.

Embora a produção de SEs por ECoN seja rara, alguns estudos já relataram a produção de SEs por EcoN em queijo e leite de cabra e por isolados das mãos de trabalhadores em restaurante (Vernozyrozand *et al.*, 1996) (Udo *et al.*, 1999). Um estudo de inoculação experimental de EcoN em presunto, leite e creme demonstrou que a produção de enterotoxinas por EcoN é possível (Oliveira *et al.*, 2010). Moura e colaboradores encontraram que a prevalência de ECoN carreadores de genes de enterotoxinas entre amostras de morcilhas foi de 81,81 % (27/33). O gene *sea* foi o mais prevalente, seguido de *seb* e *sec* (Moura *et al.*, 2012). *S. intermedius* é o EcoP não-*S. aureus* predominante em alimentos; alguns isolados tem apresentado capacidade enterotoxigênica (Becker *et al.*, 2001) e este é o único EcoP não-*S. aureus* que esteve claramente envolvido em IAE (Khambaty *et al.*, 1994).

### **2.6.1 – Aspectos moleculares das enterotoxinas estafilocócicas**

Os nomes dos diferentes genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas iniciam com as letras *se* (*staphylococcal enterotoxin*). Os genes *sed* e *sej* são plasmidiais (Bayles & landolo, 1989) (Zhang *et al.*, 1998); *sea* e *see* são carreados por prófagos (Betley *et al.*, 1984) (Betley & Mekalanos, 1988) (Couch *et al.*, 1988); *sec*, *seg*, *seh*, *sei*, *sem*, *sen*, e *seo* são cromossomais (Jarraud *et al.*, 2001) (Letertre *et al.*, 2003) e *sel* e *sek* estão em ilhas de patogenicidade (Fitzgerald *et al.*, 2001). O gene *seb* já foi encontrado no cromossomo, em plasmídeos e em transposons (Shalita *et al.*, 1977) (Shafer & landolo, 1978).

As SEs são proteínas globulares solúveis em água, monoméricas com peso molecular de 26 a 29 KDa, ricas em lisina, ácido aspártico e ácido glutâmico e apresentam cisteínas, que formam pontes dissulfeto (Bergdoll *et al.*, 1981) (Prevost *et al.*, 1995) (Osterlund *et al.*, 2002). As SEs foram divididas em grupos por identidade gênica com base em sequências de aminoácidos. SEA, SED e SEE compartilham de 53 a 81 % de identidade; entre SEB e SEC a identidade é de 50 a 66 %. Em um panorama geral, as sequências de aminoácidos variam muito em termos de homologia: há 15,5% de homologia entre SEB e SEK e 90% entre SEA e SEE. Entretanto, todas as SAGs possuem uma sequência de assinatura característica que pode ser encontrada no banco de dados PROSITE: Lis-x(2)-[Leu-Ile-Val-Fen]-x(4)-[Leu-Ile-Val-Fen]-Asp-x(3)-Arg-x(2)-Leu-x(5)-[Leu-Ile-Val]-Tir (PS00278) (Proft & Fraser, 2003). As características moleculares das enterotoxinas clássicas estão sumarizadas na tabela 1.

**TABELA 1.** Características moleculares das Enterotoxinas Estafilocócicas (SEs) clássicas.

SE	Tamanho do Gene (pb <sup>a</sup> )	Tamanho da Proteína (aa <sup>b</sup> )	Peso Molecular (KDa <sup>c</sup> )	Referência
SEA	771	257	27.1	Betley e Mekalanos, 1988
SEB	798	266	31.4	Johns e Khan, 1988
SEC <sub>1</sub>	801	239	27.4	Bohach e Schlievert, 1987
SEC <sub>2</sub>	801	239	26.0	Bohach e Schlievert, 1989
SEC <sub>3</sub>	798	238	27.4	Couch e Betley, 1989
SED	27.6 Kb <sup>d</sup>	228	26.3	Bayles e landolo, 1989
SEE	771	257	29.3	Couch, Soltis <i>et al.</i> , 1988

a: pares de base; b: aminoácidos; c: Kídaltons; d: O gene *sed* foi encontrado em um plasmídeo de 27.6 Kilo bases.

## 2.7 – Legislação brasileira para alimentos

A legislação brasileira para alimentos foi estabelecida pelo Ministério da Saúde através da RDC nº 12 de 2 de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Os valores estabelecidos para os padrões microbiológicos de cada grupo de alimentos que constam no Anexo I da Resolução não se aplicam para o diagnóstico de caso ou surto de DTA. A enumeração de ECoP tem por objetivo substituir a determinação de *S. aureus*, uma vez que este critério consta como “Estaf. Coag. Positiva”. Consta no Anexo I desta RDC, no item 5 (Carnes e Produtos Cárneos), subitem 5b “Carnes resfriadas ou congeladas *“in natura”* de aves (carcaças inteiras, fracionadas ou cortes)”, níveis aceitáveis para Coliformes a 45°C/g (Brasil, 2001). Dentre os alimentos regulamentados pelo item 5, as contagens de *Salmonella*/25g e de Estafilococos Coagulase Positivos/g estão já estabelecidas. Contudo, para o item 5b, somente os coliformes são levados em consideração.

Portanto, este trabalho se justifica tanto pela falta de estudos que avaliem a existência destes micro-organismos em carne de frango congelada e resfriada que possam embasar uma futura legislação brasileira quanto pelo potencial patogênico de estafilococos já bem estabelecido na literatura. Nenhum estudo havia, até o presente momento, averiguado a qualidade microbiológica da carne de frango brasileira quanto à enterotoxigenicidade de estafilococos coagulase positivos nem quanto à susceptibilidade de tais micro-organismos a antimicrobianos, embora já se saiba que, no Brasil, antimicrobianos são empregados na criação aviária e que as infecções

hospitalares estafilocócicas vêm sendo causadas por bactérias cada vez mais resistentes.

Este estudo poderá iniciar a um processo de investigação mais profunda sobre a correlação entre a resistência a antimicrobianos na criação aviária e na clínica humana no Brasil, assim como instigar a criação de legislação específica para que haja uma diminuição nos números de casos de intoxicação alimentar no país e no exterior.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 – Coleta das amostras**

Trinta amostras de carne de frango de 13 marcas foram avaliadas, sendo 15 de carnes congeladas e 15 de carnes resfriadas. As amostras foram adquiridas em mercados nas cidades de Cruz Alta e Porto Alegre, Rio Grande do Sul, no período de abril a maio de 2011. Nos supermercados, as carnes congeladas eram mantidas a -12°C, enquanto as resfriadas, entre -1 e 4°C. As carnes estavam dentro do prazo de validade e variavam em componentes: partes de frango (asas, coxas, sobrecoxas, pescoço, pés, cabeça e peito) ou carcaça inteira com ou sem miúdos.

#### **3.2 – Contagens e Isolamento**

As contagens de estafilococos totais e o teste da coagulase foram realizados de acordo com o “*Bacteriological Analytical Manual*” do FDA (*Food and Drug Administration*) (Bennett & Lancette, 2001). Para cada unidade amostral (embalagem contendo a carne de frango), 25g de carne foram amostrados e imersos em 225 mL de água peptonada (Himedia) estéril. Após aproximadamente 10 minutos de homogeneização, 1 mL de líquido foi semeado em 3 placas contendo Ágar Baird-Parker (Himedia) suplementado com emulsão de ovo e telurito (NewProv), bem como diluições de  $10^{-1}$  a  $10^{-3}$ .

As placas foram incubadas a 35°C por 48h e, posteriormente, os estafilococos foram contados em placas que continham de 20 a 200 colônias. O Test T foi empregado como análise estatística das contagens. Colônias características (pretas ou acinzentadas, apresentando halo de degradação da lecitina) foram selecionadas para o teste da coagulase. Cada colônia foi inoculada em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI - Himedia) e cultivada por 18h a 35°C. As culturas foram submetidas à prova da coagulase, na qual 500 µL de cultura foram adicionados a 500 µL de plasma de coelho reconstituído (NewProv), incubados a 35°C e supervisionados de 30 em 30 minutos durante 6 horas. Para resultados negativos, o ensaio foi prorrogado até 24h de incubação. A formação de coágulo indicou produção da enzima coagulase. As colônias positivas foram estocadas em caldo BHI 20% glicerol a -20°C. Para a reativação bacteriana, uma pequena alíquota da cultura foi inoculada, com auxílio de alça estéril, em BHI e incubada a 35°C por 24 h. As colônias foram utilizadas para os testes bioquímicos e extração de DNA total.

### **3.3 – Provas bioquímicas**

Para identificar bioquimicamente os EcoP isolados, testes bioquímicos foram aplicados de acordo com MacFaddin, 2000. Após a coloração de Gram, o crescimento em Ágar Sal Manitol e o teste da catalase, as espécies foram identificadas como *S. aureus* se elas foram Voges-Proskauer (VP) (VM VP Himedia) positivas e maltose positivas; como *S. schleiferi coagulans* se elas foram VP positivas e maltose negativas; como *S. hyicus* se elas foram VP negativas, trealose positivas e resistentes à Polimixina B (NewProv); como *S. intermedius* se elas foram VP negativas, trealose

positivas e sensíveis à Polimixina B; e como *S. delphini* se elas foram VP negativas e trealose negativas (MacFaddin, 2000).

### **3.3.1 – Ágar Sal Manitol**

Todos os isolados foram semeados em Ágar Sal Manitol (Himedia) e incubados a 35°C por 24h. O crescimento bacteriano foi observado a olho nu, e a utilização do manitol foi verificada através da mudança de coloração do meio para a cor amarela.

### **3.3.2 – Teste da Catalase**

Para detectar a presença da enzima catalase, foi realizado o teste que determina a capacidade da enzima de decompor o peróxido de hidrogênio com formação de água e oxigênio molecular. Uma porção do crescimento bacteriano foi transferida para uma lâmina de vidro, e, posteriormente, uma gota de solução aquosa de peróxido de hidrogênio 3 % (Lifar) foi colocada sob a cultura. A ocorrência de borbulhamento imediato caracterizou o teste positivo.

### **3.3.3 – Teste de Voges-Proskauer (VP)**

Cada colônia foi semeada em 1 mL de caldo Vermelho de Metila - Voges Proskauer (VM-VP Himedia) e incubada a 35°C por 48 horas. Após a incubação, adicionaram-se a cada tubo 3 gotas da Solução I do Reativo de Barritt [Alfa Naftol (6,0 mL), Álcool Etilico 95 % (100 mL q.s.p.)], e agitou-se cada tubo. Acrescentaram-se mais 2 gotas da Solução II do Reativo de Barritt [Hidróxido de potássio (16 mL), água destilada (100 mL q.s.p.)] e agitou-se vigorosamente a solução. Após repouso à temperatura ambiente por 15 minutos, a presença de um anel vermelho na superfície do caldo significou

resultado positivo, que ocorreu devido à produção de acetoína. Sua ausência indicou resultado negativo.

#### **3.3.4 – Teste de fermentação de açúcares**

A utilização de açúcares como fonte de carbono produz quantidades variadas de substâncias orgânicas, dentre as quais se destacam ácidos que alteram o pH do meio de cultura. Para a determinação da capacidade de utilização de manitol e trealose, os isolados foram inoculados em meio contendo 1 mL de água peptonada, 100 µL de indicador de pH [Indicador de Andrade: 5g de Fucsina Ácida, 1 L de água estéril deionizada e 160 mL de NaOH (Synth) 1N] e 0,01 g do açúcar a ser testado. Posteriormente, os tubos foram incubados a 35°C por 24h. A alteração de cor do meio, evidenciando a mudança de pH, indicou fermentação dos referidos carboidratos e produção de ácidos.

#### **3.3.5 – Susceptibilidade à Polimixina B**

O teste de susceptibilidade à Polimixina B (300 µg – NewProv) foi realizado através do método de disco-difusão, assim como os demais testes, e seu método será posteriormente detalhado na sessão 3.4.

#### **3.3.6 – Controle de qualidade das provas de identificação**

Para todas as provas de identificação bioquímicas realizadas, foram utilizados como controles positivos *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e ATCC 19095.

#### **3.4 – Teste de susceptibilidade a antimicrobianos**

A suscetibilidade a antimicrobianos dos isolados foi testada através do método de disco-difusão em ágar (Bauer *et al.*, 1966) o *Clinical and*

*Laboratory Standards Institute* (CLSI) (CLSI, 2011). Foram testados os seguintes antimicrobianos (NewProv): penicilina 10 U, gentamicina 10 µg, clindamicina 2 µg, ciprofloxacina 5 µg, sulfazotrim 25 µg, cefalotina 30 µg, rifampicina 5 µg, cloranfenicol 30 µg, oxacilina 1 µg, vancomicina 30 µg e teicoplanina 30 µg.

As placas de Ágar Müller-Hinton (Himedia) foram semeadas com culturas diluídas a 0,5 na escala McFarland e incubadas a 35°C por 24h com os discos de antimicrobiano (à exceção do teste para oxacilina, que foi realizado em ágar contendo também NaCl e incubado por 18h). Após este período, os halos de inibição foram medidos e interpretados pelas normas do CSLI (2011). A cepa *S. aureus* ATCC 25923 foi utilizada como controle positivo.

O teste de susceptibilidade à vancomicina também incluiu o método de microdiluição, realizado de acordo com o CLSI (2011). Para isto, os isolados foram inoculados em caldo Müller-Hinton contendo concentrações de 512 µg de vancomicina/mL e seguintes diluições 1:1 em microplaca de 96 poços. A menor concentração em que não houve crescimento foi considerada a Concentração Inibitória Mínima (CIM).

