UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos
Área de Bromatologia

Avaliação da influência da etapa de salga do abate *Shechita* na
população de *Staphylococcus aureus* em carcaças de frango –
caracterização feno e genotípica dos isolados

Priscila Cavalheiro Marcenovicz

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Profa. Dra. Maria Teresa Destro

São Paulo
2012

Priscila Cavalheiro Marcenovicz

Avaliação da influência da etapa de salga do abate *Shechita* na população de *Staphylococcus aureus* em carcaças de frango – caracterização feno e genotípica dos isolados

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Maria Teresa Destro
orientador/presidente

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva - UFPEL

Profa. Vera Lúcia Mores Rall - UNESP

São Paulo, 29 de maio de 2012.

À Deus e ao meu marido, Gustavo,
que foram os principais incentivadores
para a realização desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Findado este tão importante ciclo de formação, faz-se necessário agradecer aos que fizeram a diferença nesta caminhada.

Agradeço, então:

A Deus, por ter me guiado e me dado força desde o início desta caminhada;

À minha orientadora, Professora Maria Teresa Destro, pela atenção dispensada, confiança depositada e pelos esforços investidos para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao meu marido Gustavo – meu grande incentivador – que me apoiou desde que este mestrado era apenas um projeto, mesmo sabendo que para sustentar este sonho precisaríamos permanecer por dois anos separados fisicamente;

Aos meus colegas de laboratório, Maria Crystina e Matheus, por terem me apoiado e dedicado seu tempo para me entregar “sã e salva” em minha casa, mesmo tendo seus próprios compromissos;

Às colegas Adriana, Verena e Carol pelo apoio inicial quando cheguei a um mundo novo chamado São Paulo;

Ao colega Anderson, que me emprestou seus conhecimentos estatísticos ao elaborar a análise dos dados tabulados na pesquisa;

Às técnicas de laboratório Kátia e Lúcia, que me auxiliaram na utilização do laboratório e na árdua limpeza dos materiais;

À professora Elsa Mamizuka, que todas as vezes que precisei tirou minhas dúvidas em sua área de atuação, além de disponibilizar o laboratório para as pesquisas de biologia molecular;

A Lara, orientanda da Professora Elsa, que me ensinou o passo a passo da biologia molecular;

Aos professores Wladimir e Vera Lúcia que, gentilmente, cederam para minha pesquisa cepas padrão de *Staphylococcus aureus*;

Ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, em especial à Médica Veterinária Cláudia Pereira, que nos iluminou com a ideia do projeto inicial, e aos Médicos Veterinários Luiz Carlos e Montemar, pelo incentivo à realização da pesquisa no abatedouro e pela intercessão junto a este;

Aos gestores e funcionários do Abatedouro Mehadrin, pelo espaço, materiais disponibilizados e apoio nas coletas;

À colega Maria Fernanda pela colaboração durante as coletas realizadas;

Ao Laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário da USP, pelo auxílio nas análises automatizadas necessárias ao trabalho;

Ao Laboratório SFDK, pelo empréstimo do espaço e equipamentos para realização de análise;

A minha família, que sempre esteve ao meu lado, mesmo que distante, apoiando-me e escutando-me;

A Talita, que se tornou uma amiga, e que antes mesmo de eu iniciar a caminhada no mestrado na USP, incentivou-me a fazê-lo, mesmo eu achando que este era um sonho distante pelo local escolhido;

E, não menos importante,

A FAPESP, pelos investimentos financeiros realizados em meus estudos, que permitiram minha estadia em São Paulo e, também, o desenvolvimento das pesquisas.

“Não basta ter belos sonhos para realizá-los. Mas ninguém realiza grande obras se não for capaz de sonhar grande. Podemos mudar os nossos destinos, se nos dedicarmos à luta pela realização de nossos ideais, de examinar com atenção a vida real, de confrontar a nossa observação com nosso sonho, de realizar escrupulosamente nossa fantasia. Sonhos, acredite neles.”

Lenin

RESUMO

MARCENOVICZ, P.C. **Avaliação da influência da etapa de salga do abate *Shechita* na população de *S. aureus* em carcaças de frango – caracterização feno e genotípica dos isolados.** 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O abate *Shechita* de aves, diferentemente do abate convencional, realiza o processo religioso conhecido como *melichah*, que consiste de três etapas: imersão em água, salga e dessalga das carcaças. Alguns estudos indicam que a salga pode ser benéfica para a qualidade microbiológica do produto, mas não se encontrou referência às bactérias halotolerantes como o *Staphylococcus aureus* e nem aos micro-organismos aeróbios mesófilos em frangos. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a influência da etapa de salga na população de *S. aureus* e de micro-organismos aeróbios mesófilos, identificar as espécies de *Staphylococcus* não produtoras de coagulase presentes e caracterizar fenotípica e genotipicamente os isolados de *S. aureus* e demais espécies. Para tanto foram coletadas 304 amostras de carcaças de aves, sendo metade obtida antes da etapa de salga e a outra metade após a dessalga. *S. aureus* esteve presente em 13/304 (4,3%) amostras, sendo que nove foram coletadas antes da salga. A população média de *S. aureus* nessas amostras foi de $2,5 \times 10$ UFC/g antes da salga e 8,9 UFC/g após a dessalga, e de micro-organismos aeróbios mesófilos foi de $5,4 \times 10^3$ UFC/g antes da salga e $4,5 \times 10^3$ após a dessalga, variação esta que pode ser considerada normal e não decorrente da etapa de salga. Face à baixa frequência de *S. aureus* nas amostras, simulou-se o *melichah* em laboratório, sendo que o processo levou à redução significativa ($p < 0,05$) da população de *S. aureus*. Todos os isolados identificados como *S. aureus* pelos diferentes métodos empregados foram capazes de produzir coagulase, portavam o gene *nuc*, mas não apresentavam o gene *mecA* que codifica para a resistência à metilicina. Em 88% (36/41) dos isolados identificados como *S. aureus* detectaram-se os genes codificadores para enterotoxina estafilocócica (SE) G e I, mas não os genes para as enterotoxinas clássicas. A maioria (37/41, 90,2%) desses isolados foi sensível aos antibióticos testados. Dentre os 890 isolados de *Staphylococcus* não produtoras de coagulase foram selecionadas 250 para serem submetidas à especiação, representando as diferentes amostras de aves. Foram identificadas as espécies *S. hyicus* (35%), *S. cohnii* subsp. *urealyticus* (29%), *S. simulans* (18%), *S. epidermidis* (6%), *S. capitis* (6%), *S. hominis* (2%), *S. xylosus* (2%), *S. sciuri* (1%), *S. saprophyticus* (1%) e *S. warneri* (0,4%). Destes isolados, foram selecionados 182 que foram avaliados quanto à sua capacidade de produzir enterotoxinas clássicas (kit VIDAS®), sendo que apenas três deles foram positivas, tendo sido detectada a presença somente de gene *sec*. Esses isolados eram da espécie *S. epidermidis*. Com relação à sensibilidade aos agentes antimicrobianos, verificou-se que 80% (148/185) foram resistentes a pelo menos um dos agentes testados, sendo a maior percentagem deles resistente à tetraciclina. Os resultados indicam a etapa do *melichah* pode contribuir para a redução de *S. aureus* na superfície das carcaças.

Palavras-chave: frango kosher. *melichah*. *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus* sp.

ABSTRACT

MARCENOVICZ, P.C. **Evaluation of the influence of salting step of *Shechita* slaughter in the population of *S. aureus* in poultry carcasses.** 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

In the *Shechita* slaughter, different from the conventional slaughter, there is a religious process called *melichah* that is be divided in three steps: immersion in water, salting and washing the carcasses. Some studies indicate that the salting step may benefit the microbial quality of the product, but no information concerning its influence on halotolerant bacteria such as *Staphylococcus aureus* or on mesophilic aerobes bacteria in poultry. The objectives of this study were to evaluate the influence of the salting step in the population of *S. aureus* and mesophilic microorganisms; to identify the species of coagulase negative *Staphylococcus* and to characterize, pheno and genotypically, the isolates. A total of 304 poultry carcasses were sampled, being half collected before salting and half after desalting steps. *S. aureus* was found in 13/304 (4.5%) samples being nine collected before salting. Average population of *S. aureus* in pre-salting carcasses was 2.5×10 CFU/g and 8.9 CFU/g after salt removal. Mean mesophilic aerobes population was 5.4×10^3 CFU/g and 4.5×10^3 CFU/g for carcasses collected before salting and after washing steps, respectively. This variation can be considered normal and not derived from the salting step. As the frequency of *S. aureus* in the samples was low, the *melichah* was simulated in the lab showing that the process can reduce ($p < 0.05$) the population of *S. aureus*. All isolates of *S. aureus* were able to produce coagulase, harbored the gene *nuc* but not *mecA* that encodes for methicilin resistance. Amongst the *S. aureus* isolates 88% (36/41) harbored genes coding for staphylococcal enterotoxin (SE) G and I, but no genes for classical SE. The majority of these isolates (37/41, 90.2%) were sensitive to all antibiotics tested. 250 colonies, representing the different poultry samples were selected amongst the 890 coagulase negative *Staphylococcus* colonies for further identification. The species *S. hyicus* (35%), *S. cohnii* subsp. *urealyticus* (29%), *S. simulans* (18%), *S. epidermidis* (6%), *S. capitis* (6%) *S. hominis* (2%), *S. xylosus* (2%), *S. sciuri* (1%), *S. saprophyticus* (1%) and *S. warneri* (0,4%) were identified. Amongst the 250 isolates identified 182 were selected for classical SE production evaluation (kit Vidas®) being only three positive. The gene *sec* was detected in these isolates, and had been identified as *S. epidermidis*. Antibiotic resistance was observed in 80% (148/185) of the coagulase negative isolates, and tetracilin resistance was the most frequent phenotype. The results indicate that the *melichah* may contribute to the reduction of *S. aureus* in the surface of the carcasses.