### **3.5 – Extração de DNA total**

As extrações foram realizadas de acordo com Fredricks e Helman (1998), com algumas modificações. Uma colônia foi semeada em 5 mL de caldo BHI (Himedia) e incubada sob agitação a 35°C por 18 h. A cultura foi centrifugada por 5 min a 18.000 g e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado 3 vezes com 1 mL de tampão TE-1X [Tris 10 mM

(Invitrogen), EDTA 1 mM (Invitrogen) – pH 7,8], ressuspendido em 200 µL do mesmo tampão e adicionado a 60 µg de Lisozima (Sigma), incubando-se a 37°C por 30 minutos. Então, 200 µL de solução TE<sup>5</sup>N [TE 5x, NaCl (Nuclear) 5M], 100 µg de Proteinase K (USB Corporation) e 20 µL de SDS 1% (Promega) foram adicionados à mistura e incubados a 55°C por 1 hora. Em seguida, 30 µL de NaCl 5M e 400 µL de fenol (Isolar) – clorofórmio (Synth) 1:1 foram adicionados. A mistura foi centrifugada a 14.000 g por 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. Este passo foi repetido três vezes. Então, 400 µL de clorofórmio – álcool isoamílico (Synth) 9:1 foram adicionados à mistura e novamente centrifugados. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e adicionado a 1 mL de etanol absoluto, e mantido a -20°C por 18h. Finalmente, a mistura foi centrifugada a 14000 g por 30 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspendido em 30 µL de TE 1x (Fredricks & Relman, 1998). A quantidade de DNA foi determinada em gel de agarose 0,8 % (Invitrogen) corado com brometo de etídio [0,5 µg/mL (Promega)], comparando-se com quantidades conhecidas de lambda DNA (Fermentas). Para a realização das técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram utilizadas quantidades de, aproximadamente, 20 ng de DNA.

### **3.6 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção do gene da coagulase (*coa*)**

As amostras foram testadas para a presença do gene da coagulase (*coa*) utilizando o par de *primers* descrito na tabela 2 (Hookey *et al.*, 1998).

As reações da PCR foram otimizadas em 25 µL e continham 1 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 10 pmol de cada *primer* (IDT), 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 1 x de tampão (Invitrogen), 200 µM de desoxirribonucleotídeos (ABgene) e água deionizada estéril (Milli Q plus, Millipore). As reações foram amplificadas em Termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf) nas seguintes condições: 5 min a 94°C; seguido por 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 56,7°C e 1 min a 72°C; e 5 min a 72°C. Cepas de *S. aureus* foram gentilmente cedidas pelo Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil e utilizadas como controles positivos (ATCC 13565, ATCC 14458, ATCC 19095, ATCC 23235, ATCC 25923 e ATCC 27664). Os produtos foram analisados por eletroforese em gel de agarose 0.8%.

### **3.7 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção dos genes das enterotoxinas A (*sea*) e D (*sed*)**

As reações foram realizadas segundo Moura e colaboradores, 2012. As amostras foram testadas para a presença dos genes *sea* e *sed* utilizando os pares de *primers* demonstrados na tabela 2. As PCRs foram otimizadas em 25 µL e continham 1 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 10 pmol de cada *primer* (IDT), 1 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 1 x de tampão (Invitrogen), 200 µM de desorriboxinucleotídeos (ABgene) e água deionizada estéril (Milli Q plus, Millipore). As ampliações foram realizadas em Termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf) nas seguintes condições: 5 min a 94°C, 40 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 54°C e 45 s a 72°C, a 5 min a 72°C (Moura *et al.*, 2012).

### **3.8 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) Multiplex para detecção dos genes das enterotoxinas B (*seb*), C (*sec*) e E (*see*)**

As reações foram realizadas segundo Moura e colaboradores, 2012. As amostras foram testadas para a presença dos genes da enterotoxinas B (*seb*), C (*sec*) e E (*see*) utilizando os pares de *primers* demonstrados na tabela 2. As reações da PCR foram otimizadas em 25 µL e continham 3 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 5 pmol de cada *primer* (IDT), 1 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 1 x de tampão (Invitrogen), 300 µM de desoxirribonucleotídeos (ABgene) e água deionizada estéril (Milli Q plus, Millipore). As amplificações foram feitas em Termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf) nas seguintes condições: 5 min a 94°C, 40 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 55°C e 45 s a 72°C, a 5 min a 72°C (Moura *et al.*, 2012). As seguintes cepas foram utilizadas como controle positivo: ATCC 13565 (*sea*), ATCC 14458 (*seb*), ATCC 19095 (*sec*), ATCC 23235 (*sed*) e ATCC 27664 (*see*).

### **3.9 – Eletroforese em gel de agarose**

Os produtos de amplificação por PCR foram analisados por eletroforese em tampão TAE pH 8,0 (40 mM Tris-HCl, 20 mM acetato de sódio, 1 mM EDTA) em gel de agarose 1,5 % (Invitrogen) corado com brometo de etídio [0,5 µg/mL (Promega)], comparando-se com marcador molecular de 50 pb e 100 pb Ladder (Invitrogen).

### **3.10 – Detecção dos genes *vanA*, *vanB*, *vanC1* e *vanC2/3***

As PCRs para a detecção do gene *vanB* foram realizadas segundo Depardieu e colaboradores (Depardieu *et al.*, 2004). As PCRs para a detecção dos genes *vanC1* e *vanA* foram realizadas segundo Dutkamalen e

colaboradores (Dutkamalen *et al.*, 1995), enquanto *vanC2/3* foi detectado de acordo com Satake e colaboradores (Satake *et al.*, 1997). Os *primers* estão descritos na tabela 2.

Algumas modificações foram empregadas. As reações dos genes *vanA* e *vanB* foram otimizadas em 25 µL e continham 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 10 pmol de cada *primer* (IDT), 1U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), tampão da *Taq* DNA Polimerase 1x (Invitrogen), 200 µM de desoxirribonucleotídeos (ABgene) e água deionizada estéril (Milli Q plus, Millipore). As amplificações foram feitas em Termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf) nas seguintes condições: 3 min a 94°C, 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 50°C e 1 min a 72°C, e 7 min a 72°C.

As reações dos genes *vanC1* e *vanC2/3* foram otimizadas em 25 µL e continham 1mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 10 pmol de cada *primer* (IDT), 1U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), tampão da *Taq* DNA Polimerase 1x (Invitrogen), 200 µM de desoxirribonucleotídeos (ABgene) e água deionizada estéril (Milli Q plus, Millipore). As amplificações foram incubadas em Termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf) nas seguintes condições: 5 min a 94°C, 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 54°C e 1 min a 72°C, e 10 min a 72°C. Todos os produtos foram analisados em gel de agarose 1%.

### **3.11 – Detecção de *S. aureus* resistentes à meticilina**

As PCRs para a identificação de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) foram realizadas de acordo com Forsman e colaboradores (Forsman *et al.*, 1997). Os *primers* utilizados estão descritos na tabela 2. As reações foram otimizadas em 25 µL e continham 1 mM MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen), 10 pmol de

cada *primer* (IDT), 1U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen), tampão da *Taq* DNA Polimerase 1x (Invitrogen), 200 µM de desoxirribonucleotídeos (ABgene) e água deionizada estéril (Milli Q plus, Millipore). As ampliações foram feitas em Termociclador Mastercycler Personal (Eppendorf) nas seguintes condições: 5 min a 94°C, 30 ciclos de 45 s a 94°C, 45 s a 50°C e 45 s a 72°C, a 5 min a 72°C. Os produtos foram analisados em gel de agarose 1% e ATCC 25923 foi utilizada como controle.

**TABELA 2.** Descrição dos *primers*, temperaturas de anelamento e tamanho dos produtos relativos aos ensaios de PCR.

<i>Primers</i>	Sequência Nucleotídica (5' - 3')	Temperatura de Anelamento	Tamanho do Produto	Referência
COA <sup>a</sup>	ATA GAG ATG CTG GTA CAG G GCT TCC GAT TGT TCG ATG C	56.7 °C	840 bp	Hookey et al., 1998
SEA <sup>b</sup>	CCT TTG GAA ACG GTT AAA ACG CTG AAC CTT CCC ATC AAA AAC	54 °C	126 bp	Moura et al., 2012
SEB <sup>c</sup>	GGT ACT CTA TAA GTG CCT GC TTC GCA TCA AAC TGA CAA ACG	55 °C	475 bp	Moura et al., 2012
SEC <sup>d</sup>	AGA ACT AGA CAT AAA AGC TAG G TCA AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC	55 °C	267 bp	Moura et al., 2012
SED <sup>e</sup>	TTT GGT AAT ATC TCC TTT AAA CG CTA TAT CTT ATA GGG TAA ACA TC	54 °C	309 bp	Moura et al., 2012
SEE <sup>f</sup>	CCT ATA GAT AAA GTT AAA ACA AGC TAA CTT ACC GTG GAC CCT TC	55°C	173 bp	Moura et al., 2012
VANA <sup>g</sup>	GGG AAA ACG ACA ATT GC GTA CAA TGC GGC CGT TA	50 °C	732 bp	Dutka Malen et al., 1995
VANB <sup>h</sup>	ACG GAA TGG GAA GCC GA TGC ACC CGA TTT CGT TC	50 °C	647 bp	Depardieu et al., 2004
VANC1 <sup>i</sup>	GGT ATC AAG GAA ACC TC CTT CCG CCA TCA TAG CT	54 °C	822 bp	Dutka Malen et al., 1995
VANC2/3 <sup>j</sup>	CGG GGA AGA TGG CAG TAT CGC AGG GAC GGT GAT TTT	54 °C	484 bp	Satake et al., 1997
MRSA <sup>l</sup>	TCT TCA GAA GAT GCG GAA TA TAA GTC AAA CGT TAA CAT ACG	50 °C	416 bp	Forsman et al., 1997

a: coagulase; b: enterotoxina estafilocócica A; c: enterotoxina estafilocócica B; d: enterotoxina estafilocócica C; e: enterotoxina estafilocócica D; f: enterotoxina estafilocócica E; g: gene de resistência à vancomicina A; h: gene de resistência à vancomicina B; i: gene de resistência à vancomicina C1 ; j: gene de resistência à vancomicina C2/3; l: *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1 – Contagens estafilocócicas**

As contagens de estafilococos totais estão apresentadas na tabela 3. A média das contagens dos frangos congelados foi menor ( $3,48 \times 10^2$  UFC/g com um desvio padrão de  $2,95 \times 10^2$ ), quando comparada à média das contagens dos frangos resfriados ( $5,31 \times 10^3$  UFC/g com um desvio padrão de  $5,67 \times 10^3$ ) (Test T,  $p < 0.01$ ). Esta variação já era esperada, uma vez que amostras de frangos utilizadas no estudo foram adquiridas em mercados distintos e pertenciam a 13 marcas diferentes. Outro ponto a ser observado é que os frangos, certamente, provieram de criadores de diversas regiões do estado e recebiam rações e tratamentos diferentes.

**TABELA 3.** Contagens de estafilococos totais em amostras carne de frango congelada e resfriada.

Frangos Congelados	Contagens (UFC/g)	Frangos Resfriados	Contagens (UFC/g)
1	5.00x10 <sup>1</sup>	4	5.92x10 <sup>3</sup>
2	2.00x10 <sup>2</sup>	5	9.90x10 <sup>2</sup>
3	1.60x10 <sup>2</sup>	6	1.70x10 <sup>2</sup>
11	1.00x10 <sup>2</sup>	7	1.90x10 <sup>4</sup>
12	5.00x10 <sup>1</sup>	8	1.05x10 <sup>3</sup>
14	1.00x10 <sup>1</sup>	9	0
15	8.00x10 <sup>2</sup>	10	1.70x10 <sup>3</sup>
17	7.00x10 <sup>2</sup>	13	8.00x10 <sup>1</sup>
18	5.00x10 <sup>1</sup>	16	3.20x10 <sup>2</sup>
19	2.80x10 <sup>2</sup>	22	6.10x10 <sup>4</sup>
20	1.40x10 <sup>2</sup>	23	2.50x10 <sup>3</sup>
21	1.00x10 <sup>2</sup>	24	3.00x10 <sup>2</sup>
28	5.00x10 <sup>2</sup>	25	1.00x10 <sup>4</sup>
29	8.00x10 <sup>2</sup>	26	4.00x10 <sup>3</sup>
30	0	27	1.00x10 <sup>4</sup>

#### 4.2 – Isolamento de Estafilococos Coagulase Positivos (EcoP)

Ao total, 50 EcoP foram isolados, e, destes, somente dois não foram positivos para a PCR do gene *coa*. Foi possível isolar EcoP de 66.7% das amostras de carne de frango, e um máximo de 6 EcoP foram selecionados para cada amostra de frango. Todos isolados cresceram e apresentaram coloração amarela em Ágar Sal Manitol.

#### 4.3 – Identificação bioquímica

De acordo com os resultados dos testes bioquímicos, os EcoP foram identificados como cinco espécies: 31 (62%) *S. aureus aureus*, 5 (10%) *S. intermedius*, 5 (10%) *S. delphini*, 4 (8%) *S. schleiferi* subsp. *coagulans* e 4 (8%) *S. hyicus*. *S. aureus* foi a espécie mais prevalente tanto em frangos congelados quanto em frangos resfriados. Sua distribuição foi homogênea: 15 foram isolados de frangos congelados e, 17, de resfriados.