Key Words: Kosher poultry. *Melichah*. *Staphylococcus aureus*. *Staphylococcus* sp.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Representação esquemática do abate tradicional e para obtenção de carne <i>kosher</i> de aves com indicações dos pontos de coleta.....	16
FIGURA 2 – Representação das etapas realizadas para a enumeração de <i>S. aureus</i> em amostras de frangos.....	30
FIGURA 3 – Representação do procedimento de enumeração da população de <i>S. aureus</i> a partir de amostras centrifugadas.....	32
FIGURA 4 – Representação da metodologia empregada para enumeração da população de mesófilos.....	33
FIGURA 5 – Representação dos resultados possíveis para a prova de produção de coagulase.....	35
FIGURA 6 – Representação esquemática do sistema de identificação pelo kit bioquímico API Staph (bioMérieux, França).....	37
FIGURA 7 – Representação esquemática da metodologia empregada no teste de avaliação da resistência à lisostafina.....	38
FIGURA 8 – Representação esquemática da simulação do <i>melichah</i> em laboratório.....	43
FIGURA 9 – Desenho esquemático com possíveis resultados para o teste D.....	50
FIGURA 10 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR, para detecção dos genes <i>nuc</i> e <i>mecA</i> em isolados de <i>S. aureus</i>	63

FIGURA 11 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR, para detecção dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej* em isolados de *S. aureus*.....65

FIGURA 12 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR, para detecção do gene *sec* de *S. epidermidis* (coagulase negativo).....68

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Localização genética dos genes codificadores para algumas SE.....	22
QUADRO 2 – Detecção de MRSA em aves.....	26
QUADRO 3 – Perfil de resistência a antimicrobianos (CLSI, 2011) dos isolados de <i>S. aureus</i> provenientes de carcaças de frango <i>kosher</i> coletadas na cidade de São Paulo.....	71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Sequência dos oligonucleotídeos e cepas utilizadas como controles positivos na detecção dos genes para enterotoxinas estafilocócicas por PCR.....	44
TABELA 2 – Distribuição das espécies e número de isolados de <i>Staphylococcus</i> não produtores de coagulase submetidos à pesquisa de enterotoxinas estafilocócicas.....	45
TABELA 3 – Distribuição das variáveis: número de isolados identificados, número de isolados testados e percentagem de isolados testados de <i>Staphylococcus</i> não produtores de coagulase no Kirby-Bauer.....	49
TABELA 4 – Distribuição das variáveis peso médio e temperatura média das carcaças de frango avaliadas.....	53
TABELA 5 – População de <i>S. aureus</i> nas carcaças de frango obtidas em um abatedouro que realiza abate <i>Shechita</i> na cidade de São Paulo.....	54
TABELA 6 – Distribuição dos isolados com base nos resultados das provas de coagulase, DNase e na identificação pelo API Staph.....	59
TABELA 7 – Espécies do gênero <i>Staphylococcus</i> , não produtores de coagulase e/ou DNase, isoladas de frangos provenientes de abate <i>Shechita</i>	60
TABELA 8 – População de <i>S. aureus</i> em sobrecoxas de frango artificialmente contaminadas e submetidas ao <i>Melichah</i>	64
TABELA 9 – Perfil de resistência a antimicrobianos de espécies de <i>Staphylococcus</i> sp. provenientes de frango <i>kosher</i>	75

TABELA 10 – Ocorrência de <i>Staphylococcus</i> sp. provenientes de carcaças de frango <i>kosher</i> apresentando multirresistência a antibióticos.....	76
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS	27
2.1 Objetivos gerais	27
2.2 Objetivos específicos	27
3 MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1 Material	28
3.2 Métodos	28
3.2.1 Coleta de amostras	28
3.2.2 Determinação da população de <i>S. aureus</i>	29
3.2.3 Determinação da população de micro-organismos aeróbios mesófilos ...	31
3.2.4 Confirmação da identidade dos isolados	34
3.2.5 Simulação do <i>melichah</i> em laboratório	41
3.2.6 Detecção de genes codificadores para enterotoxinas estafilocócicas	44
3.2.7 Triagem da presença de <i>S. aureus</i> resistente à meticilina (MRSA)	47
3.2.8 Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos	47
3.2.9 Pesquisa da presença do gene <i>mecA</i> nos isolados de <i>S. aureus</i>	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1 Detecção e enumeração de <i>S. aureus</i>	53
4.2 Determinação da população de bactérias aeróbias mesófilas	56
4.3 Identificação dos isolados de <i>Staphylococcus</i>	57
4.3.3 Identificação genotípica	62
4.4 Simulação do <i>melichah</i> em laboratório	63
4.5 Pesquisa de genes para a produção de enterotoxinas estafilocócicas	65
4.5.1 Isolados de <i>S. aureus</i>	65
4.5.2 Isolados de <i>Staphylococcus</i> não produtores de coagulase	67
4.6 Triagem da presença de <i>S. aureus</i> resistente à meticilina (MRSA) com a utilização de meio de cultura cromogênico	69
4.7 Pesquisa da presença do gene <i>mecA</i> nos isolados de <i>S. aureus</i>	70
4.8 Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos	70
4.8.1 Isolados de <i>Staphylococcus aureus</i>	70
4.8.2 Isolados de <i>Staphylococcus</i> não produtores de coagulase	73
5 CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS	79
APÊNDICES	88

1 INTRODUÇÃO

Em algumas religiões é comum a prática do abate sob a determinação de preceitos religiosos. Pelo menos três rituais de abate com preceitos religiosos são bem conhecidos: *Shechita*, para obtenção de carne *kosher* para seguidores do judaísmo; *Halal*, utilizado para obtenção de carne para pessoas da fé islâmica; e *Jhatka*, que realiza a decapitação do animal para obter carne aos devotos do siquismo (GOMIDE; RAMOS; FONTES, 2006).

Para a obtenção de carne *kosher*, os judeus seguem as leis judaicas de alimentação, descritas inicialmente nos cinco primeiros capítulos da Bíblia Sagrada (*Torah*), onde apenas as carnes de bovinos, de aves, e de peixes com escamas, se produzidas de acordo com os preceitos, são consideradas *kosher* (GOMIDE; RAMOS; FONTES, 2006). O ritual de abate, entretanto, não está descrito no *Torah*, mas na lei oral de Israel (BIRNBAUM, 1995).

Para aves esse processo difere do abate convencional de obtenção de carne, pois não ocorre a insensibilização do animal, não é realizada a escalda antes da depenagem, o que leva a uma remoção menos efetiva das penas e à necessidade de maior manipulação das aves, e são efetuados cortes adicionais nas asas e no pescoço para a drenagem de sangue. Além disso, é realizado um processo religioso conhecido como *melichah* (REGENSTEIN; CHAUDRY, 2001).

O *melichah* consiste de três etapas: imersão das carcaças em água, salga e dessalga. A imersão das carcaças ocorre no *chiller* por não menos que meia hora, com o intuito de remover o sangue da superfície das mesmas e amaciar a carne para melhor penetração do sal. Em seguida é realizada a salga a seco com aplicação manual de cloreto de sódio em toda a superfície interna e externa das carcaças, as quais devem permanecer durante 1 hora em superfícies com sulcos especiais, que permitem a drenagem de cada ave. Passado este período, a carne é enxaguada três vezes consecutivas em água corrente gelada para a remoção do sal (REGENSTEIN; CHAUDRY, 2001; KLEIN, 1992).

Na figura 1 estão apresentadas esquematicamente as etapas do abate de aves tradicional e as do *Shechita*, com as indicações dos pontos de coleta.

FIGURA 1 – Representação esquemática do abate tradicional e para obtenção de carne *kosher* de aves com as indicações dos pontos de coleta.

Apesar deste tipo de abate ser permitido no Brasil, não se sabe ao certo se as aves produzidas seguindo os preceitos religiosos apresentam, ou não, qualidade microbiológica equivalente das aves provenientes de abate convencional e nem o impacto do *melichah* sobre os micro-organismos da carne de frango.

A população microbiana em carcaças de frangos é composta por três tipos de micro-organismos: os pertencentes à microbiota inicial da pele da ave; os pertencentes à microbiota transitória, que podem estar na pele e nas penas no momento do abate; e os adquiridos durante o processo de abate (ICMSF, 2005). Essa contaminação microbiana consiste principalmente de bactérias mesófilas,

sendo as mais comuns: *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Listeria*, *Campylobacter* e *Salmonella* (TOMPKIN; MCNAMARA; ACUFF, 2001).

A contagem total dos micro-organismos mesófilos é normalmente empregada para avaliar a qualidade higiênica do produto, a aceitabilidade organoléptica, a adesão às boas práticas de fabricação e, também, como um indicador de segurança microbiológica do alimento. Populações elevadas desses micro-organismos em um produto podem indicar sanificação inadequada, bem como problemas no controle de processo ou de ingredientes (MORTON, 2001).

Poucos são os estudos avaliando a influência dos abates religiosos na população de micro-organismos nas carcaças. Segundo Regenstein e Regenstein (2001) o processo de imersão e salga do abate *Shechita* resulta em um impacto positivo sobre os patógenos presentes na carne. O *United States Department of Agriculture* (USDA) (apud REGENSTEIN; REGEINSTEIN, 2001) reconheceu que o processo reduz a frequência de *Campylobacter* sp.

Hajmeer et al. (1999) observaram que a aplicação de sal em carcaça bovina proveniente de abate *Shechita* é capaz de reduzir a contaminação por *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, coliformes e micro-organismos aeróbios. Os autores verificaram que após a kasherização houve uma redução de 0,11 log₁₀ na população de micro-organismos aeróbios; 0,7 log₁₀ na de coliformes; e 0,09 log₁₀ na de *Escherichia coli*. Já na avaliação de *Salmonella* spp., as quatro amostras positivas para *Salmonella* antes da salga foram negativas após essa etapa.

Oscar (2007), ao avaliar porções de pele de frango artificialmente contaminadas com sorotipos diferentes de *Salmonella* sp., concluiu que a salga associada ao enxágue reduz a persistência de *Salmonella* sp. nessa matriz. Ele verificou ainda que a persistência é sorotipo-dependente, com *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Kentucky apresentando comportamento semelhante, e *Salmonella* Hadar sendo mais sensível.

Estudos sobre o comportamento de bactérias halotolerantes, especialmente o *Staphylococcus aureus*, não foram encontrados. Também não se encontrou referências acerca da influência do abate *Shechita* na população de micro-organismos aeróbios mesófilos em carcaças de frangos.

Segundo Bremner e Johnston (1996) depois de *Salmonella* sp. e de *Campylobacter jejuni*, *S. aureus* é uma das bactérias mais prevalentes em aves. Assim como em outros animais de sangue quente, nas aves os estafilococos estão presentes naturalmente na superfície da pele e na cavidade oral e nasal, mas também em lesões infectadas, e podem ser causa de pneumonia, artrite, osteomielite, dermatite e septicemia (VANDERHAEGHEN et al., 2010). A pele das aves é colonizada durante a ruptura da casca do ovo, ocorrendo aumento da população estafilocócica por toda a vida do animal. Uma pequena quantidade de estafilococos também pode ser encontrada no trato alimentar de aves (MEAD; DODD, 1990).

Em abatedouros, estafilococos podem ser encontrados no ar, na poeira, na água, bem como em superfícies inertes (WIDERSTRÖM et al., 2012). Durante o abate, pode ocorrer um aumento na população de *S. aureus* na etapa de evisceração, na imersão em água no *chiller*, assim como na depenagem (ELLERBROEK, 2004). Os estafilococos presentes na superfície das aves têm sua população reduzida no processo de escalda, mas ocorre recontaminação das carcaças por isolados de *S. aureus* residentes na depenadeira (ICMSF, 2005).

A persistência de *S. aureus* em superfícies inertes é decorrente da produção de substâncias, como por exemplo, biofilme. Essas substâncias podem também proteger o micro-organismo da ação dos sanitizantes. Desta forma a população de *S. aureus* presente em carcaças de frango pode ser constituída por uma mistura de isolados provenientes das aves vivas, que sobreviveram ao processo de escalda, com as cepas endógenas dos equipamentos (ICMSF, 2005).

Em geral, a população de *S. aureus* tende a ser baixa em carne fresca de aves, aumentando com a manipulação inadequada do alimento e subsequente armazenagem em temperatura de abuso (ELLERBROEK, 2004).

No Brasil, Freitas et al. (2004) ao estudarem a presença *S. aureus* em carcaças de frango obtidas de supermercados e de mercados públicos em Recife, constataram que 95,1% (58/61) das amostras continham estafilococos, sendo que 65,6% (40/61) destas apresentaram *S. aureus*. As populações de *S. aureus* em frangos resfriados variaram entre 10 a 10^4 UFC/g de carcaça.

Considerado um dos patógenos não esporulados mais resistente fora do organismo, *S. aureus* difere de outros patógenos devido a capacidade de se multiplicar em atividade de água (a_w) tão baixa quanto 0,83 se submetido a

condições ideais de temperatura (35°C), pH (7 – 7,5) e nutrientes (JAN, 2007; SEO; BOHACH, 2007; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005; BENNETT; MONDAY, 2003).

Quando o umectante utilizado é o NaCl, o micro-organismo pode multiplicar em concentração de 7 a 10% desse sal, havendo relatos de cepas com capacidade de multiplicação em concentrações de até 20% (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005). Esses dados reforçam a importância do controle desse patógeno nos ambientes de salga de alimentos.

A capacidade de *S. aureus* resistir ao estresse osmótico é decorrente, assim como em outras bactérias, da sua capacidade de produzir solutos compatíveis que são acumulados no citoplasma (SEO; BOHACH, 2007). Em *S. aureus*, os níveis dos osmoprotetores prolina e glicina betaína aumentam consideravelmente em resposta ao estresse osmótico (SEO; BOHACH, 2007).

Uma outra característica importante desse micro-organismo é a capacidade que algumas cepas têm de produzir enterotoxina estafilocócica (SE) quando em condições ideais, o que torna sua presença e multiplicação em alimentos um perigo potencial ao consumidor (BENNETT; MONDAY, 2003). Os surtos de enfermidades transmitidas por alimentos (ETA) provocados por *Staphylococcus* sp. ocorrem quando há ingestão de enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas no alimento, gerando intoxicação alimentar.

Uma vez que a produção de enterotoxina por *S. aureus* é de difícil avaliação laboratorial, busca-se a detecção de outras características que possam auxiliar na identificação de isolados enterotoxigênicos. A detecção da produção da enzima coagulase por isolados de *Staphylococcus* enterotoxigênicos foi, por muitos anos, considerada como ferramenta laboratorial bastante útil. Entretanto, avanços nos estudos indicam que tanto espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva quanto negativas podem ter capacidade de produzir SE (JAN, 2007; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005). Dentre as espécies de *Staphylococcus* produtoras potenciais de SE, positivas na prova da coagulase, pode-se destacar: *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*. Como exemplos de *Staphylococcus* não produtores de coagulase produtores potenciais de SE, tem-se: *S. caprae*, *S. chromogenes*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. lentus*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. warneri* e *S. xylosus* (HENNEKINNE et al., 2010; JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005). Apesar de várias espécies de *Staphylococcus* produzirem SE, quase todos os casos de surtos

de ETA provocados por *Staphylococcus* são atribuídos a *Staphylococcus aureus* (SEO; BOHACH, 2007).

No momento, são reconhecidos 22 tipos de enterotoxinas estafilocócicas: as clássicas SEA, SEB, SEC (com as variantes SEC1, SEC2, SEC3, SEC ovina e SEC bovina), SED e SEE; e os novos tipos de SE (SEG, SEH, SEI, SER, SES, SET) e SEL (SELJ, SELK, SELL, SELM, SELN, SELO, SELP, SELQ, SELU, SELU2 e SELV). Foi padronizado que a nomenclatura das toxinas estafilocócicas deva ser relacionada com a atividade emética, ou seja, os superantígenos que provocam emese em primatas são denominados SE, e as toxinas que não possuem atividade emética, ou ainda não foram testadas, são designadas com *Staphylococcal Enterotoxin-Like* (SEL) (ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010). Vale ressaltar que um mesmo isolado de *S. aureus* pode produzir diferentes SE (BERGDOLL, 1990).

As enterotoxinas estafilocócicas fazem parte de uma família denominada toxinas pirogênicas (PT). Uma característica em comum das toxinas pertencentes a essa família é a habilidade de agir como superantígenos, ou seja, possuem a capacidade de ativar uma grande percentagem de linfócitos T, o que pode levar a choque, imunossupressão e outras anormalidades do sistema imune. Embora seja considerada uma PT, a característica de induzir resposta emética após ingestão oral a distingue das outras toxinas pertencentes ao grupo (SEO; BOHACH, 2007).

Uma vez ingeridas, as enterotoxinas estafilocócicas resistem ao pH estomacal e, ao chegarem no intestino, estimulam as terminações nervosas, transmitindo o estímulo até o nervo vago e posteriormente ao centro do vômito localizado no cérebro. As enterotoxinas também são capazes de penetrar no intestino e ativar respostas imunes locais, sendo responsáveis por lesões no trato gastrointestinal, especialmente o estômago e a porção inicial do intestino. A liberação de mediadores inflamatórios (histamina, leucotrienos e substância P) também pode provocar emese (ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010).