#### 4.4 – Enterotoxinas estafilocócicas

Com exceção de *see*, todos os outros genes de enterotoxinas foram encontrados dentre os isolados. O gene *sea* foi o mais prevalente, estando presente em 64% dos isolados, seguido de *sed* (26%), *seb* (6%) e *sec* (4%). Um mesmo isolado apresentou até três genes de SEs, e 70% dos estafilococos carregavam pelo menos um gene de SE. A tabela 4 apresenta a distribuição de genes dentre as espécies de EcoP. Dos 50 isolados, 19 (38%) apresentaram somente o gene *sea*, 1 (2%) *sec* e 2 (4%) *sed*. Nove isolados (18%) apresentaram os genes *sea* e *sed* e 2 (4%) *sea* e *seb*. Um *S. aureus* (2%) continha *sea*, *sec* e *sed* e um *S. hyicus* (2%) continha *sea*, *seb* e *sed*. Enquanto *sea* esteve distribuído homogeneamente dentre todas as espécies, *seb* foi encontrado somente em *S. hyicus* e *S. delphini*, *sec* apenas em *S. aureus* e *S. intermedius* e *sed* em todos os estafilococos exceto *S. delphini*. Tanto para frangos resfriados quanto para congelados, o gene mais prevalente foi *sea*.

**TABELA 4.** Prevalência de genes de enterotoxinas estafilocócicas dentre espécies de EcoP em carnes de frango congeladas e resfriadas.

Frangos	Espécies de EcoP	Genes de Enterotoxinas							Nenhuma
		a	c	d	ab	ad	abd	acd	
Congelados	<i>S. aureus</i>	10	-	2	-	2	-	-	1
	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	-	-	-	-	2	-	-	1
	<i>S. delphini</i>	-	-	-	2	-	-	-	1
	<i>S. intermedius</i>	-	-	-	-	1	-	-	-
	<i>S. aureus</i>	5	-	-	-	2	-	1	9
Resfriados	<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	-	-	-	-	1	-	-	-
	<i>S. hyicus</i>	-	-	-	-	1	1	-	2
	<i>S. delphini</i>	1	-	-	-	-	-	-	1
	<i>S. intermedius</i>	3	1	-	-	-	-	-	-

a: gene *sea*; b: gene *seb*; c: gene *sec*; d: gene *sed*.

#### 4.5 – Resistência a antimicrobianos

A tabela 5 apresenta o perfil de resistência dos isolados encontrado para cada antimicrobiano. Uma elevada frequência de isolados resistentes à penicilina (72%), teicoplanina (30%), oxacilina (18%) e clindamicina (16%) foi observada. Outros níveis de resistência ficaram abaixo de 8%, mas pelo menos um isolado apresentou resistência a cada antimicrobiano testado. Em parâmetros gerais, 20% dos isolados foram susceptíveis a todos os antimicrobianos, 28% a duas classes e 12% a 3, 4 ou 5 classes. Isolados resistentes a duas ou mais classes foram classificados como multirresistentes e totalizaram 40%.

**TABELA 5.** Perfil de resistência dos EcoP isolados de carne de frango.

Espécies	Número de EcoP resistentes por antimicrobiano											
	PEN	GEN	CLI	CIP	SUT	CFL	RIF	CLO	OXA	VAN	TEC	Nenhum
<i>S. aureus</i> (n = 31)	27	-	5	1	1	1	2	1	3	1	10	3
<i>S. delphini</i> (n= 5)	2	-	-	-	1	-	-	-	2	-	-	3
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i> (n = 5)	2	-	-	-	2	-	-	-	2	-	-	2
<i>S. intermedius</i> (n = 5)	2	2	3	-	-	-	1	-	2	2	2	2
<i>S. hyicus</i> (n = 4)	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-
Total (%)	36 (72)	2 (4)	8 (16)	1 (2)	4 (8)	1 (2)	3 (6)	1 (2)	9 (18)	3 (6)	15 (30)	10 (20)

PEN: penicilina 10 UI; GEN: gentamicina 10µg; CLI: clindamicina 2 µg; CIP: ciprofloxacina 5 µg; SUT: trimetoprim – sulfametoxazol 25 µg; CFL: cefalotina 30 µg; RIF: rifampicina 5 µg; CLO: cloranfenicol 30 µg; OXA: oxacilina 1 µg; VAN: vancomicina 30 µg; TEC: teicoplanina 30 µg.

Avaliando-se o perfil de susceptibilidade por espécie, os isolados de *S. aureus* foram susceptíveis apenas à gentamicina, e *S. intermedius* apresentou resistência à penicilina, gentamicina, clindamicina, rifampicina,

oxacilina, vancomicina e teicoplanina. *S. delphini* e *S. schleiferi* subsp. *coagulans* foram resistentes somente à penicilina, oxacilina e trimetoprim-sulfametoxazol, enquanto *S. hyicus* foram resistentes à penicilina e teicoplanina. Nove isolados foram resistentes à oxacilina: 2 *S. delphini*, 2 *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, 2 *S. intermedius*, e 3 *S. aureus*. O isolado número 3 da amostra de frango número 27 foi positivo para a PCR da identificação de MRSA.

A frequência de isolados resistentes à teicoplanina encontrada no presente estudo foi bastante elevada (30%). Dentre os 15 isolados resistentes, 5 não apresentaram nenhum halo de inibição e 10 apresentaram halo de 13 mm, sendo classificados como resistentes intermediários.

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para a vancomicina, os dois *S. intermedius* resistentes à vancomicina (VRSI) e um MRSA, todos isolados de frangos resfriados e resistentes à vancomicina através da técnica de disco-difusão, foram submetidos ao método de microdiluição em caldo. Os isolados VRSI apresentaram CIM de 54 µg de vancomicina/mL, e o VRSA apresentou CIM de 512 µg/mL. Isolados cuja CIM para vancomicina é igual ou superior a 4 µg/mL são considerados resistentes.

Estes isolados foram testados por PCR para a presença dos genes *van*. Os três estafilococos resistentes à vancomicina carregavam os genes *vanA*, *vanB* e *vanC2/3*. Nenhum isolado foi positivo para *vanC1*.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 – Contagens e Isolamento

Uma vez que não há legislação estabelecida para a contagem de EcoP em carnes de aves congeladas ou resfriadas *in natura*, toma-se como referência os produtos cárneos que já são regulamentados pela ANVISA. Por exemplo, o limite de EcoP é  $5 \times 10^3$  UFC/g para os itens 5f [produtos cárneos crus, refrigerados ou congelados (hambúrgueres, almôndegas, quibe e similares); produtos a base de sangue e derivados "*in natura*"; embutidos frescais (linguiças cruas e similares)], 5j [produtos cárneos cozidos ou não, maturados ou não, fracionados ou fatiados, mantidos sob refrigeração] e 5l [produtos cárneos maturados (presuntos crus, copas, salames, linguiças dessecadas, charque, "jerked beef" e similares)]. Já o limite  $3 \times 10^3$  UFC/g aplica-se aos itens 5g [carnes embaladas a vácuo, maturadas], 5h [carnes embaladas a vácuo, não maturadas], 5i [produtos cárneos cozidos ou não, embutidos ou não (mortadela, salsicha, presunto, fiambre, morcela e outros); produtos a base de sangue e derivados, processados] e 5o [gorduras e produtos gordurosos de origem animal (toucinho, banha, peles, bacon e similares)]. Um limite menor, de  $10^3$  UFC/g, é estabelecido para o item 5n [produtos cárneos salgados (lombo, pés, rabo, orelhas e similares, carne seca e similares)], e o menor limite de todos é  $5 \times 10^2$  UFC/g para o item 5m [semi

conservas em embalagens herméticas mantidas sob refrigeração (patês, galantines e similares)].

Se o limite de  $5 \times 10^2$  UFC/g for tomado como padrão, nota-se que contagens superiores a esta são encontradas em 3 frangos congelados e 10 frangos resfriados, totalizando 13 de 30 amostras analisadas. Já se o limite  $5 \times 10^3$  UFC/g for adotado, 4 frangos resfriados apresentam contagens superiores a esta. Um estudo demonstrou que baixas temperaturas são eficientes para inibir o crescimento microbiano em carne de frango, e que, quanto mais baixa a temperatura, maior a inibição (Al-Jasser, 2012).

Das placas de contagem, colônias características foram testadas para a atividade da enzima coagulase e presença do gene *coa*. Ao total, 50 isolados foram positivos para a atividade da enzima e, destes, 48 apresentaram o gene. A ausência de amplicom pode ser causada tanto por mutações na região de anelamento do *primer* quanto pela presença de pseudocoagulases, proteases que também podem iniciar a coagulação e determinar falsos positivos (Chomarat & Flandrois, 1984) (Bulanda *et al.*, 1988). Moura e colaboradores (2012) também encontraram estafilococos positivos para o fenótipo e negativos para o genótipo dessa enzima (Moura *et al.*, 2012).

## **5.2 – Identificação bioquímica**

As espécies observadas no presente estudo são habitantes naturais da pele e mucosa de animais. No presente estudo foram identificadas 62% de *S. aureus aureus*, 10% *S. intermedius*, 10% *S. delphini*, 8% *S. schleiferi coagulans* e 8% *S. hyicus* em amostras de frangos congelados e resfriados. Outros autores encontraram resultados similares aos deste estudo. No estudo

realizado por Aarestrup e colaboradores (2000), as espécies mais prevalentes foram *S. aureus* (70,3%) e *S. hyicus* (9,3%), as quais foram isoladas de infecções em frangos na Dinamarca (Aarestrup *et al.*, 2000). Citak e colaboradores (2011) averiguaram que 47,2% dos 195 isolados de amostras de carne de frango crua na Turquia eram *S. aureus* (Citak & Duman, 2011). Altay e colaboradores (2003) isolaram 46 EcoP de frangos na Turquia. Dentre eles, 60,9 % eram *S. aureus*, 19,6% eram *S. delphini*, 6,5% eram *S. intermedius*, 4,3% eram *S. aureus anaerobius*, 2,2% eram *S. schleiferi coagulans*, 2,2% eram *S. hyicus* e 4,3% não foram identificados (Altay *et al.*, 2003). Por outro lado, Nagase e colaboradores (2002) encontraram apenas 2,73% de *S. aureus* em amostras de pele de galinha no Japão (Nagase *et al.*, 2002).

A presença de *S. aureus* em carne de aves pode significar contaminação por manipuladores durante o processamento da carne. Um estudo relatou que *S. aureus* isolados de IAE, de carreadores nasais saudáveis e de amostras de infecção compartilhavam a mesma Proteína Estafilocócica tipo A, indicando possível origem comum (Wattinger *et al.*, 2012). Acco e colaboradores (2003) verificaram que *S. aureus* coloniza a mucosa nasal de 30% dos manipuladores de alimentos investigados (Acco *et al.*, 2003). Além disso, outro estudo verificou que a fonte da contaminação por *S. aureus* na produção de alheira estava relacionada aos procedimentos de manipulação do alimento (Esteves *et al.*, 2007).

*S. aureus* causa diversas doenças em aves, tais como artrite e sinovite, pododermatite, osteomielite e dermatite. Feridas acidentais e intervenções, como por exemplo, corte do bico e das unhas, podem fornecer

um portão de entrada para as bactérias atingirem a corrente sanguínea (McMullin, 2004).

Poucos estudos relataram a presença de outras espécies de EcoP, tais como *S. intermedius*, *S. delphini*, *S. schleiferi coagulans* e *S. hyicus* em carne de frango e o seu papel. *S. intermedius* é um patógeno zoonótico, embora seja raramente associado com infecções humanas (Kelesidis & Tsiodras, 2010) (Hatch *et al.*, 2012), sendo frequentemente descrito como produtor de toxina esfoliativa. Estudos realizados com *S. intermedius* isolados de cães observaram que as cepas produziram toxina esfoliativa capaz de causar esfoliação em frangos com um dia de vida (Terauchi *et al.*, 2003) (Lautz *et al.*, 2006) (Mustak & Esendal, 2010). *S. delphini* foi o agente causador de diarreia em visons de criação devida à colonização seguida de produção de enterotoxinas. De 36.000 animais, 5.000 foram infectados e 2.000 morreram (Sledge *et al.*, 2010). *S. schleiferi coagulans* é comumente associado com pioderma e otite externa em cães, e, mais raramente, com infecções em humanos (May *et al.*, 2005) (Kumar, *et al.*, 2007) (Khanal *et al.*, 2011). Parece ser parte minoritária da microbiota natural de frangos, possivelmente porque frangos são muitas vezes criados em contato direto ou indireto com cães. *S. hyicus* tem sido associado com a produção de toxina esfoliativa e infecções epidérmicas em galinhas poedeiras (Andresen, 2005) (Onuma *et al.*, 2011) (Chenier & Lallier, 2012).