Apesar de pouco frequente em intoxicações estafilocócicas, a diarreia pode ocorrer devido à inibição da reabsorção de água e eletrólitos no intestino delgado (ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010). Os sintomas normalmente encontrados em intoxicações estafilocócicas são: náusea, vômitos, dores abdominais, dores de cabeça, prostração, sendo baixa a mortalidade. Em média, os sinais clínicos da intoxicação aparecem após 1 a 6 horas da ingestão do alimento contaminado (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

Apesar de o micro-organismo ser termo-sensível, a toxina produzida é extremamente resistente ao calor e uma vez produzida no alimento sua inativação é muito difícil (JAN, 2007; SEO; BOHACH, 2007). Estima-se que a atividade biológica da SEB só seja perdida depois de aquecimento por 16 horas a 60°C e em pH 7,3 (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005).

Segundo Seo e Bohach (2007), alguns estudos mostram que em cultivo SED e SELJ são as toxinas mais comumente encontradas, seguidas de SEC, SEA e SEB. Considerada como a principal causa de ETA causadas por *S. aureus*, a SEA, associada ou não com outras SE e SEL, é a enterotoxina mais relatada em alimentos, possivelmente devido à sua extraordinária resistência às enzimas proteolíticas (ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010). As SEB, SEC e SED também são implicadas em surtos de origem alimentar em todo o mundo. Das toxinas clássicas, apenas a SEE não é frequentemente isolada de alimentos, sendo raramente associada com surtos de ETA; dentre as novas enterotoxinas, apenas a SEH está claramente envolvida em surtos de ETA. A relação das outras SE e SEL com ETA ainda não está bem esclarecida (ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010).

A produção de enterotoxinas ocorre principalmente no final da fase exponencial e no início da fase estacionária de multiplicação bacteriana, quando as condições de tempo e temperatura são favoráveis (SEO; BOHACH, 2007), exceto para SEA, em que a produção ocorre em todas as fases da multiplicação microbiana (YARWOOD; SCHLIEVERT, 2001).

Acredita-se que a regulação temporal da expressão da maioria dos genes das SE seja realizada pelo sistema *agr* (*accessory gene regulator*). Isso porque durante o ciclo de multiplicação bacteriana ocorre a expressão de *agr* simultaneamente com a produção de muitas SE (SEO; BOHACH, 2007). Além disso, mutações no locus *agr* resultam na diminuição da expressão de muitas enterotoxinas e outras exoproteínas. Apesar da maioria dos genes de SE serem regulados pelo sistema *agr*, SEA e SEJ não são regulados por este sistema, já que a produção destas SE é constitutiva e aparentemente não regulada (SEO; BOHACH, 2007; YARWOOD; SCHLIEVERT, 2001; ZHANG; STEWART, 2001). Segundo Lis (2012), a produção de SEH tem comportamento similar às enterotoxinas não reguladas pelo sistema *agr*, já que a produção de SEH começa no início da fase exponencial.

A maioria dos genes codificadores de SE e SEL estão localizados em elementos genéticos móveis (plasmídeos, profagos, ilhas de patogenicidade - SaPIs)

(ARGUDÍN; MENDOZA; RODICIO, 2010; ALOUF; MÜELLER-ALOUF, 2002), o que torna possível a transmissão do gene codificador de enterotoxinas entre bactérias. Já os genes para SEG e SEI estão agrupados em um operon do cromossomo denominado *enterotoxin gene cluster* (egc), que também contém os genes codificadores de SELM, SELN, SELO e os pseudogenes ϕ ent1 e ϕ ent2 (SEO; BOHACH, 2007). Ocasionalmente os genes codificadores de SELU2 e SELV podem fazer parte do egc (THOMAS et al., 2006). A localização genética de alguns genes codificadores de enterotoxinas está indicada no quadro 1.

QUADRO 1 – Localização dos genes codificadores para algumas SE.

Gene	Localização genética
<i>sea</i>	Profago
<i>seb</i>	Cromossomo, plasmídeo, transposon, ilha de patogenicidade
<i>sec1</i>	Plasmídeo
<i>sec_{bov}</i>	Ilha de patogenicidade
<i>sed</i>	Plasmídeo
<i>see</i>	Fago defectivo
<i>seg</i>	<i>egc</i> , cromossomo
<i>sei</i>	<i>egc</i> , cromossomo
<i>selj</i>	Plasmídeo
<i>selk</i>	Ilha de patogenicidade
<i>sell</i>	Ilha de patogenicidade
<i>selm</i>	<i>egc</i> , cromossomo
<i>seln</i>	<i>egc</i> , cromossomo
<i>selo</i>	<i>egc</i> , cromossomo
<i>selp</i>	Fago
<i>ser</i>	Plasmídeo
<i>ses</i>	Plasmídeo
<i>set</i>	Plasmídeo
<i>selu</i>	<i>egc</i> , cromossomo
<i>selv</i>	<i>egc</i> , cromossomo

Adaptado de: Le Loir et al., 2003; Seo e Bohach, 2007; Derzelle et al. (2009)

Existem relatos da existência de plasmídeos carreadores de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas (especialmente *seb* e *sec*) que também possuem genes de resistência à penicilina e a cádmio. Isso pode ocorrer somente com algumas cepas de *Staphylococcus* sp., pois os genes *seb* e *sec* também podem ser encontrados em ilhas de patogenicidade (SEO; BOHACH, 2007).

A resistência genética de *Staphylococcus* sp. isolados de alimentos a metais pesados e a agentes antimicrobianos usados em tratamentos clínicos têm despertado a atenção de muitos pesquisadores. Isso porque vários antibióticos são amplamente utilizados na produção de aves como promotores de crescimento e, também, no tratamento clínico.

Antibióticos são utilizados como promotores de crescimento com a finalidade de regular a microbiota intestinal de aves, auxiliando na redução de lesões e de espessamento da mucosa intestinal provocados por patógenos. Isso irá contribuir com maior absorção e digestibilidade dos nutrientes ingeridos, além de diminuir os gastos energéticos provocados pelas necessidades inerentes ao processo infeccioso. Com isso, ocorre aumento no ganho de peso dos animais e melhoria na conversão alimentar (PALERMO-NETO; ALMEIDA, 2011).

Alguns autores relatam que essa prática possa trazer riscos à saúde humana porque, ao ingerir o alimento, pode ocorrer: modificação da microbiota do trato gastrointestinal humano pela presença de resíduos de antibióticos, se não respeitado o tempo de carência necessário para cada antibiótico durante a produção primária; transmissão de patógenos resistentes de animais para humanos, o que dificultaria tratamentos clínicos posteriores; e transmissão de cepas mutantes resistentes a antibióticos originárias em animais (PALERMO-NETO; ALMEIDA, 2011).

É importante ressaltar que os antibióticos utilizados como promotores de crescimento não são os mesmos utilizados no tratamento clínico de humanos. No Brasil, é permitido o uso dos seguintes antimicrobianos como aditivos zootécnicos em avicultura: avilamicina, bacitracina, sulfato de colistina, cloridrato de clorexidina, enramicina, flavomicina, halquinol, lincomicina, tilosina e virginamicina, com suas respectivas restrições de uso. Os antimicrobianos nafenicóis, tetraciclina, β -lactâmicos (benzilpenicilâmicos e cefalosporinas), quinolonas e sulfonamidas sistêmicas têm sua utilização como aditivos zootécnicos vedada (BRASIL, 2009).

Para uso terapêutico, entretanto, são permitidos os antibióticos: ácido nalidíxico, ácido oxolínico, aivlosin, amoxicilina, ampicilina, apramicina, bacitracinas (de zinco e metileno dissalicilato), benzilpenicilina (benzatina, potássica e procaína), ceftiofur, ciprofloxacina, clortetraciclina, colistina, danofloxacina, di-hidroestreptomicina, dimerazol, doxiciclina, enrofloxacina, eritromicina, espectinomicina, espiramicina, estreptomicina, etopabato, florfenicol, flumequina, fosfomicina, furaltadona, gentamicina, josamicina, canamicina, leucomicina, lincomicina, narasina, neomicina, norfloxacina, oxitetraciclina, sulfacloropiridazina, sulfadiazina e sulfadimetoxina, sulfamidina, sulfadoxina, sulfaguanidina, sulfaidoxol, sulfamerazina, sulfametazina, sulfametoxazol, sulfametoxipiridazina, sulfaquinoxalina, sulfatiazol, tetraciclina, tiamulin, tianfenicol, tilmicosina e tilosina (BRASIL, 2009). Vale lembrar que em animais de produção não é realizado o tratamento do indivíduo doente e sim da população, levando-se em consideração que outros animais possam ficar doentes por dividirem o mesmo ambiente, o que levaria a prejuízos econômicos (PALERMO-NETO; ALMEIDA, 2011).

Devido ao uso de beta-lactâmicos na terapêutica de animais de produção, existe uma preocupação crescente com o surgimento de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e com a possibilidade do aparecimento em alimentos de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à vancomicina (VRSA) pelo uso da avoparcina. Este último antibiótico, um glicopeptídeo, pertencente à mesma classe que a vancomicina, teve o uso proibido em vários países, inclusive o Brasil, devido à associação de seu uso com o surgimento de enterococos resistentes à vancomicina (ERV) (PALERMO-NETO; ALMEIDA, 2011).

S. aureus produzem cinco proteínas ligadoras de penicilina (PBP), entretanto somente três delas são inibidas pelos betalactâmicos. Os isolados MRSA, que apresentam resistência a essa classe de antibióticos, produzem uma PBP suplementar denominada PBP2a ou PBP2', que possui baixa afinidade aos antibióticos betalactâmicos. A presença da PBP2a é suficiente para sintetizar quantidade de peptidoglicano necessária para a sobrevivência da célula bacteriana. Essa proteína é codificada pelo gene *mecA*, que está localizado no cromossomo bacteriano (BRYSKIER, 2005).

No tratamento de infecções por MRSA, como alternativa ao uso dos betalactâmicos, a vancomicina é o antimicrobiano de eleição. Entretanto, várias cepas de *S. aureus* com sensibilidade reduzida à vancomicina estão sendo

encontradas em todo o mundo (PESAVENTO et al., 2005). Diferente dos MRSA, os VRSA possuem duas formas de resistência identificadas até o momento: diminuição da sensibilidade à vancomicina devido a alterações na biossíntese de peptidoglicano; e transferência por conjugação do operon *vanA* de *Enterococcus faecalis* para *S. aureus* (LOWY, 2003).

Nos últimos anos, cepas de MRSA de origem humana foram encontradas em animais e, mais recentemente, cepas de origem animal (CC398 ou LA-MRSA) foram isoladas de infecções de pessoas que entraram em contato com suínos e aves (VANDERHAEGHEN et al., 2010).

Conforme apresentado no quadro 2, vários estudos foram realizados para detectar a prevalência de MRSA em aves. O primeiro relato ocorreu na Coreia do Sul e estava relacionado com animais com artrite. Outros relatos ocorreram na Holanda, na Bélgica, na Jordânia, mas não foi encontrado estudo brasileiro sobre a presença de MRSA em aves.

De acordo com Normanno et al. (2007), mesmo quando presentes em pequenas populações em alimentos, os MRSA podem constituir um risco aos consumidores, em especial aos imunocomprometidos. Apesar de não haver diferença clínica entre a intoxicação estafilocócica provocada por cepas MRSA e MSSA (*Staphylococcus aureus* sensível à meticilina), pode haver colonização intestinal pelas cepas de MRSA provenientes de alimentos. Além disso, os alimentos podem levar à colonização e infecção por MRSA extra-intestinal. Isso ficou comprovado com a detecção de MRSA em pacientes em um hospital da Holanda devido à ingestão de bananas descascadas e contaminadas por um manipulador portador de MRSA. Nesse estudo, ao pesquisar a origem de um surto de infecção por MRSA no centro cirúrgico de um hospital, os autores verificaram, por análise do perfil PFGE, que a cepa foi veiculada por uma enfermeira. Essa enfermeira tratava uma paciente imunodeprimida, que foi a óbito em decorrência de sepse provocada por MRSA. A fonte da infecção dessa paciente foram bananas contaminadas com o micro-organismo, que ultrapassou a barreira do estômago da paciente devido à ingestão excessiva de antiácidos, atingindo a corrente sanguínea. O mesmo clone de MRSA isolado do centro cirúrgico, da enfermeira e da paciente foi encontrado no funcionário responsável por descascar as bananas, que não possuía outro contato com o hospital (KLUYTMANS et al. 1995).

QUADRO 2 – Detecção de MRSA em aves.

Origem do isolado	Frequência (%)	País	Referência
Swab de cavidade oral e nasal, pele abaixo da asa e cloaca	7,20 (18/250)	Bélgica	Pletinckx et al., 2011
Carne e produtos de carne de frango do varejo	23,20 (10/43)	Alemanha	Fessler et al. 2011
Coxa e peito de frango adquiridos no varejo	2,21 (3/136)	Estados Unidos	Waters et al, 2011
Swab de cavidade oral e nasal de aves	6,91 (28/405)	Holanda	Mulders et al., 2010
Swabs de cloaca e cavidade nasal de frangos de corte	6,40 (8/125)	Bélgica	Persoons et al., 2009
Swabs de carcaças de frango	3,21 (7/218)	Jordânia	Quddoumi, Bdour e Mahasneh, 2006
Carne e articulações de aves	1,01 (3/296)	Coreia do Sul	Lee, 2003

A importância epidemiológica de *S. aureus* está relacionada com sua alta prevalência em surtos de ETA no Brasil. De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 2009), entre 1999 e 2008 foram notificados no país 6.062 surtos de ETA, sendo que em 2.974 os agentes foram identificados. *S. aureus* foi um importante agente, causando 20% desses surtos cujos agentes foram identificados. Entretanto, a notificação da intoxicação estafilocócica, bem como de outras ETA, exceto cólera e botulismo, não é considerada compulsória no Brasil (STAMFORD et al., 2006), o que sugere que estes dados sejam subestimados.

Apesar da importância de *S. aureus* como agente de ETA, não há estudos disponíveis em relação a este micro-organismo após o processo de salga no abate *Shechita* em frangos. O Brasil como um país produtor deste tipo de carne deve ter respaldo científico que assegure a qualidade microbiológica desses produtos.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivos:

2.1 Objetivos gerais

- Verificar a frequência de *Staphylococcus aureus* nas carcaças de frango *kosher* do abatedouro estudado;
- Avaliar a influência do processo de salga realizado em carcaças de frango provenientes de abate *Shechita* na população de *Staphylococcus aureus* e de micro-organismos aeróbios mesófilos;

2.2 Objetivos específicos

- Identificar fenotipicamente os isolados de *Staphylococcus* não produtores de coagulase para determinar as espécies de *Staphylococcus* mais frequentes em frangos *kosher*;
- Avaliar o perfil enterotoxigênico dos isolados de *S. aureus* e de *Staphylococcus* não produtores de coagulase isolados de frangos *kosher*;
- Caracterizar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de isolados de *S. aureus* e de *Staphylococcus* não produtores de coagulase;
- Verificar a ocorrência de MRSA nas carcaças de frango do abatedouro estudado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

Entre os meses de julho de 2010 e junho de 2011 foram realizadas 13 visitas para coleta de amostras em um abatedouro da cidade de São Paulo, que realiza o abate *Shechita* sob inspeção do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Esse abatedouro tem capacidade para abater 2.000 aves/dia.

Foram retiradas da linha de abate 152 carcaças imediatamente antes da etapa de salga do *melichah*, após a imersão em água (Ponto 1), e outras 152 carcaças foram retiradas após dessalga completa (Ponto 2), conforme apresentado na figura 1, totalizando 304 carcaças analisadas.

Cepas padrão de *Staphylococcus aureus* foram utilizadas como controles positivo e negativo, sendo indicadas nas descrições dos diferentes estudos. Todos os meios de cultura utilizados nas análises foram da marca Oxoid.

3.2 Métodos

3.2.1 Coleta de amostras

A coleta de amostras foi realizada pela técnica de enxágue, de acordo com Miyagusku et al. (2003). As carcaças foram acondicionadas em embalagens plásticas contendo 500 mL de solução salina (NaCl 0,85% p/v), sendo massageadas durante 2 minutos e retiradas a seguir, voltando à linha de processamento. O caldo obtido foi transportado ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP em caixa isotérmica contendo gelo reciclável.

Todas as aves amostradas foram pesadas e tiveram suas temperaturas aferidas com a utilização de termômetro tipo espeto imediatamente depois de serem retiradas da linha de abate. Em todas as coletas foi também verificada a temperatura da sala de salga, através do termômetro do próprio abatedouro localizado dentro dessa sala. Registrou-se ainda o nível de cloro e o pH da água utilizada nos tanques de dessalga, conforme controles da própria empresa.

3.2.2 Determinação da população de *S. aureus*

Das 304 amostras coletadas, 176 foram examinadas diretamente (amostras não centrifugadas) e 128 foram submetidas à concentração por centrifugação (item 3.2.2.2).

3.2.2.1 A partir das amostras não centrifugadas

A partir de 176 amostras obtidas conforme 3.2.1, sendo 88 de cada ponto de amostragem, foram realizadas diluições decimais seriadas consecutivas em solução salina (NaCl 0,85% p/v) e uma alíquota de 1 mL dessas diluições, bem como da amostra original, foram inoculadas nas placas Petrifilm™ Staph Express count (3M™), segundo recomendação do fabricante. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h $\pm$ 2 h e, após a contagem das colônias nas placas, selecionaram-se aquelas que apresentavam colônias características de *S. aureus*, de cor vermelho-violeta, bem como as que apresentavam entre 15 e 150 colônias pretas (que podem ou não ser *S. aureus*) e azul-esverdeadas (não são *S. aureus*) para a realização do teste de produção de DNase.

A prova da DNase foi realizada com a colocação do Petrifilm™ Staph Express Disk sobre o crescimento existente nas placas Petrifilm™, com a reposição do filme superior e incubação a 37°C por 1 a 3 h. São consideradas produtoras de DNase as colônias que apresentam um halo cor-de-rosa. Na figura 2 tem-se a representação esquemática da metodologia empregada.

Como controle positivo foi utilizada a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 (Oxoid).