### 5.3 – Enterotoxinas estafilocócicas

Genes codificadores de SEs foram encontrados em 70% dos 50 isolados e os mais encontrados foram *sea* (68%) e *sed* (26%). A prevalência dos genes das enterotoxinas estafilocócica observada no presente estudo está de acordo com a literatura para amostras de frangos e outros alimentos. Na Turquia, um estudo revelou a prevalência de 62,6% de genes para SEs em *S. aureus* isolados de carnes (incluindo carne de frango), produtos cárneos, leite cru, produtos lácteos, produtos de padaria e alimentos prontos para se comer. Os genes *sea* e *sec* foram os mais prevalentes dentre as enterotoxinas clássicas (Aydin *et al.*, 2011). Altas prevalências de genes de SEs em *S. aureus* têm sido relatadas com bastante frequência: 60,1%, 67%, 68.4% e 69%, sendo *sea* o gene mais prevalente nos últimos dois estudos. (Güven *et al.*, 2010) (Morandi *et al.*, 2007) (Rall *et al.*, 2008) (Pereira *et al.*, 2009)

É amplamente aceito que a produção de enterotoxinas estafilocócicas (SEs) é uma característica do grupo ECoP e muitos trabalhos são realizados avaliando a espécie *S. aureus* em alimentos ou matérias-primas. Kitai e colaboradores (2005) analisaram a presença dos genes *se* em *S. aureus* isolados de carne de frango crua de varejo no Japão. Dentre os 360 isolados testados, 21,7% carregavam ao menos um gene codificador de enterotoxinas: 17,9% *sea*, 64,1% *seb*, 10,3% *sec*, 2,6% *sed*, 2,6% *sea* e *seb* e 2,6% *sea* e *sec* (Kitai *et al.*, 2005). Outro estudo comparou a presença de genes de SEs entre bactérias de amostras de alimentos e de seres humanos. Dezoito por cento dos *S. aureus* isolados de carne de porco picada, bife e carne carregavam SEs. Já em relação aos isolados de seres humanos, 36%

dos *S. aureus* recuperados de suabes nasofaríngeos eram enterotoxigênicos, assim como 59% dos *S. aureus* recuperados de suabes fecais. A prevalência de genes de SEs entre todos os isolados do estudo foi 37%, sendo os genes mais incidentes *sec* (45%) e *sea* (40%), seguidos por *sed* (16%) e *seb* (12%). Somente um *S. aureus* isolado de fezes apresentou o gene *see* (Bystron *et al.*, 2005).

Entretanto, baixas frequências de genes de SEs em *S. aureus* já foram também encontradas. Um estudo sobre *S. aureus* enterotoxigênicos isolados de queijo de leite de cabra e sobremesas lácteas encontrou que somente 3,02% dos isolados de *S. aureus* carregavam pelo menos um gene de SEs (Ertas *et al.*, 2010). Moura e colaboradores (2012) observaram que 30% dos estafilococos coagulase positivos isolados de morcilha eram enterotoxigênicos. Hazariwala e colaboradores (2002) isolaram *S. aureus* de humanos e aves com doença estafilocócica. De 34 isolados de artrite aviária, apenas um carreador de *sec* foi encontrado, enquanto 51% dos 41 isolados de humanos eram enterotoxigênicos. A prevalência de genes de SEs foi 24,4% para *sed*, 22% para *sec*, 12,2% para *sea*, 2,4% para *seb* e 0% para *see* (Hazariwala *et al.*, 2002).

O presente estudo foi o primeiro trabalho a avaliar a prevalência de genes de enterotoxinas em espécies de EcoP não *S. aureus* isolados de carne de frango crua e industrializada. A capacidade enterotoxigênica de *S. intermedius* e *S. hyicus* já era conhecida. *S. intermedius* foi responsável por um surto de intoxicação alimentar nos Estados Unidos e *S. hyicus* foi capaz de induzir atividade emética em macacos (Khambaty *et al.*, 1994) (Adesiyun *et al.*,

1984). Um estudo relatou que *S. schleiferi* subsp. *coagulans* isolado de mastite bovina e ovina não era enterotoxigênico (Almeida, 2009). Já quanto a *S. delphini*, o único relato de enterotoxicidade é o acima mencionado (Sledge *et al.*, 2010).

#### **5.4 – Perfil de susceptibilidade dos isolados aos antimicrobianos**

Em uma análise geral, 80% dos isolados foram resistentes a pelo menos uma classe de antimicrobianos, e 40% foram classificados como multirresistentes. Os maiores níveis de resistência foram aqueles para penicilina, teicoplanina, oxacilina e clindamicina.

Resultados similares aos encontrados no presente estudo foram relatados por Pu e colaboradores. Dos *S. aureus* recuperados de amostras de porco e bife de varejo, 71% eram resistentes à penicilina, 18% à clindamicina, 14% à oxacilina, 13% à ciprofloxacina, 3% à gentamicina e 2% ao cloranfenicol. Todos foram sensíveis à rifampicina, sulfazotrim e vancomicina, e todos os 22 MRSA eram multidroga resistentes (Pu *et al.*, 2011). Apesar de a alta resistência à teicoplanina encontrada no presente estudo chamar a atenção, este não é o primeiro relato de tal nível de resistência em estafilococos isolados de alimentos. Guven e colaboradores pesquisaram durante dois anos *S. aureus* em carnes e produtos derivados do leite na Turquia. Dos 138 isolados, 44.2% eram resistentes à teicoplanina (Guyen *et al.*, 2010).

Por outro lado, resultados diferentes a estes foram descritos por Aarestrup e colaboradores (2000). Em seu trabalho, todos os estafilococos isolados de aves foram sensíveis à oxacilina, vancomicina e trimetoprim. Em

relação aos *S. aureus* deste trabalho, 7,2% eram resistentes à penicilina, 19% a sulfametoxazol e 30% à ciprofloxacina (Aarestrup *et al.*, 2000). Estes dados refletem uma realidade preocupante a nível global: níveis cada vez maiores de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos (Gould, 2008).

Este estudo identificou apenas um MRSA dentre os *S. aureus*. Em alimentos, bactérias resistentes têm sido frequentemente encontradas (Valsangiacomo *et al.*, 2000) e espécimes resistentes em alimentos, especialmente MRSA, representam riscos à segurança por vários motivos. Primeiramente, bactérias resistentes em alimentos podem causar doenças diretamente. Um caso de MRSA adquirido na comunidade via alimento foi relatado por Kluytmans e colaboradores (1995). Um paciente hospitalizado ingeriu uma banana contaminada com MRSA proveniente da pessoa que preparava as refeições (Kluytmans *et al.*, 1995). Outro caso de MRSA veiculado por alimento foi um surto resultante da ingestão de carne de porco assada contaminada também pelo manipulador do alimento (Jones *et al.*, 2002). Em segundo lugar, alimentos podem servir como reservatório de bactérias resistentes. Gundogan e colaboradores analisaram amostras de carne crua de bezerro e cordeiro e partes de frango. Dos 80 *S. aureus* isolados em seu estudo, 67,5% foram resistentes à meticilina, 53,8% à penicilina e 87,5% à bacitracina (Gundogan *et al.*, 2005). Em terceiro lugar, bactérias não patogênicas podem transferir genes de resistência a bactérias patogênicas e oportunistas (Sorum & L'abee-Lund, 2002). Nawaz e colaboradores sugeriram que a transferência de determinantes genéticos da resistência à eritromicina de estafilococos de aves para os de humanos é possível (Nawaz *et al.*, 2000).

Comparando-se os resultados deste estudo com o de outros autores, nota-se que a frequência de isolamento de MRSA em alimentos é baixa, mas muito significativa, pois estes são geralmente multirresistentes. Resultados similares aos descritos neste estudo foram descritos por Lee e colaboradores, que encontraram apenas 8 MRSA dentre 133 *S. aureus* isolados de carnes cruas. Oitenta por cento dos 133 isolados eram resistentes à oxacilina, 4% à teicoplanina e 11% à gentamicina, e todos eram sensíveis à vancomicina e ciprofloxacina (Lee *et al.*, 2008). Pereira e colaboradores encontraram apenas um MRSA dentre 147 *S. aureus* isolados de carnes cruas, produtos cárneos fermentados, leite cru e outros alimentos. Enquanto a resistência à vancomicina e ciprofloxacina não foi encontrada, 73% dos isolados eram resistentes à penicilina, 38% à oxacilina, 8% à gentamicina, 14.2% ao cloranfenicol e 0.7% à rifampicina (Pereira *et al.*, 2009).

Um isolado VRSA e dois VRSI foram identificados no presente estudo. A vancomicina ainda é o fármaco de escolha para o tratamento de cocos Gram-positivos resistentes, e seu uso contínuo têm levado à emergência de *S. aureus* resistentes aos glicopeptídeos (SARG) (Foucault *et al.*, 2009). A presença de VRSA e VRSI chama a atenção para a disseminação de genes de resistência à vancomicina e de determinantes genéticos de outras resistências, assim como para a disseminação de bactérias potencialmente patogênicas. Alimentos de origem animal podem carregar bactérias resistentes desde o processo de criação dos animais ou podem ser contaminados por manipuladores de alimentos durante o seu processamento (Persoons *et al.*, 2009) (Acco *et al.*, 2003).

Todos os isolados resistentes à vancomicina foram positivos para a presença dos genes *vanA*, *vanB* e *vanC2/3*. Este é o primeiro estudo que identificou um VRSA carreador dos genes *vanA*, *vanB* e *vanC2/3* em alimentos. Este isolado foi resistente também à penicilina, oxacilina, clindamicina, rifampicina, cefalotina e teicoplanina e não foi positivo para nenhum dos genes de enterotoxinas clássicas. MRSA representam um desafio para as frequentes infecções nosocomiais por *S. aureus*, e a resistência à vancomicina torna este cenário ainda mais sério (Boucher *et al.*, 2010). Este foi também o primeiro estudo que identificou *S. intermedius* resistentes à vancomicina (VRSI), os quais foram positivos para os genes *vanA*, *vanB* e *vanC2/3*. Os dois VRSI carream o gene para enterotoxina *sea* e apresentaram também resistência à penicilina, gentamicina, clindamicina, oxacilina e teicoplanina, diferindo somente quanto à resistência à rifampicina.

A presença de *vanA* em estafilococos tem sido relacionada com enterococos resistentes à vancomicina (VRE). Estudos observaram que a sequência de DNA do gene *vanA* de VRSA era idêntica à de uma cepa de *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina (Weigel *et al.*, 2003). Além disso, a transferência de *vanA* de enterococos para estafilococos foi comprovada *in vitro* (De Niederhausen *et al.*, 2011).

Existem 11 casos bem relatados de VRSA no ambiente hospitalar que adquiriram *vanA* de *Enterococcus*: 9 nos Estados Unidos (Sievert *et al.*, 2008) (Finks *et al.*, 2009), um na Índia e um no Irã (Saha *et al.*, 2008) (Aligholi *et al.*, 2008). Mais recentemente, outros casos foram relatados na Pensilvânia, na Arábia Saudita e no Irã. (Herriman, 2010) (Alzoliban *et al.*, 2012) (Dezfulian

*et al.*, 2012). O achado de um VRSA em alimentos pode indicar a disseminação de tais micro-organismos e / ou a transferência de material genético fora das fronteiras hospitalares.

Alguns grupos de pesquisa desenvolveram ensaios de PCR para a identificação dos genes *vanB* e *vanC* em estafilococos (Depardieu *et al.*, 2004). Contudo, até o presente momento, tais genes haviam sido identificados somente em enterococos, de forma que este é o primeiro estudo a identificá-los em *S. aureus* e *S. intermedius*. Consta no primeiro relato de estafilococos resistentes à vancomicina em carreadores saudáveis no Brasil que nenhum isolado portava os genes *vanA*, *vanB* e *vanC* e que, portanto, o mecanismo de resistência poderia ser o de espessamento da parede celular (Palazzo *et al.*, 2005).

A presença e a disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos em frangos de corte podem ocorrer devido ao uso de antimicrobianos para terapia e promoção de crescimento na criação de frangos (Butaye *et al.*, 2003). Por exemplo, a utilização da avoparcina e a sua completa resistência cruzada com vancomicina e resistência cruzada parcial com teicoplanina levou à emergência de Enterococos Resistentes a Glicopeptídeos (ERG) na Europa (Bates, 1997). No Brasil, a ANVISA publicou um documento relatando que, em relação a salmonelas e enterococos isolados de carnes de frango congeladas e resfriadas, a resistência cruzada entre drogas de uso veterinário exclusivo e drogas utilizadas em seres humanos indica o emprego de antiimicrobianos na criação de frangos com propósitos terapêuticos ou profiláticos, ou como promotores de crescimento (ANVISA, 2008b). Uma

pesquisa sobre a aplicação e o comércio de drogas veterinárias na criação frangos de corte no estado do Paraná demonstrou que tetraciclinas, olaquinox, penicilinas e sulfonamidas haviam sido utilizadas, mesmo que todas essas drogas sejam proibidas pelo Ministério da Agricultura (Paraná, 2005). Interessantemente, níveis elevados de portadores de MRSA têm sido relatados dentre fazendeiros que trabalham com aves e trabalhadores de abatedouros de aves (Van Den Broek *et al.*, 2009) (Mulders *et al.*, 2010).

EcoP de carne de frango crua podem representar riscos à segurança em termos de saúde pública, uma vez que uma alta prevalência de genes de SEs e altos níveis de resistência a antimicrobianos foram encontrados. Os resultados observados neste estudo sugerem que não apenas *S. aureus* receba atenção de autoridades de saúde pública, mas também outras espécies de EcoP. Muitos estudos não discernem adequadamente *S. aureus* de outras espécies de EcoP porque utilizam como parâmetros de identificação de *S. aureus* somente testes aos quais todas as espécies de EcoP são positivas, como o crescimento em ágar Sal manitol ou Baird-Parker, produção de catalase, DNase e coagulase (Sasaki *et al.*, 2010). Por isso, questiona-se se problemas de segurança em relação a outras espécies de EcoP têm sido subestimados devido à atribuição errônea de genes de SEs, resistência a antimicrobianos e fatores de virulência a *S. aureus*.

Portanto, preconiza-se que mais estudos sejam realizados a fim de identificarem-se riscos relacionados a estafilococos em alimentos, estabelecerem-se limites máximos de EcoP em carne de frango no Brasil e compreenderem-se a dinâmica e os mecanismos de transferência de material

genético entre EcoP, assim como evitar a disseminação de estafilococos enterotoxigênicos e resistentes a antimicrobianos. Também serão necessários estudos para se garantir a segurança de alimentos, especialmente tratando-se de alimentos de origem animal. Sugere-se, além disso, uma identificação de EcoP mais profunda a nível de espécie.

## 6. CONCLUSÕES

No presente estudo, foi possível observar as contagens de estafilococos em amostras de carne de frango congelada e resfriada. Estas contagens demonstram que os estafilococos estão abundantemente presentes nas amostras de carne de frango analisadas. Também foi possível isolar EcoP e identificá-los a nível de espécie. Dentre os 50 isolados, cinco espécies foram identificadas através de testes bioquímicos: *S. aureus*, *S. hyicus*, *S. delphini*, *S. intermedius* e *S. schleiferi* subsp. *coagulans*.

A técnica de PCR foi uma ferramenta precisa para a avaliação da prevalência de SEs dentre os isolados. As reações de PCR multiplex foram especialmente úteis na identificação rápida destes genes, pois, em uma mesma reação, três genes foram avaliados. Uma alta prevalência de genes de enterotoxinas clássicas foi encontrada neste estudo, em que se destacaram os genes *sea* e *sed*.

A avaliação do perfil de resistência dos isolados a onze antimicrobianos foi satisfatória. Uma alta frequência de isolados resistentes à penicilina, oxacilina, clindamicina e teicoplanina foi averiguada. O teste de microdiluição em caldo para a determinação do CIM da vancomicina confirmou a resistência a este antimicrobiano e forneceu valores específicos para esta resistência.

## **7. PERSPECTIVAS**

Aumentar o número de amostras de carne de frango para que conclusões mais robustas possam servir como base para alteração na legislação;

Avaliar a expressão dos genes de enterotoxinas através da técnica de PCR quantitativo, e assim, demonstrar que os isolados enterotoxigênicos estafilococos coagulase positivos não *S. aureus* podem também ser considerados patógenos alimentares.

Levar as informações obtidas neste estudo às autoridades sanitárias para que sejam reavaliados os padrões de legislação para alimentos vigentes no Brasil em relação à carne de frango e aos estafilococos coagulase positivos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F.M.; AGERSO, Y.; AHRENS, P.; JORGENSEN, J.C.O.; MADSEN, M.; JENSEN, L. B. Antimicrobial susceptibility and presence of resistance genes in staphylococci from poultry. **Veterinary Microbiology**, v. 74, n. 4, p. 353-364, Jun 2000.

ACCO, M.; FERREIRA, F. S.; HENRIQUES, J.A.P.; TONDO, E.C. Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. **Food Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 489-493, Out 2003.

ADESIYUN, A.A.; TATINI, S.R.; HOOVER, D.G. Production of enterotoxin(s) by staphylococcus-hyicus. **Veterinary Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 487-495, 1984.

AL-JASSER, M.S. Effect of cooling and freezing temperatures on microbial and chemical properties of chicken meat during storage. **Journal of Food Agriculture & Environment**, v. 10, n. 1, p. 113-116, Jan 2012.

ALIGHOLI, M.; EMANEINI, M.; JABALAMELI, F.; SHAHSAVAN, S.; DABIRI, H.; SEDAGHT, H. Emergence of high-level vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the Imam Khomeini hospital in Tehran. **Medical Principles and Practice**, v. 17, n. 5, p. 432-434, 2008.

ALMEIDA, L.M.D. **Fatores de virulência e genes regulatórios agr de *Staphylococcus aureus* e outras espécies coagulase positivas isoladas de mastites bovina e ovina.** São Paulo: Universidade de São Paulo, 2009, 111p. Tese (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ALTAY, M.; KESKIN, O.; AKAN, M. Identification of staphylococci isolated from chickens and the determination of their susceptibility to some antibiotics. **Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences**, v. 27, n. 3, p. 595-600, 2003.

ALZOLIBANI, A.; AL ROBAEE, A.; BILAL, J.; AHMED, M. Documentation of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) among children with atopic dermatitis in Qassim region, Saudi Arabia. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 66, n. 4, p. AB162-AB162, Apr 2012.

ANDRESEN, L.O. Production of exfoliative toxin by isolates of *Staphylococcus hyicus* from different countries. **Veterinary Record**, v. 157, n. 13, p. 376-378, Sep 2005.

ANVISA. **Relatório do Monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil.** 2008a. Disponível em:

< <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/relatorios/relatorioprebaf.pdf> >. Acesso em: 22/06/2012.

ANVISA. **Relatório do Monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil**. 2008b. Disponível em:  
< <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/relatorios/relatorioprebaf.pdf> >. Acesso em: 22/06/2012.

ARTHUR, M.; REYNOLDS, P.; COURVALIN, P. Glycopeptide resistance in enterococci. **Trends in Microbiology**, v. 4, n. 10, p. 401-407, Out 1996.

AUBRY-DAMON, H.; SOUSSY, C. J.; COURVALIN, P. Characterization of mutations in the rpoB gene that confer rifampin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 10, p. 2590-2594, Out 1998.

AYDIN, A.; SUDAGIDAN, M.; MURATOGLU, K. Prevalence of staphylococcal enterotoxins, toxin genes and genetic-relatedness of foodborne *Staphylococcus aureus* strains isolated in the Marmara Region of Turkey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 148, n. 2, p. 99-106, Agosto 2011.

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

BATES, J. Epidemiology of vancomycin-resistant enterococci in the community and the relevance of farm animals to human infection. **Journal of Hospital Infection**, v. 37, n. 2, p. 89-101, Out 1997.

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, Abr 1966.

BAYLES, K.W. & IANDOLO, J.J. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin-D. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 9, p. 4799-4806, Set 1989.

BECKER, K.; KELLER, B.; VON EIFF, C.; BRUCK, M.; LUBRITZ, G.; ETIENNE, J.; PETERS, G. Enterotoxigenic potential of *Staphylococcus intermedius*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 12, p. 5551-5557, Dez 2001.

BENNETT, R.W. & LANCETTE, G.A. **Bacteriological Analytical Manual of the U. S. Food and Drug Administration (FDA)** - Chapter 12. 2001. Disponível em:  
<<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071429.htm>>. Acesso em: 25/06/2012.

BERG, J.N.; WENDELL, D.E.; VOGELWEID, C.; FALES, W.H. Identification of the major coagulase-positive staphylococcus sp of dogs as *Staphylococcus-intermedius*. **American Journal of Veterinary Research**, v. 45, n. 7, p. 1307-1309, 1984.

BERGDOLL, M.S. Analytical methods for *Staphylococcus-aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 91-100, Mar 1990.

BERGDOLL, M.S.; BORJA, C.R.; ROBBINS, R.N.; WEISS, K.F. Identification of enterotoxin-E. **Infection and Immunity**, v. 4, n. 5, p. 593-595, 1971.

BERGDOLL, M.S.; CRASS, B.A.; REISER, R.F.; ROBBINS, R.N.; DAVIS, J.P. A new staphylococcal entero-toxin, enterotoxin-F, associated with toxic-shock-syndrome *Staphylococcus-aureus* isolates. **Lancet**, v. 1, n. 8228, p. 1017-1021, 1981.

BETLEY, M.J.; LOFDAHL, S.; KREISWIRTH, B.N.; BERGDOLL, M.S.; NOVICK, R.P. Staphylococcal enterotoxin-A gene is associated with a variable genetic element. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences**, v. 81, n. 16, p. 5179-5183, 1984.

BETLEY, M.J. & MEKALANOS, J.J. Nucleotide-sequence of the type-A staphylococcal entero-toxin gene. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 1, p. 34-41, Jan 1988.

BOHACH, G.A.; FAST, D.J.; NELSON, R.D.; SCHLIEVERT, P.M. Staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins involved in toxic shock syndrome and related illnesses. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 17, n. 4, p. 251-272, 1990.

BOHACH, G.A. & SCHLIEVERT, P.M. Nucleotide-sequence of the staphylococcal-enterotoxin C1 gene and relatedness to other pyrogenic toxins. **Molecular & General Genetics**, v. 209, n. 1, p. 15-20, Agosto 1987.

BOHACH, G.A. & SCHLIEVERT, P.M. Conservation of the biologically-active portions of staphylococcal enterotoxin-C1 and enterotoxin-C2. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 7, p. 2249-2252, Jul 1989.

BOND, R. & LOEFFLER, A. What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. **Journal of Small Animal Practice**, v. 53, n. 3, p. 147-154, Mar 2012.

BOONE, D.R.; CASTENHOLZ, R.W.; GARRITY, G.M.; BRENNER, D.J.; KRIEG, N.R.; STALEY, J.T. **Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology: Volume 2 - The Proteobacteria**. 2. ed. New York: Springer, 2005.

BOUCHER, H.; MILLER, L.G.; RAZONABLE, R.R. Serious Infections Caused by Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, p. S183-S197, Set 2010.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, Resolução RDC n. 12 de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 2001.

BRASIL. **Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes**. 2008. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/qualidade-seguranca-alimentos-bebidas/alimentos/residuos-e-contaminantes> >. Acesso em: 29/06/2012.

BRASIL. **Análise Epidemiológica dos Surto de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil, 1999 – 2009**. 2009. Disponível em: < [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analise\\_ep\\_surtos\\_dta\\_brasil\\_2009.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analise_ep_surtos_dta_brasil_2009.pdf) >. Acesso em: 04/07/2012.

BRASIL. **Aves**. 2012. Disponível em: < <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves> >. Acesso em: 29/06/2012.

BULANDA, M.; WEGRZYNOWICZ, Z.; CIURAK, M.; KOWALCZYK, J.; KUPRYSZEWSKI, G.; GRUSZKA, M.; HECZKO, P.B.; PULVERER, G. A new chromogenic assay for direct detection of staphylocoagulase. **Zentralblatt Fur Bakteriologie Mikrobiologie Und Hygiene Series a-Medical Microbiology Infectious Diseases Virology Parasitology**, v. 270, n. 1-2, p. 115-121, Nov 1988.

BUTAYE, P.; DEVRIESE, L.A.; HAESBROUCK, F. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: Effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 2, p. 175-188, Abr 2003.

BYSTRON, J.; BANIA, J.; MOLENDNA, J.; KOSEK-PASZKOWSKA, K.; KORZEKWA, K. Distribution of staphylococcal enterotoxin genes among *Staphylococcus aureus* isolates from food and humans. **Medycyna Weterynaryjna**, v. 61, n. 11, p. 1270-1273, Nov 2005.

CAMPBELL, E.A.; KORZHEVA, N.; MUSTAEV, A.; MURAKAMI, K.; NAIR, S.; GOLDFARB, A.; DARST, S.A. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. **Cell**, v. 104, n. 6, p. 901-912, Mar 2001.

CASANOVA, C.; ISELIN, L.; VON STEIGER, N.; DROZ, S.; SENDI, P. *Staphylococcus hyicus* Bacteremia in a Farmer. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 12, p. 4377-4378, Dez 2011.

CHENIER, S. & LALLIER, L. Acantholytic Folliculitis and Epidermitis Associated With *Staphylococcus hyicus* in a Line of White Leghorn Laying Chickens. **Veterinary Pathology**, v. 49, n. 2, p. 284-287, Mar 2012.

CHOI, Y.W.; KOTZIN, B.; HERRON, L.; CALLAHAN, J.; MARRACK, P.; KAPPLER, J. Interaction of *Staphylococcus-aureus* toxin superantigens with human T-cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 22, p. 8941-8945, Nov 1989.

CHOMARAT, M. & FLANDROIS, J.P. Frequency of pseudocoagulase production in *Staphylococcus-aureus*. **Zentralblatt Fur Bakteriologie Mikrobiologie Und Hygiene Series a-Medical Microbiology Infectious Diseases Virology Parasitology**, v. 258, n. 4, p. 441-448, 1984.

CHROBAK, D.; KIZERWETTER-SWIDA, M.; RZEWUSKA, M.; BINEK, M. Pet-aquired methicillin-resistant *Staphylococcus intermedius* (PA-MRSI) as a potential reservoir for *mecA* gene. **Postepy Mikrobiologii**, v. 48, n. 4, p. 235-242, 2009.

CITAK, S. & DUMAN, T. *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* from raw chicken samples in Turkey: Prevalence and antimicrobial resistance. **Journal of Food Agriculture & Environment**, v. 9, n. 1, p. 156-158, Jan 2011.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twenty-First Informational Supplement. 2011. Disponível em: <<http://www.rsu.ac.th/medtech/files/CLSI%202011.pdf>>. Acesso em: 26/06/2012.

CORDEIRO, D.N.G. **Significância clínica da presença de *Staphylococcus coagulase-negativo* isolados de recém-nascidos de uma unidade de terapia intensiva neonatal em Brasília – DF**. Brasília: UnB, 2007, 142p. Tese (Mestrado). Faculdade de Medicina - Núcleo de Medicina Tropical, Universidade de Brasília, Brasília, 2007.

COUCH, J.L. & BETLEY, M.J. Nucleotide-sequence of the type-C3 staphylococcal entero-toxin gene suggests that intergenic recombination causes antigenic variation. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 8, p. 4507-4510, Agosto 1989.

COUCH, J.L.; SOLTIS, M.T.; BETLEY, M.J. Cloning and nucleotide-sequence of the type-E staphylococcal entero-toxin gene. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 7, p. 2954-2960, Jul 1988.