A população de *S. aureus* foi calculada levando-se em consideração o volume e a diluição inoculada, e o peso da carcaça de frango, sendo os resultados expressos em UFC/g.

Todas as colônias positivas para a prova de DNase, bem como as colônias vermelho-violeta e três colônias pretas (de cada amostra) negativas na prova da DNase foram selecionadas e transferidas para caldo infusão de cérebro e coração (BHIB), e incubadas a 37°C por 24 h. A seguir, foram adicionadas de 20% de glicerol e mantidas a -70°C para identificação posterior.

FIGURA 2 – Representação das etapas realizadas para a enumeração de *S. aureus* em amostras de frangos.

3.2.2.2 A partir das amostras centrifugadas

Para 128 amostras, metade coletada em cada ponto, realizou-se a centrifugação do caldo de lavagem obtido conforme 3.2.1.

As amostras foram transferidas para frascos estéreis (Nalgene®) e centrifugadas por 15 min a 1000g na temperatura de 5°C (Centrífuga Sorvall Instruments, RC-5B, rotor GSA, Dupont, EUA). O sobrenadante foi desprezado e foi realizada a ressuspensão do *pellet* em 50 mL de solução salina (NaCl 0,85% p/v). Foram realizadas diluições decimais seriadas no mesmo diluente seguidas de semeadura em placas conforme 3.2.2.1. Na figura 3 tem-se a representação da metodologia empregada.

Os procedimentos de enumeração e identificação de *S. aureus*, bem como a metodologia de armazenamento dos isolados foram semelhantes aos descritos em 3.2.2.1. Para o cálculo da população levou-se em consideração também a concentração da amostra.

3.2.3 Determinação da população de micro-organismos aeróbios mesófilos

Das 304 amostras coletadas (3.2.1), 216 (110 obtidas antes da etapa de salga e 116 obtidas após a dessalga) foram submetidas à enumeração de micro-organismos aeróbios mesófilos com o emprego de placas Petrifilm™ Aerobic Count Plate (AC), incubadas a 37°C por 48 h $\pm$ 3 h. Procedeu-se à contagem das colônias de coloração avermelhada naquelas placas que apresentavam entre 25 a 250 colônias. Na figura 4 tem-se a representação da metodologia da enumeração da população de mesófilos.

O resultado foi expresso em UFC/g da amostra levando-se em consideração a diluição empregada e o peso da carcaça.

FIGURA 3 – Representação do procedimento de enumeração da população de *S. aureus* a partir de amostras centrifugadas.

FIGURA 4 – Representação da metodologia empregada para enumeração da população de mesófilos.

3.2.4 Confirmação da identidade dos isolados

3.2.4.1 Identificação fenotípica

Para identificação foram selecionadas colônias típicas (vermelho-violeta, com ou sem halo na prova de DNase, e pretas com halo na prova da DNase) e colônias atípicas (colônias pretas sem halo na prova da DNase).

3.2.4.1.1 Colônias típicas

Para confirmação da identidade foram selecionadas 49 colônias, sendo 42 colônias vermelho-violeta (seis delas negativas na prova da DNase) e sete colônias pretas que apresentaram resultados positivos no teste de DNase.

A partir do estoque congelado os cultivos foram semeados superficialmente, por esgotamento, em placas contendo ágar infusão de cérebro e coração (BHIA), que foram incubadas a 37°C por 18 a 24 h. De cada placa, uma colônia isolada foi submetida à avaliação da produção da coagulase, segundo recomendações de Bennett e Lancette (2001). A colônia isolada foi transferida para tubo contendo caldo BHI (BHIB) que foi incubado a 37°C por 24 h. Uma alíquota de 0,1 mL foi transferida para um tubo estéril e foram adicionados 0,3 mL de plasma liofilizado de coelho com EDTA (Coagu-Plasma - Laborclin). Os tubos foram homogeneizados e incubados a 37°C por seis horas. Ao final das seis horas, avaliou-se a ocorrência de coagulação, segundo critérios de Lancette e Bennett (2001). Quando não havia coagulação, os tubos eram reincubados por 18 h adicionais para avaliação da possível presença de *Staphylococcus* que produzem tardiamente a enzima coagulase. Foram considerados *Staphylococcus aureus* apenas os isolados que apresentaram reação positiva de níveis 3+ e 4+, de acordo com Lancette e Bennett (2001). Na figura 5 tem-se a representação dos resultados possíveis para a prova da coagulase.

Figura 5 – Representação dos resultados possíveis para a prova de produção de coagulase

Fonte: <http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/res-rech/analy-meth/microbio/volume1/mfo22-eng.php>

Esses cultivos foram também submetidos à coloração de Gram para verificação da morfologia. Para esta técnica, colônias isoladas provenientes de placas contendo BHIA, incubadas a 37°C por 18 a 24 h, foram transferidas para lâminas de vidro e espalhadas em uma gota de água destilada com o auxílio de alça de inoculação. O material foi fixado na lâmina com calor até secagem completa. As superfícies das lâminas foram cobertas com corante primário (violeta genciana), deixadas em repouso por um minuto, sendo lavadas a seguir. O mesmo procedimento foi repetido para a aplicação do fixador (lugol), do descolorante (álcool) e do corante secundário (fucsina básica). As lâminas foram observadas na objetiva de imersão em microscópio óptico (Axio Lab A1 - Carl Zeiss®). Foram considerados com morfologia típica de estafilococos os cultivos que apresentaram formato de cocos, arranjados em grupos semelhantes a cachos de uva e de coloração roxa (Gram positivas).

Complementarmente os cultivos tiveram sua identidade confirmada pela utilização do kit API Staph (bioMérieux), segundo recomendação do fabricante. A partir do cultivo congelado semearam-se, por esgotamento, placas de BHIA que foram incubadas a 37°C por 18 a 24 h. Colônias foram transferidas para o diluente que acompanha o teste (API Staph Medium), de forma a obter uma suspensão de inóculo com turvação semelhante à escala 0,5 de Mac Farland. Os microtubos foram inoculados e as galerias foram incubadas a 37°C por 18 a 24 h. Para os testes de “Arginina Dehidrolase” (ADH) e de “Urease” (URE) foram adicionadas gotas de parafina líquida, de forma a obter um menisco convexo, com a finalidade de criar um

ambiente de anaerobiose. Passado o período de incubação, os reagentes para os testes de “Redução de nitratos em nitritos” (NIT), “Fosfatase Alcalina” (PAL) e “Produção de acetil metil-carbinol – Voges Proskauer” (VP) foram adicionados e os resultados foram anotados em fichas específicas. Na figura 6 tem-se a representação esquemática da metodologia empregada.

Para complementar a identificação empregando as galerias API Staph, foi realizado o teste de resistência à lisostafina de acordo com Bennett e Lancette (2001). Colônias isoladas obtidas de placas contendo BHIA foram transferidas para um tubo contendo 0,2 mL de tampão fosfato salina 0,02M. Após agitação, metade do conteúdo foi transferida para um tubo estéril, no qual foram adicionados 0,1 mL de tampão fosfato salina como controle e, no tubo de teste, foram adicionados 0,1 mL de solução de lisostafina (25 µg /mL). Os tubos foram incubados a 37°C por 2 horas. O teste foi considerado positivo, ou seja, isolado resistente à lisostafina, quando os tubos controle e teste apresentaram turbidez semelhante e, negativo (isolado sensível à lisostafina), quando a suspensão bacteriana em contato com a lisostafina ficou mais translúcida.

Como controle positivo do API Staph e do teste de resistência à lisostafina foi utilizada a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923. Na figura 7 tem-se a representação esquemática do teste de resistência à lisostafina.

A identificação final foi realizada com a inserção manual dos resultados do API Staph e do teste de resistência à lisostafina no sistema de identificação apiweb™ da bioMérieux.

Para complementar os resultados obtidos no API Staph, utilizou-se o sistema automatizado VITEK 2 GP (bioMérieux) somente para as colônias que apresentaram coloração vermelho-violeta. Placas contendo BHIA foram semeadas, por esgotamento, a partir de colônias isoladas e foram incubadas a 37°C por 18 a 24 h. Colônias isoladas foram transferidas para tubos contendo 0,5 mL de solução salina, de forma a obter uma suspensão de inóculo com turvação semelhante à escala 0,5 de Mac Farland. Cartões de identificação foram colocados em contato com o inóculo e inseridos no equipamento VITEK 2 GP. Neste método, a leitura é realizada automaticamente por colorimetria e os resultados são analisados por um software fornecido pelo fabricante. Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo.

FIGURA 6 – Representação esquemática do sistema de identificação pelo kit bioquímico API Staph (bioMérieux, França).

FIGURA 7 – Representação esquemática da metodologia empregada no teste de avaliação da resistência à lisostafina.

3.2.4.1.2 Colônias atípicas

De cada amostra, foram selecionadas para identificação três colônias pretas provenientes das placas de Petrifilm™ (consideradas atípicas). Foram selecionadas aproximadamente 890 colônias atípicas para a pesquisa de *Staphylococcus* não produtores de coagulase.