CUNDLIFFE, E. Self-defense in antibiotic-producing organisms. **British Medical Bulletin**, v. 40, n. 1, p. 61-67, 1984.

DE NIEDERHAUSERN, S.; BONDI, M.; MESSI, P.; ISEPPI, R.; SABIA, C.; MANICARDI, G.; ANACARSO, I. Vancomycin-resistance Transferability from VanA Enterococci to *Staphylococcus aureus*. **Current Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1363-1367, Maio 2011.

DELLABONA, P.; PECCOUD, J.; KAPPLER, J.; MARRACK, P.; BENOIST, C.; MATHIS, D. Superantigens interact with MHC class-II molecules outside of the antigen groove. **Cell**, v. 62, n. 6, p. 1115-1121, Set 1990.

DEMAIN, A.L. How do antibiotic-producing microorganisms avoid suicide. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 235, n. 10, p. 601-612, 1974.

DEPARDIEU, F.; BONORA, M.G.; REYNOLDS, P.E.; COURVALIN, P. The vanG glycopeptide resistance operon from *Enterococcus faecalis* revisited. **Molecular Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 931-948, Nov 2003.

DEPARDIEU, F.; KOLBERT, M.; PRUUL, H.; BELL, J.; COURVALIN, P. VanD-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 10, p. 3892-3904, Out 2004.

DEPARDIEU, F.; PERICHON, B.; COURVALIN, P. Detection of the van alphabet and identification of enterococci and staphylococci at the species level by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5857-5860, Dez 2004.

DEVRIESE, L.A.; HERMANS, K.; BAELE, M.; HAESBROUCK, F. *Staphylococcus pseudintermedius* versus *Staphylococcus intermedius*. **Veterinary Microbiology**, v. 133, n. 1-2, p. 206-207, Jan 2009.

DEVRIESE, L.A.; VANCANNEYT, M.; BAELE, M.; VANEECHOUTTE, M.; DE GRAEF, E.; SNAUWAERT, C.; CLEENWERCK, I.; DAWYNDT, P.; SWINGS, J.; DECOSTERE, A.; HAESBROUCK, F. *Staphylococcus pseudintermedius* sp nov., a coagulase-positive species from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, p. 1569-1573, Jul 2005.

DEZFULIAN, A.; ASLANI, M.M.; OSKOUI, M.; FARROKH, P.; AZIMIRAD, M.; DABIRI, H.; SALEHIAN, M.T.; ZALI, M.R. Identification and Characterization of a High Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* Harboring VanA Gene Cluster Isolated from Diabetic Foot Ulcer. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 15, n. 2, p. 783-786, 2012.

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

DO CARMO, L.S.; CUMMINGS, C.; LINARDI, V.R.; DIAS, R.S.; DE SOUZA, J.M.; DE SENA, M.J.; DOS SANTOS, D.A.; SHUPP, J.W.; PEREIRA, R.K.P.; JETT, M. A Case Study of a Massive Staphylococcal Food Poisoning Incident. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 1, n. 4, p. 241-246, 2004.

DO CARMO, L.S.; BERGDOLL, M.S. Staphylococcal food poisoning in Belo Horizonte (Brazil). **Revista de Microbiologia**, v. 21, n. 4, p. 320-323, 1990.

DUQUETTE, R.A. & NUTTALL, T.J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dogs and cats: an emerging problem? **Journal of Small Animal Practice**, v. 45, n. 12, p. 591-597, Dez 2004.

DURDIK, P.; FEDOR, M.; JESENAK, M.; HAMZIKOVA, J.; KNOTKOVA, H.; BANOVCIN, P. *Staphylococcus intermedius* - rare pathogen of acute meningitis. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, p. E236-E238, Set 2010.

DUTKAMALEN, S.; EVERS, S.; COURVALIN, P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 1, p. 24-27, Jan 1995.

DUTKAMALEN, S.; MOLINAS, C.; ARTHUR, M.; COURVALIN, P. Sequence of the vanC gene of *Enterococcus-gallinarum* bm4174 encoding a D-alanine - D-alanine ligase-related protein necessary for vancomycin resistance. **Gene**, v. 112, n. 1, p. 53-58, Mar 1992.

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

ESTEVEES, A.; PATARATA, L.; AYMERICH, T.; GARRIGA, M.; MARTINS, C. Multiple correspondence analysis and random amplified polymorphic DNA molecular typing to assess the sources of *Staphylococcus aureus* contamination in alheira production lines. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 3, p. 685-691, Mar 2007.

EUZÉBY, J.P.M. List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. 2012. Disponível em: < <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html> >. Acesso em: 25/06/2012.

EVENSON, M.L.; HINDS, M.W.; BERNSTEIN, R.S.; BERGDOLL, M.S. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin-A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 311-316, Dec 1988.

FARIA, P.B.; BRESSAN, M.C.; SOUZA, X.R.D.; RODRIGUES, E.C.; CARDOSO, G.P.; GAMA, L.T.D. Composição proximal e qualidade da carne de frangos das linhagens Paraíso Pedrês e Pescoço Pelado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 2455-2464, 2009.

FAST, D.J.; SCHLIEVERT, P.M.; NELSON, R.D. Toxic shock syndrome-associated staphylococcal and streptococcal pyrogenic toxins are potent inducers of tumor necrosis factor production. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 1, p. 291-294, Jan 1989.

FINES, M.; PERICHON, B.; REYNOLDS, P.; SAHM, D.F.; COURVALIN, P. VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 9, p. 2161-2164, Sep 1999.

FINKS, J.; WELLS, E.; DYKE, T.L.; HUSAIN, N.; PLIZGA, L.; HEDDURSHETTI, R.; WILKINS, M.; RUDRIK, J.; HAGEMAN, J.; PATEL, J.; MILLER, C. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*, Michigan, USA, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 6, p. 943-945, Jun 2009.

FITZGERALD, J. R.; MONDAY, S.R.; FOSTER, T.J.; BOHACH, G.A.; HARTIGAN, P.J.; MEANEY, W.J.; SMYTH, C.J. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 1, p. 63-70, Jan 2001.

FORSMAN, P.; TILSALATIMISJARVI, A.; ALATOSSAVA, T. Identification of staphylococcal and streptococcal causes of bovine mastitis using 16S-23S rRNA spacer regions. **Microbiology-Uk**, v. 143, p. 3491-3500, Nov 1997

FOSTER, G. & BARLEY, J. *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* in dogs. **Veterinary Record**, v. 161, n. 14, p. 496-496, Out 2007.

FOSTER, G.; ROSS, H.M.; HUTSON, R.A.; COLLINS, M.D. *Staphylococcus lutrae* sp. nov, a new coagulase-positive species isolated from otters. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 3, p. 724-726, Jul 1997.

FOUCAULT, M.L.; COURVALIN, P.; GRILLOT-COURVALIN, C. Fitness Cost of VanA-Type Vancomycin Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2354-2359, Jun 2009.

FRANCO, B.D.G.M. & LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 1<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Atheneu 2001. ISBN 8573791217.

FREDRICKS, D.N. & RELMAN, D.A. Improved amplification of microbial DNA from blood cultures by removal of the PCR inhibitor sodium polyanetholesulfonate. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 10, p. 2810-2816, Out 1998.

GOULD, I.M. The epidemiology of antibiotic resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 32, p. S2-S9, Nov 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, n. 4, p. 807-810, Abr 2005.

GUVEN, K.; MUTLU, M.B.; GULBANDILAR, A.; CAKIR, P. Occurrence and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products consumed in turkey. **Journal of Food Safety**, v. 30, n. 1, p. 196-212, Fev 2010.

HAMPELE, I.C.; DARCY, A.; DALE, G.E.; KOSTREWA, D.; NIELSEN, J.; OEFNER, C.; PAGE, M.G.P.; SCHONFELD, H.J.; STUBER, D.; THEN, R.L. Structure and function of the dihydropteroate synthase from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 268, n. 1, p. 21-30, Abr 1997.

HATCH, S.; SREE, A.; TIRRELL, S.; TORRES, B.; ROTHMAN, A.L. Metastatic Complications from *Staphylococcus intermedius*, a Zoonotic Pathogen. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 1099-1101, Mar 2012.

HAZARIWALA, A.; SANDERS, Q.; HUDSON, C.R.; HOFACRE, C.; THAYER, S.G.; MAURER, J.J. Distribution of staphylococcal enterotoxin genes among *Staphylococcus aureus* isolates from poultry and humans with invasive staphylococcal disease. **Avian Diseases**, v. 46, n. 1, p. 132-136, 2002.

HERMAN, A.; KAPPLER, J.W.; MARRACK, P.; PULLEN, A.M. Superantigens - mechanism of T-cell stimulation and role in immune-responses. **Annual Review of Immunology**, v. 9, p. 745-772, 1991.

HERRIMAN, R. Rare resistant staph infection seen in Pennsylvania hospital. **The Examiner**, 2010. Disponível em: < <http://www.examiner.com/article/rare-resistant-staph-infection-seen-pennsylvania-hospital> >. Acesso em: 21/06/2012.

HIRAMATSU, K.; ARITAKA, N.; HANAOKI, H.; KAWASAKI, S.; HOSODA, Y.; HORI, S.; FUKUCHI, Y.; KOBAYASHI, I. Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. **Lancet**, v. 350, n. 9092, p. 1670-1673, Dez 1997.

HIRAMATSU, K.; HANAOKI, H.; INO, T.; YABUTA, K.; OGURI, T.; TENOVER, F.C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 40, n. 1, p. 135-136, Jul 1997.

HOLECKOVA, B.; HOLODA, E.; FOTTA, M.; KALINACOVA, V.; GONDOL, M.; GROLMUS, J. Occurrence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 9, n. 2, p. 179-182, 2002.

HOLMBERG, S.D. & BLAKE, P.A. Staphylococcal food poisoning in the United-States - new facts and old misconceptions. **Jama-Journal of the American Medical Association**, v. 251, n. 4, p. 487-489, 1984.

HOOKEY, J.V.; RICHARDSON, J.F.; COOKSON, B.D. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* based on PCR restriction fragment length polymorphism and DNA sequence analysis of the coagulase gene. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 4, p. 1083-1089, Abr 1998.

HOOPER, D.C. Fluoropuinolone resistance among Gram-positive cocci. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 9, p. 530-538, Set 2002.

HUI, Y.H. **Foodborne Disease Handbook: Diseases caused by bacteria**. New York: Marcel Dekker, vol. 1, 1994.

IGIMI, S.; TAKAHASHI, E.; MITSUOKA, T. *Staphylococcus-schleiferi* subsp coagulans subsp-nov, isolated from the external auditory meatus of dogs with external ear otitis. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 40, n. 4, p. 409-411, Out 1990.

IHRKE, P.J. An overview of bacterial skin-disease in the dog. **British Veterinary Journal**, v. 143, n. 2, p. 112-118, 1987.

JAPÃO. **Food Poisoning Statistics, 2009**. 2009. Disponível em: <[http://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/poisoning/dl/Food Poisoning Statistics 2009.pdf](http://www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/poisoning/dl/Food_Poisoning_Statistics_2009.pdf)>. Acesso em: 04/07/2012.

JARRAUD, S.; PEYRAT, M.A.; LIM, A.; TRISTAN, A.; BES, M.; MOUGEL, C.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F.; BONNEVILLE, M.; LINA, G. *egc*, A highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nursery of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Immunology**, v. 166, n. 1, p. 669-677, Jan 2001.

JAY, J. M.; LOESSNER, M.J.; GOLDEN, D.A. **Modern food microbiology**. 7. ed., Berlin: Springer. 2005. ISBN 9780834212305.

JOHNS, M.B.; KHAN, S.A. Staphylococcal enterotoxin-B gene is associated with a discrete genetic element. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 9, p. 4033-4039, Set 1988.

JONES, T. F.; KELLUM, M.E.; PORTER, S.S.; BELL, M.; SCHAFFNER, W. An outbreak of community-acquired foodborne illness caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 82-84, Jan 2002.

JUPIN, C.; ANDERSON, S.; DAMAIS, C.; ALOUF, J.E.; PARANT, M. Toxic shock syndrome toxin-1 as an inducer of human-tumor necrosis factors and gamma-interferon. **Journal of Experimental Medicine**, v. 167, n. 3, p. 752-761, Mar 1988.

KELESIDIS, T. & TSIODRAS, S. *Staphylococcus intermedius* is not only a zoonotic pathogen, but may also cause skin abscesses in humans after exposure to saliva. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 10, p. E838-E841, Oct 2010.

KEMPKER, R.; MANGALAT, D.; KONGPHET-TRAN, T.; EATON, M. Beware of the Pet Dog: A Case of *Staphylococcus intermedius* Infection. **American Journal of the Medical Sciences**, v. 338, n. 5, p. 425-427, Nov 2009.

KENT, M. **Advanced Biology**. New York: Oxford University Press, 2000. ISBN 9780199141951.

KHAMBATY, F.M.; BENNETT, R.W.; SHAH, D.B. Application of pulsed-field gel-electrophoresis to the epidemiologic characterization of *Staphylococcus intermedius* implicated in a food-related outbreak. **Epidemiology and Infection**, v. 113, n. 1, p. 75-81, Agosto 1994.

KHANAL, B.; BIRD, S.; PARAJULI, A. *Staphylococcus schleiferi* subsp *coagulans* bacteremia in a immunocompromised hemodialysis patient. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 57, n. 4, p. A52-A52, Abr 2011.