A partir do estoque congelado os cultivos foram semeados superficialmente, por esgotamento, em placas contendo BHIA de forma a obter colônias isoladas. Uma colônia de cada amostra foi submetida à coloração de Gram e ao teste de produção de coagulase, conforme descrito em 3.2.4.1.1. Os isolados que não possuíam características de estafilococos foram descartados e outro isolado da mesma amostra foi reativado, e assim sucessivamente até terminarem os isolados selecionados daquela amostra.

Um cultivo representativo de cada amostra, com características morfológicas de estafilococos, foi submetido à identificação pelo kit API Staph e ao teste de

resistência à lisostafina, conforme descrito em 3.2.4.1.1. Quando o isolado não pertencia ao gênero *Staphylococcus* ou o sistema de identificação apontava identificação inaceitável ou inferior a 70%, outro isolado era retirado do estoque para identificação. Foram testados com o API Staph 308 isolados coagulase negativa.

3.2.4.2 Identificação genotípica

Os isolados identificados pelo API Staph e pelo VITEK como *S. aureus* foram submetidos à pesquisa do gene *nuc*, com *primers* específicos para *S. aureus*. Esses ensaios foram realizados no Laboratório de Microbiologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

3.2.4.2.1 Extração de DNA

O método de extração de DNA utilizado foi de acordo com o protocolo de extração adaptado de Zhang et al. (2005) e padronizado no Laboratório de Microbiologia Clínica da FCF-USP. Em um Eppendorf de 1,5 mL foram adicionados 73,2 µl de água desmineralizada estéril, 1 µl de TRIS 1M pH 7,5, 10 µl de solução de EDTA 0,5 M pH 8,0 e 16,4 µl de lisostafina (1 mg/mL). Colônias provenientes de placas contendo BHIA foram adicionadas a essa solução em quantidade suficiente para obter concentração do DNA diluído maior que 10 ng/µL ao final da extração. Após homogeneização em vórtex, os Eppendorfs foram colocados em banho-maria a 37°C por 1,5 h, para digestão da parede celular pela lisostafina. A seguir, o conteúdo foi tratado em água fervente (100°C) por 10 minutos, com o objetivo de romper a membrana celular bacteriana. Após a adição de 900 µl de água desmineralizada estéril, os tubos foram agitados em vórtex e centrifugados por 10 minutos a 15.682g (Centrifuge 5415R Eppendorf) a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro Eppendorf e o DNA obtido foi submetido à diluição decimal. Os DNA concentrados e diluídos foram armazenados a -20°C para utilização em todos os ensaios genotípicos desse estudo.

3.2.4.2.2 Pesquisa do gene *nuc* por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para amplificação do gene *nuc* foram utilizados os *primers forward* 5'GCCACGTCCATATTTATCAG3' e *reverse* 5'TATGGTCCTGAAGCAAGTG3' descritos por Almeida et al. (2011).

Para a PCR, foram preparadas soluções de 25 µL contendo: tampão para PCR 1x [Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM KCl] (Fermentas); 2,5 mM de MgCl₂ (Fermentas); 0,2 mM de cada dNTP (Fermentas); 250 nM de cada *primer*; 0,5 U de *Taq* DNA Polimerase (Fermentas); 2 µL do DNA diluído (3.2.4.2.1) e água desmineralizada estéril suficiente.

As amostras foram submetidas à amplificação (Veriti Thermal Cycler 6.5 – Applied Biosystems) empregando as seguintes condições: um ciclo a 94°C / 5 min, 30 ciclos a 95°C / 30 seg, 55°C / 1 min e 72°C / 2 min. A reação foi concluída com um ciclo de cinco minutos a 72°C, sendo então os tubos mantidos a 4°C até o momento de avaliação ou armazenados a -20°C para realização da eletroforese. Como controle negativo utilizou-se água desmineralizada estéril em substituição ao DNA; e como controle positivo a cepa MRSA 1968, cedida pela professora Elsa Mamizuka do Laboratório de Microbiologia Clínica da FCF da USP.

3.2.4.2.3 Visualização do produto de amplificação

Para visualização dos fragmentos amplificados foi realizada a eletroforese em gel de agarose 1% [agarose padrão de baixa eletroendosmose (Agargen®) em tampão TBE 1x (Tris base 890 mM; EDTA 25 mM; ácido bórico 89 mM)]. Para realização da eletroforese, a 8 µL do produto de amplificação foram adicionados 1 µL de solução tampão (azul de bromofenol 0,25%; xileno cianol FF 0,25%; glicerol 30%) e 1 µL de solução de GelRed™ (Biotium®) na concentração 1:1.000. Como padrão de peso molecular foi utilizado o marcador de 100pb (DNA Ladder - Fermentas®). A separação foi realizada a 100 V, 400 mA, por 65 min em cuba (Horizon 11-14 - Life Technologies) contendo TBE 1x. O gel foi avaliado sob transiluminação com luz ultravioleta no equipamento Alpha Digi Doc® Pro (Alpha Innotech).

3.2.5 Simulação do *melichah* em laboratório

3.2.5.1 Preparo do inóculo

Foram realizadas curvas de crescimento para estudar o comportamento de *S. aureus* ao longo do tempo. Para isso, a cepa ATCC® *Staphylococcus aureus* 25923 foi semeada por esgotamento em placas contendo BHIA, que foram incubadas a 37°C por 24 horas. Três colônias de tamanhos semelhantes foram transferidas para um erlenmeyer contendo 100 mL de BHIB, o qual foi mantido a 37°C sob agitação (150 rpm; *incubator shaker Innova* 4000) por 7 horas. A partir da segunda hora, alíquotas de 1 mL foram retiradas, submetidas à diluição decimal seriada e inoculadas por profundidade em BHIA. O mesmo procedimento foi repetido com intervalos de uma hora, até a sétima hora. As placas foram incubadas a 37°C por 18 a 24 horas. Procedeu-se a contagem das colônias nas placas que apresentaram entre 20 e 200 colônias. Os resultados foram transferidos para o programa Excel® para obtenção da curva. Esse procedimento foi repetido três vezes para obtenção de uma curva média de crescimento de *S. aureus*.

Para o preparo do inóculo, três isolados de *S. aureus* provenientes dos frangos avaliados neste estudo, obtidos de três coletas diferentes, foram submetidos ao mesmo processo descrito anteriormente ficando incubados por 4 horas, a fim de obter cultivo no início da fase estacionária da curva de crescimento bacteriano. Uma alíquota de 1 mL de cada cultura foi transferida para um tubo estéril para obtenção de um *pool* e, após homogeneização, 1 mL deste *pool* foi submetido à diluição decimal para a obtenção de uma população de aproximadamente 10^7 UFC/mL.

3.2.5.2 Contaminação dos cortes de aves

Sobrecoxas de frango convencional, congeladas individualmente, foram adquiridas no varejo e deixadas sob refrigeração por 24 h para descongelamento. A cada dia de ensaio nove sobrecoxas foram contaminadas superficialmente com 0,1 mL do cultivo preparado conforme 3.2.5.1., de modo a obter aproximadamente 10^6 UFC/peça. Os cortes foram deixados em repouso por 15 minutos em capela de fluxo laminar e uma peça foi submetida à técnica de enxágue (MIYAGUSKU et al., 2003)

empregando 100 mL de solução salina (NaCl 0,85% p/v). Foram realizadas diluições decimais seriadas consecutivas e uma alíquota de 1 mL de cada diluição foi inoculada em placas Petrifilm™ Staph Express count. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas $\pm$ 2 horas.

As outras oito amostras foram transferidas para um recipiente de aço inoxidável estéril contendo água potável gelada, e foram mantidas nesse recipiente durante 30 minutos, para simular a imersão em água realizada no *melichah*. A temperatura da água foi mantida entre 0 e 4°C, de acordo com o recomendado pela legislação brasileira para imersão das carcaças em *chiller* (BRASIL, 1998). Também foram verificados o pH e o cloro residual da água utilizada no recipiente, com a utilização do papel indicador de pH (Merck®) e do teste de cloro com reagente líquido Microquant (Merck®), respectivamente.

Em seguida, as sobrecoxas de frango foram submetidas à etapa de salga, exceto as duas sobrecoxas que foram utilizadas como controle. Os cortes foram salgados manualmente com sal de granulação média (o mesmo utilizado no abatedouro que realiza o abate *Shechita*), e colocados em superfícies que permitissem o escoamento de líquidos em vasilhas descartáveis de alumínio. Em cada vasilha foram colocadas quatro sobrecoxas, sendo três salgadas e o controle. Os recipientes foram tampados e mantidos a 10°C e 25°C por 1 hora. A seguir, os cortes salgados foram submetidos a dessalga em três recipientes de aço inoxidável estéreis contendo água potável gelada. Os controles não foram submetidos à dessalga. A temperatura, o pH e cloro residual também foram verificados conforme descrito anteriormente. As sobrecoxas foram mergulhadas individualmente em cada tanque de dessalga por aproximadamente 15 vezes, para simular a água corrente utilizada no abatedouro que realiza o abate *Shechita*.

Cada sobrecoxa dessalgada, bem como as utilizadas como controle, foram colocadas em bolsas plásticas estéreis e submetidas à lavagem conforme descrito para a amostra de tempo zero. A contagem foi realizada somente nas placas que apresentaram entre 15 e 150 colônias.