KITAI, S.; SHIMIZU, A.; KAWANO, J.; SATO, E.; NAKANO, C.; KITAGAWA, H.; FUJIO, K.; MATSUMURA, K.; YASUDA, R.; INAMOTO, T. Prevalence and characterization of *Staphylococcus aureus* and enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in retail raw chicken meat throughout Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 67, n. 3, p. 269-274, Mar 2005.

KIZERWETTER-SWIDA, M.; CHROBAK, D.; RZEWUSKA, M.; BINEK, M. Antibiotic resistance patterns and occurrence of *mecA* gene in *Staphylococcus intermedius* strains of canine origin. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 12, n. 1, p. 9-13, 2009 .

KLUYTMANS, J.; VANBELKUM, A.; VERBRUGH, H. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: Epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 3, p. 505-520, Jul 1997.

KLUYTMANS, J.; VANLEEUEWEN, W.; GOESSENS, W.; HOLLIS, R.; MESSER, S.; HERWALDT, L.; BRUINING, H.; HECK, M.; ROST, J.; VANLEEUEWEN, N.; VANBELKUM, A.; VERBRUGH, H. Food-initiated outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus-aureus* analyzed by phenotyping and genotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n. 5, p. 1121-1128, May 1995.

KONEMAN, E. W.; CURY, A. E. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 5. ed. Belo Horizonte: MEDSI, 2001. ISBN 9788571992467.

KUMAR, D.; CAWLEY, J.J.; IRIZARRY-ALVARADO, J.M.; ALVAREZ, A.; ALVAREZ, S. Case of *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* endocarditis and metastatic infection in an immune compromised host. **Transplant Infectious Disease**, v. 9, n. 4, p. 336-338, Dez 2007.

LAUTZ, S.; KANBAR, T.; ALBER, J.; LAMMLER, C.; WEISS, R.; PRENGER-BERNINGHO, E.; ZSCHOCK, M. Dissemination of the gene encoding exfoliative toxin of *Staphylococcus intermedius* among strains isolated from dogs during routine microbiological diagnostics. **Journal of Veterinary Medicine Series B-Infectious Diseases and Veterinary Public Health**, v. 53, n. 9, p. 434-438, Nov 2006.

LECLERCQ, R.; DERLOT, E.; DUVAL, J.; COURVALIN, P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus-faecium*. **New England Journal of Medicine**, v. 319, n. 3, p. 157-161, Jul 1988.

LEE, D.K.; HWANG, J.U.; BAEK, E.H.; LEE, K.O.; KIM, K.J.; HA, N.J. New antimicrobial drug resistance and epidemiological typing patterns of *Staphylococci* from clinical isolates and raw meats. **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, n. 8, p. 1016-1022, Agosto 2008.

LEROY, S.; GIAMMARINARO, P.; CHACORNAC, J.P.; LEBERT, I.; TALON, R. Biodiversity of indigenous staphylococci of naturally fermented dry sausages and manufacturing environments of small-scale processing units. **Food Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 294-301, Abr 2010.

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n. 1, p. 38-43, 2003.

LOWY, F.D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 9, p. 1265-1273, May 2003.

LYON, B.R. & SKURRAY, R. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus-aureus* - genetic-basis. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 1, p. 88-134, Mar 1987.

MACFADDIN, J.F. **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria**. 3. ed. Philadelphia, USA: Lippicott Williams and Wilkins, 2000.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J.; KYAW, C.M. **Microbiologia de Brock**. 10. ed., Upper Saddle River: Pearson Prentice Hall, 2004. ISBN 9788587918710.

MARRACK, P. & KAPPLER, J. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. **Science**, v. 248, n. 4956, p. 705-711, Maio 1990.

MAY, E.R.; HNILICA, K.A.; FRANK, L.A.; JONES, R.D.; BEMIS, D.A. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from healthy dogs and dogs with otitis, pyoderma, or both. **Javma-Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 227, n. 6, p. 928-931, Set 2005.

MCLAUCHLIN, J.; NARAYANAN, G.L.; MITHANI, V.; O'NEILL, G. The detection of enterotoxins and toxic shock syndrome toxin genes in *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 4, p. 479-488, Abr 2000.

MCMULLIN, P. **A Pocket Guide to Poultry Health and Disease**. Chapelton, England: 5M Enterprises Limited, 2004. 278p. ISBN 095301505X

MEAD, P.S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L.F.; BRESEE, J.S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P.M.; TAUXE, R.V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, n. 5, p. 607-625, 1999.

MESQUITA, M.O.D.; DANIEL, A.P.; SACCOL, A.L.F.; MILANI, L.I.G.; FRIES, L.L.M. Qualidade microbiológica no processamento do frango assado em unidade de alimentação e nutrição. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 198-203, 2006.

MIETHKE, T.; WAHL, C.; HEEG, K.; ECHTENACHER, B.; KRAMMER, P.H.; WAGNER, H. T-cell-mediated lethal shock triggered in mice by the superantigen staphylococcal enterotoxin-B - critical role of tumor-necrosis-factor. **Journal of Experimental Medicine**, v. 175, n. 1, p. 91-98, Jan 1992.

MORANDI, S.; BRASCA, A.; LODI, R.; CREMONESI, P.; CASTIGHONI, B. Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. **Veterinary Microbiology**, v. 124, n. 1-2, p. 66-72, Set 2007.

MOSSEL, D.A.A & GARCÍA, B. M. **Microbiología de Los Alimentos: Fundamentos Ecológicos para Garantizar y Comprobar la Integridad (Inocuidad y Calidad) Microbiológica de Los Alimentos**. 2. ed. Zaragoza, Espanha: Acribia, 2003. 724p. ISBN 9788420009988.

MOURA, T.M.D.; CAMPOS, F.S.; D'AZEVEDO, P.A.; VAN DER SAND, S.T.; FRANCO, A.C.; FRAZZON, J.; FRAZZON, A.P. Prevalence of enterotoxin-encoding genes and antimicrobial resistance in coagulase-negative and coagulase-positive *Staphylococcus* isolates from black pudding in Southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** *in press*, p. RSBMT-1350, 2012.

MULDERS, M.N.; HAENEN, A.P.J.; GEENEN, P.L.; VESSEUR, P.C.; POLDERVAART, E.S.; BOSCH, T.; HUIJSDENS, X.W.; HENGEVELD, P.D.; DAM-DEISZ, W.D.C.; GRAAT, E.A.M.; MEVIUS, D.; VOSS, A.; VAN DE GIESSEN, A.W. Prevalence of livestock-associated MRSA in broiler flocks and risk factors for slaughterhouse personnel in The Netherlands. **Epidemiology and Infection**, v. 138, n. 5, p. 743-755, Maio 2010.

MURRAY, I.A. & SHAW, W.V. O-acetyltransferases for chloramphenicol and other natural products. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, n. 1, p. 1-6, Jan 1997.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microbiologia médica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brazil, 2006. 992p. ISBN 9788535218381.

MURRAY, P.R. & BARON, E.J.; **Manual of clinical microbiology**. 8. ed. University of Michigan: ASM Press, 2003. 2113p. ISBN 9781555812553.

MUSTAK, H.K. & ESENDAL, O.M. Detection of exfoliative toxin in *Staphylococcus* spp. isolated from skins of healthy dogs and dogs with skin lesions. **Ankara Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**, v. 57, n. 4, p. 247-252, 2010.

NAGASE, N.; SASAKI, A.; YAMASHITA, K.; SHIMIZU, A.; WAKITA, Y.; KITAI, S.; KAWANO, J. Isolation and species distribution of *Staphylococci* from animal and human skin. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 64, n. 3, p. 245-250, Mar 2002.

NAWAZ, M.S.; KHAN, S.A.; KHAN, A.A.; KHAMBATY, F.M.; CERNIGLIA, C.E. Comparative molecular analysis of erythromycin-resistance determinants in staphylococcal isolates of poultry and human origin. **Molecular and Cellular Probes**, v. 14, n. 5, p. 311-319, Out 2000.

NG, E.Y.W.; TRUCKSIS, M.; HOOPER, D. C. Quinolone resistance mediated by nra - physiological characterization and relationship to flqb, a quinolone resistance locus on the *Staphylococcus-aureus* chromosome. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 6, p. 1345-1355, Jun 1994.

NOVICK, R.P.; SCHLIEVERT, P.; RUZIN, A. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. **Microbes and Infection**, v. 3, n. 7, p. 585-594, Jun 2001.

OLIVEIRA, A.M.; NAGO MIYA, N.T.; SANT'ANA, A.S.; PEREIRA, J.L. Behavior and Enterotoxin Production by Coagulase Negative Staphylococcus in Cooked Ham, Reconstituted Skimmed Milk, and Confectionery Cream. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 7, p. M475-M481, Set 2010.

OLSEN, S.J.; MACKINON, L.C.; GOULDING, J.S.; BEAN, N.H.; SLUTSKER, L. **Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks - United States, 1993-1997**. 2000. Disponível em: <  
<http://www.cdc.gov/MMWR/Preview/mmwrhtml/ss4901a1.htm>>. Acesso em: 04/07/2012.

OMOE, K.; HU, D.L.; 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, n. 2, p. 191-198, Maio 2005.

OMOE, K.; ISHIKAWA, M.; SHIMODA, Y.; HU, D.L.; UEDA, S.; SHINAGAWA, K. Detection of *seg*, *i*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of S-aureus isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 857-862, Mar 2002.

ONUMA, K.; UOYA, Y.; KOIDE, T.; SHIBATA, A.; TANABE, T.; SATO, H. Detection of *Staphylococcus hyicus* exfoliative toxin genes by dot blot hybridization and multiplex polymerase chain reaction. **Microbiology and Immunology**, v. 55, n. 3, p. 168-173, Mar 2011.

OSTERLUND, A.; KAHLMETER, G.; BIEBER, L.; RUNEHAGEN, A.; BREIDER, J.M. Intrafamilial spread of highly virulent *Staphylococcus aureus* strains carrying the gene for Pantón-Valentine leukocidin. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 34, n. 10, p. 763-764, Out 2002.

OTTER, J.A. & FRENCH, G.L. Molecular epidemiology of community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe. **Lancet Infectious Diseases**, v. 10, n. 4, p. 227-239, Abr 2010.

PALAZZO, I.C.V.; ARAUJO, M.L.C.; DARINI, A.L.C. First report of vancomycin-resistant staphylococci isolated from healthy carriers in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, Jan 2005.

PARANÁ, S.D.S.D.E.D. **Levantamento do Uso e Comercialização de Medicamentos Veterinários em Frango de Corte**. 2005. Disponível em: <  
<http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/vigilancia%20sanitaria/Relatorio%20levantamento%20frango.pdf>>. Acesso em: 22/06/2012.

PEREIRA, V.; LOPES, C.; CASTRO, A.; SILVA, J.; GIBBS, R.; TEIXEIRA, P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **Food Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 278-282, Maio 2009.

PERSOONS, D.; VAN H.S.; HERMANS, K.; BUTAYE, P.; DE KRUIF, A.; HAESEBROUCK, F.; DEWULF, J. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Poultry. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 3, p. 452-453, Mar 2009.

PIETTE, A. & VERSCHRAEGEN, G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. **Veterinary Microbiology**, v. 134, n. 1-2, p. 45-54, Fev 2009.

PINHO, M. G.; DE LENCASTRE, H.; TOMASZ, A. An acquired and a native penicillin-binding protein cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 19, p. 10886-10891, Set 2001.

PLACE, R. B.; HIESTAND, D.; GALLMANN, H.R.; TEUBER, M. *Staphylococcus equorum* subsp *linens*, subsp nov., a starter culture component for surface ripened semi-hard cheeses. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 26, n. 1, p. 30-37, Mar 2003.

PREVOST, G.; COUPPIE, P.; PREVOST, P.; GAYET, S.; PETIAU, P.; CRIBIER, B.; MONTEIL, H.; PIEMONT, Y. Epidemiologic data on *Staphylococcus aureus* strains producing synergohymenotropic toxins. **Journal of Medical Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 237-245, Abr 1995.

PROFT, T. & FRASER, J.D. Bacterial superantigens. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 133, n. 3, p. 299-306, Set 2003.

PU, S.; WANG, F.; GE, B. Characterization of Toxin Genes and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Isolates from Louisiana Retail Meats. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 2, p. 299-306, Fev 2011.

RALL, V.L.M.; VIEIRA, F.P.; RALL, R.; VIETIS, R.L.; FERNANDES, A.; CANDEIAS, J.M.G.; CARDOSO, K.F.G.; ARAUJO, J.P. PCR detection of staphylococcal enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw and pasteurized milk. **Veterinary Microbiology**, v. 132, n. 3-4, p. 408-413, Dez 2008.

RICH, M.; ROBERTS, L.; JONES, M.; YOUNG, V. *Staphylococcus schleiferi* subspecies *coagulans* in companion animals. **Veterinary Record**, v. 161, n. 3, p. 107-107, Jul 2007.

ROBERTS, M.C.; SUTCLIFFE, J.; COURVALIN, P.; JENSEN, L.B.; ROOD, J.; SEPPALA, H. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 12, p. 2823-2830, Dez 1999.

ROQUE, V.F. **APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS DE CARNE DE FRANGO: UMA ANÁLISE EXPLORATÓRIA**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 1996. s/n Tese (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Produção, UFSC, Florianópolis, 1996.

ROSS, J.I.; FARRELL, A.M.; EADY, E.A.; COVE, J.H.; CUNLIFFE, W.J. Characterization and molecular-cloning of the novel macrolide-streptogramin-B resistance determinant from *Staphylococcus-epidermidis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 24, n. 6, p. 851-862, Dez 1989.

SAHA, B.; SINGH, A.K.; GHOSH, A.; BAL, M. Identification and characterization of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from Kolkata (South Asia). **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 72-79, Jan 2008.

SANITAIRE, I.D.V. **Maladies à déclaration obligatoire: Toxi-infection alimentaire collective - Données épidémiologiques 2011**. 2011. Disponível em: < <http://www.invs.sante.fr/surveillance/tiac/donnees.htm> >.

SANITAIRE, I.D.V. **Bulletin de veille sanitaire — juin 2012**. 2012. Disponível em: < <http://www.invs.sante.fr/Publications-et-outils/Bulletin-de-veille-sanitaire/Tous-les-numeros/Ouest/Bulletin-de-veille-sanitaire-Ouest.-n-7-Juin-2012> >.

SASAKI, T.; TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y.; SAKUSABE, A.; OHTSUKA, M.; HIROTAKI, S.; KAWAKAMI, T.; FUKATA, T.; HIRAMATSU, K. Multiplex-PCR Method for Species Identification of Coagulase-Positive Staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 3, p. 765-769, Mar 2010.

SATAKE, S.; CLARK, N.; RIMLAND, D.; NOLTE, F.S.; TENOVER, F.C. Detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples by PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 9, p. 2325-2330, Set 1997.

SAUNDERS, J.R. Genetics and evolution of antibiotic-resistance. **British Medical Bulletin**, v. 40, n. 1, p. 54-60, 1984.

SCHAD, E.M.; PAPAGEORGIOU, A.C.; SVENSSON, L.A.; ACHARYA, K.R. A structural and functional comparison of staphylococcal enterotoxins A and C2 reveals remarkable similarity and dissimilarity. **Journal of Molecular Biology**, v. 269, n. 2, p. 270-280, Jun 1997.

SCHAECHTER, M.; ENGLEBERG, N.C.; EINSENSTEIN, B.I.; MEDOFF, G. **Microbiologia: Mecanismos das Doenças Infecciosas**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 664p. ISBN 8527707144, 9788527707145.

SCHLUNZEN, F.; ZARIVACH, R.; HARMS, J.; BASHAN, A.; TOCILJ, A.; ALBRECHT, R.; YONATH, A.; FRANCESCHI, F. Structural basis for the interaction of antibiotics with the peptidyl transferase centre in eubacteria. **Nature**, v. 413, n. 6858, p. 814-821, Out 2001.

SCHWARZ, S.; KEHRENBERG, C.; DOUBLET, B.; CLOECKAERT, A. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. **Fems Microbiology Reviews**, v. 28, n. 5, p. 519-542, Nov 2004.

SETH, A.; STERN, L.J.; OTTENHOFF, T.H.M.; ENGEL, I.; OWEN, M.J.; LAMB, J.R.; KLAUSNER, R.D.; WILEY, D.C. Binary and ternary complexes between T-cell receptor, class-II MHC and superantigen in-vitro. **Nature**, v. 369, n. 6478, p. 324-327, May 26 1994.

SHAFER, W.M.; IANDOLO, J.J. Chromosomal locus for staphylococcal enterotoxin-B. **Infection and Immunity**, v. 20, n. 1, p. 273-278, 1978.

SHAKIL, S.; KHAN, R.; ZARRILLI, R.; KHAN, A.U. Aminoglycosides versus bacteria - a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. **Journal of Biomedical Science**, v. 15, n. 1, p. 5-14, Jan 2008.

SHALITA, Z.; HERTMAN, I.; SARID, S. Isolation and characterization of a plasmid involved with enterotoxin-B production in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 129, n. 1, p. 317-325, 1977.

SIERADZKI, R.; PINHO, M. G.; TOMASZ, A. Inactivated pbp4 in highly glycopeptide-resistant laboratory mutants of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 27, p. 18942-18946, Jul 1999.

SIEVERT, D.M.; RUDRIK, J.T.; PATEL, J.B.; MCDONALD, L.C.; WILKINS, M.J.; HAGEMAN, J.C. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* in the United States, 2002-2006. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 5, p. 668-674, Mar 2008.

SKOLD, O. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. **Drug Resistance Updates**, v. 3, n. 3, p. 155-160, 2000.

SLEDGE, D. G.; DANIEU, P.K.; BOLIN, C.A.; BOLIN, S.R.; LIM, A.; ANDERSON, B.C.; KIUPEL, M. Outbreak of Neonatal Diarrhea in Farmed Mink Kits (*Mustella vison*) Associated With Enterotoxigenic *Staphylococcus delphini*. **Veterinary Pathology**, v. 47, n. 4, p. 751-757, Jul 2010.

SORUM, H. & L'ABEE-LUND, T.M. Antibiotic resistance in food-related bacteria - a result of interfering with the global web of bacterial genetics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, n. 1-2, p. 43-56, Set 15 2002.

SPICER, W.J. **Bacteriologia, micologia e parasitologia clínicas: um texto ilustrado em cores**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 224p. ISBN: 8527707519

SUDAGIDAN, M. & AYDIN, A. Virulence properties of *Staphylococcus delphini* strains isolated from domestic pigeons. **Medycyna Weterynaryjna**, v. 68, n. 4, p. 231-236, Abr 2012.

SYKES, G.; SKINNER, F.A. **Actinomycetales: characteristics and practical importance**. University of Michigan: Academic Press, 1973. 339p. ISBN 9780126799507.

TANABE, T.; SATO, H.; WATANABE, K.; HIRANO, M.; HIROSE, K.; KUROKAWA, S.; NAKANO, K.; SAITO, H.; MAEHARA, N. Correlation between occurrence of exudative epidermitis and exfoliative toxin-producing ability of *Staphylococcus hyicus*. **Veterinary Microbiology**, v. 48, n. 1-2, p. 9-17, Jan 1996.

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, p. 281-301, 2000.

TENOVER, F.C.; GOERING, R.V. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain USA300: origin and epidemiology. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 3, p. 441-446, Set 2009.

TERAUCHI, R.; SATO, H.; HASEGAWA, T.; YAMAGUCHI, T.; AIZAWA, C.; MAEHARA, N. Isolation of exfoliative toxin from *Staphylococcus intermedius* and its local toxicity in dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 94, n. 1, p. 19-29, Jun 2003.

TEUBER, M. Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 56, n. 9-10, p. 755-763, Nov 1999.

TOLDRÁ, F. **Safety of Meat and Processed Meat**. Berlim: Springer, 2009. 669p. ISBN 9780387890258.

UBABEF. **Relatório Anual da União Brasileira de Avicultura. 2010/2011**. Disponível em: <  
<http://www.abef.com.br/ubabef/exibenoticiaubabef.php?notcodigo=2761> >.  
Acesso em: 29/06/2012.

UBABEF. **Você Sabia Brazilian Chicken**. 2012. Disponível em: <  
<http://www.brazilianchicken.com.br/voce-sabia-brazilian-chicken.php> >. Acesso em: 29/06/2012.

UDO, E.E.; AL-BUSTAN, M.A.; JACOB, L.E.; CHUGH, T.D. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant workers from Kuwait City may be a potential cause of food poisoning. **Journal of Medical Microbiology**, v. 48, n. 9, p. 819-823, Set 1999.

VAKULENKO, S.B.; MOBASHERY, S. Versatility of Aminoglycosides and prospects for their future. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 3, p. 430-450, Jul 2003.

VALSANGIACOMO, C.; DOLINA, M.; PEDUZZI, R.; JAGGLI, M. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from hospitalized patients and dairy food (fresh cheese): a survey over a decade in southern Switzerland. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 6, n. 7, p. 395-396, Jul 2000.

VAN DEN BROEK, I.V.F.; VAN CLEEF, B.A.G.L.; HAENEN, A.; BROENS, E.M.; VAN DER WOLF, P.J.; VAN DEN BROEK, M.J.M.; HUIJSDENS, X.W.; KLUYTMANS, J.A.J.W.; VAN DE GIESSEN, A.W.; TIEMERSMA, E.W. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in people living and working in pig farms. **Epidemiology and Infection**, v. 137, n. 5, p. 700-708, Maio 2009.

VAN DUIJKEREN, E.; WOLFHAGEN, M.; BOX, A.T.A.; HECK, M.; WANNET, W.J.B.; FLUIT, A.C. Human-to-dog transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 12, p. 2235-2237, Dez 2004.

VARALDO, P.E.; KILPPERBALZ, R.; BIAVASCO, F.; SATTA, G.; SCHLEIFER, K.H. *Staphylococcus delphini* sp-nov, a coagulase-positive species isolated from dolphins. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 38, n. 4, p. 436-439, Out 1988.

VARNAM, A.H. & EVANS, G. **Foodborne pathogens: an illustrated text**. University of Cornell: Manson, 1996. 557p. ISBN 9781874545415.

VERNOZYROZAND, C.; MAZUY, C.; PREVOST, G.; LAPEYRE, C.; BES, M.; BRUN, Y.; FLEURETTE, J. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 271-280, Jul 1996.

WATTINGER, L.; STEPHAN, R.; LAYER, F.; JOHLER, S. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates associated with food intoxication with isolates from human nasal carriers and human infections. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, n. 4, p. 455-464, Abr 2012.

WEESE, J.S.; STEPHAN, R.; LAYER, F.; JOHLER, S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel, 2000-2002. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 3, p. 430-435, Mar 2005.

WEHRLI, W. Rifampin - mechanisms of action and resistance. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 5, p. S407-S411, 1983.

WEIGEL, L.M.; CLEWELL, D.B.; GILL, S.R.; CLARK, N.C.; MCDUGAL, L.K.; FLANNAGAN, S.E.; KOLONAY, J.F.; SHETTY, J.; KILLGORE, G.E.; TENOVER, F.C. Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. **Science**, v. 302, n. 5650, p. 1569-1571, Nov 2003.

WEISBLUM, B. Erythromycin resistance by ribosome modification. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 3, p. 577-585, Mar 1995.

WERTHEIM, H.F.L.; MELLES, D.C.; VOS, M.C.; VAN LEEUWEN, W.; VAN BELKUM, A.; VERBRUGH, H.A.; NOUWEN, J.L. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. **Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 12, p. 751-762, Dez 2005.

WICHELHAUS, T.A.; SCHAFFER, V.; BRADE, V.; BODDINGHAUS, B. Molecular characterization of rpoB mutations conferring cross-resistance to rifamycins on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 11, p. 2813-2816, Nov 1999.

WIENEKE, A.A.; ROBERTS, D.; GILBERT, R. J. Staphylococcal food poisoning in the United-Kingdom, 1969-90. **Epidemiology and Infection**, v. 110, n. 3, p. 519-531, Jun 1993.

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

ZHANG, S. P.; IANDOLO, J. J.; STEWART, G. C. The enterotoxin D plasmid of *Staphylococcus aureus* encodes a second enterotoxin determinant (sej). **Fems Microbiology Letters**, v. 168, n. 2, p. 227-233, Nov 1998.

## VITA

### I. Identificação

Nome: Paula Dalcin Martins

Endereço: Rua Santo Antônio, 782/318 - Bom Fim, Porto Alegre/RS CEP 90220-010

Idade: 23 anos E-mail: pauladalcimartins@hotmail.com Tel.: 55 8403 9041

### II. Documentação

Possui carteira de habilitação - categoria: B.

### III. Formação profissional

2011 – atual: Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela UFRGS.

2007 – 2010: Graduação em Biomedicina pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

### IV. Formação complementar

2009 – Estágio em Microbiologia na Università degli Studi di Torino (Itália) sob orientação da Professora Dianella Savoia.

2008 – 2010 – Estágio em Microbiologia na UFRGS sob orientação da Professora Ana Paula Guedes Frazzon.

2007 – Estágio em Biologia molecular na UFRGS sob orientação do Professor Arnaldo Zaha.

2007 – Estágio em Embriologia na UFRGS sob orientação do Professor Casimiro de Abreu.

### V. Outros conhecimentos

Proficiente em Língua Inglesa pelo exame TOEFL – nota: 107.

Domínio das Línguas Italiana, Francesa e Espanhola.

### VI. Apresentação de Trabalhos

2012 – “Coagulase Positive Staphylococci Isolated from Chilled or Frozen Raw Chicken Meat: Staphylococcal Enterotoxin Genes Prevalence, Antibiotic Resistance Profile and Vancomycin Resistance Report”, XXI Congresso Latinoamericano de Microbiologia, Santos.

2010 – “Avaliação Fenotípica e Genotípica de Fatores de Virulência Relacionados à Formação de Biofilme por *Enterococcus* spp. Isolados de Alimentos”, III Congresso internacional de Bioanálises, FEEVALE.

2010 – “Comparação Genotípica de Fatores de Virulência de *Enterococcus* spp. Isolados de Alimentos e do Ambiente Clínico” XXII Salão de Iniciação Científica da UFRGS.

2009 – “Comparação da Frequência de Fatores de Virulência de *Enterococcus* spp. Isolados de Alimentos e do Ambiente Clínico”, XXI Salão de Iniciação Científica da UFRGS.

2008 – “Determinação da Ocorrência da Proteína Gelatinase em *Enterococcus* spp. Isolados de Alimentos e do Ambiente Clínico”, XX Salão de Iniciação Científica da UFRGS.

### VII. Artigo Aceito para Publicação

MARINHO, A. R.; MARTINS, P.D; DITMER, E.M; D AZEVEDO, P.; FRAZZON, JEVERSON; VAN DER SAND, S. T.; FRAZZON, A. P. G. Biofilm formation on polystyrene under different temperatures by antibiotic resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from food. Brazilian Journal of Microbiology (Impresso), 2012.