O mesmo procedimento foi repetido por três vezes, totalizando 36 amostras. A metodologia empregada está representada na figura 8.

FIGURA 8 – Representação esquemática da simulação do *melichah* em laboratório.
T- amostras salgadas, C- amostras controle.

3.2.6 Detecção de genes codificadores para enterotoxinas estafilocócicas

3.2.6.1 Isolados de *S. aureus*

Os isolados identificados como *S. aureus* foram submetidos à pesquisa dos genes para produção de enterotoxinas estafilocócicas. Foram pesquisados os genes para as enterotoxinas A-E e G-J sendo que os *primers* e os controles positivos utilizados estão apresentados na tabela 1.

TABELA 1 – Sequência dos oligonucleotídeos e cepas utilizadas como controles positivos na detecção dos genes para enterotoxinas estafilocócicas por PCR.

<i>Primer</i>	Enterotoxina	Sequência (5'- 3')	Tamanho (pb)	Controle positivo
sea-forw. sea-rev.	SEA	GAA AAA AGT CTG AAT TGC AGG GAA CA CAA ATA AAT CGT AAT TAA CCG AAG GTT C	560	Mu50
seb-forw. seb-rev.	SEB	ATT CTA TTA AGG ACA CTA AGT TAG GGA ATC CCG TTT CAT AAG GCG AGT	404	<i>S. aureus</i> ATCC® 14.458
sec-forw. sec-rev.	SEC	GTA AAG TTA CAG GTG GCA AAA CTT G CAT ATC ATA CCA AAA AGT ATT GCC GT	297	N315
sed-forw. sed-rev.	SED	GAA TTA AGT AGT ACC GCG CTA AAT AAT ATG GCT GTA TTT TTC CTC CGA GAG T	492	RN 4220
see-forw. see-rev.	SEE	CAA AGA AAT GCT TTA AGC AAT CTT AGG C CAC CTT ACC GCC AAA GCT G	482	T47
seg-forw. seg-rev.	SEG	CGT CTC CAC CTG TTG AAG G CCA AGT GAT TGT CTA TTG TCG	328	FRI 472
seh-forw. seh-rev.	SEH	CAA CTG CTG ATT TAG CTC AG GTC GAA TGA GTA ATC TCT AGG	359	FRI 137
sei-forw. sei-rev.	SEI	CAA CTC GAA TTT TCA ACA GGT ACC CAG GCA GTC CAT CTC CTG	466	FRI 472
sej-forw. sej-rev.	SEJ	CAT CAG AAC TGT TGT TCC GCT AG CTG AAT TTT ACC ATC AAA GGT AC	142	FRI 472

Os *primers* utilizados para a detecção dos genes codificadores das enterotoxinas clássicas (A-E) foram descritos por Jarraud et al (2002), enquanto os

para a pesquisa dos genes codificadores das demais enterotoxinas foram descritos por Monday e Bohach (1999). As cepas Mu50, N315, RN4220 e T47 utilizadas como controle foram cedidas pela professora Elsa Mamizuka do Laboratório de Microbiologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP; as cepas *Staphylococcus aureus* ATCC® 14.458 e FRI 137 foram provenientes do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu, e gentilmente cedidas pela professora Vera Lúcia Mores Rall; e a cepa FRI 472 foi cedida pelo professor Wladimir Padilha da Silva, da Universidade Federal de Pelotas.

O método de realização da PCR foi o mesmo descrito em 3.2.4.2.2, porém para as enterotoxinas I e J foi utilizada a temperatura de anelamento de 50°C. A eletroforese em gel de agarose foi realizada como descrito em 3.2.4.2.3

3.2.6.2 Isolados de *Staphylococcus* não produtores de coagulase

3.2.6.2.1 Triagem da produção de enterotoxinas estafilocócicas

Foram selecionados para o estudo 182 isolados representantes das espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativas, isoladas nesse estudo, que já foram descritas como produtoras de enterotoxinas estafilócicas em alimentos (Jay, Loessner e Golden, 2005). Na Tabela 2 encontram-se as informações relativas a esses isolados.

TABELA 2 – Distribuição das espécies e número de isolados de *Staphylococcus* não produtores de coagulase submetidos à pesquisa de enterotoxinas estafilocócicas.

Identificação	N	Frequência relativa
<i>S. hyicus</i>	87	0,28
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticus</i>	71	0,23
<i>S. epidermidis</i>	15	0,05
<i>S. xylosus</i>	4	0,01
<i>S. sciuri</i>	2	0,01
<i>S. saprophyticus</i>	2	0,01
<i>S. warneri</i>	1	0,00
TOTAL	182	1

O VIDAS[®] é um teste qualitativo automatizado que permite a detecção de sete tipos de enterotoxinas estafilócicas (SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED e SEE) pelo método ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*), porém sem diferenciar os tipos de toxinas produzidos.

As amostras foram preparadas de acordo com o protocolo de extração adaptado de Vernozy-Rozand et al. (1996). Culturas de 24 h provenientes de tubos contendo BHIA inclinado foram inoculadas em 25 mL de BHIB dupla concentração, acrescido de 0,2% de extrato de levedura (YE), e foram incubadas a 37°C, sob agitação (150 rpm) por 24 h. A seguir, 20 mL de cada cultivo foram transferidos para tubos estéreis (Falcon[®]) e foram combinados com 20 mL do tampão de extração diluído que acompanha o kit. As amostras foram agitadas, deixadas em repouso durante aproximadamente 15 minutos em temperatura ambiente, e centrifugadas por 15 minutos, a 3000g na temperatura de 4°C (Centrífuga Mikro 22R, angle rotor 6-place, Hettich Zentrifugen, Germany). O sobrenadante foi filtrado em algodão hidrófilo colocado no interior de uma seringa e empurrado com o pistão da seringa. Verificou-se o pH do filtrado com papel indicador de pH (Merck[®]) para, se necessário, ajustá-lo entre 7,5 e 8,0 com solução de hidróxido de sódio 1N. Os tubos contendo o sobrenadante filtrado foram mantidos sob refrigeração por não mais que 24 horas e, então, transportados em caixas isotérmicas com gelo ao laboratório SFDK, em São Paulo, para utilização do equipamento VIDAS[®]. Como controle de qualidade foi utilizada a cepa Mu50 (produtora de SEA).

3.2.6.2.2 Pesquisa dos genes codificadores para enterotoxinas

Os isolados positivos para a produção de enterotoxinas estafilocócicas (3.2.6.2.1), bem como os que apresentaram um indício de fluorescência, mas que não foram considerados positivos pelo equipamento, foram submetidos à pesquisa dos genes codificadores para enterotoxinas estafilocócicas (A-E), utilizando a mesma metodologia descrita para *S. aureus* em 3.2.6.1.

3.2.7 Triagem da presença de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA)

A partir dos cultivos identificados como *S. aureus* previamente congelados, retiraram-se alíquotas que foram cultivadas em BHIB a 37°C, sob agitação (150 rpm) por 10 h. Com auxílio de alça estéril o crescimento foi semeado superficialmente, por esgotamento, no meio ChromID MRSA (bioMérieux) e as placas foram incubadas a 37°C por até 40 h, com leitura intermediária após 18 h de incubação. Segundo o fabricante, consideram-se resistentes à meticilina as colônias verdes azuladas com capacidade de multiplicar em presença da cefoxitina presente no meio, antibiótico esse da mesma classe da meticilina e da oxacilina. Como cepa controle, empregou-se um isolado de *S. aureus* resistente à meticilina gentilmente cedido pela professora Elsa Mamizuka do Laboratório de Microbiologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

3.2.8 Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos

3.2.8.1 Isolados de *S. aureus*

Os 41 isolados identificados como *S. aureus* foram submetidos ao teste Kirby-Bauer de difusão com disco, em ágar Mueller Hinton, segundo recomendações do CLSI (2011). Discos (Oxoid) dos seguintes antimicrobianos, e respectiva dose, foram empregados: ciprofloxacina (5 µg), clindamicina (2 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), linezolida (30 µg), oxacilina (1 µg), penicilina G (10 unidades), quinupristina-dalfopristina (15 µg), rifampicina (5 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (1,25/23,75 µg), tetraciclina (30 µg) e vancomicina (30 µg).

Culturas puras foram semeadas em BHIA e incubadas por 18 a 24 h. Suspensões dessas culturas foram preparadas em tubos contendo 3 mL de solução salina (NaCl 0,85% p/v) de modo a obter turbidez similar à escala de 0,5 de Mac Farland. O cultivo foi semeado superficialmente em placas contendo ágar Mueller Hinton de forma a obter crescimento confluyente e, em seguida, foram depositados no máximo seis discos com antibióticos por placa. As placas foram incubadas a 37°C

por 16 a 18 horas e os halos foram medidos com régua específica. A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com o CLSI (2011). Como controle de qualidade do teste empregou-se a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923.

Para avaliar a suscetibilidade à vancomicina utilizou-se a determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC), segundo recomendações do CLSI (2011). Para essa avaliação foram utilizadas fitas M.I.C. Evaluator (Oxoid). O método foi o mesmo utilizado para a realização do método Kirby-Bauer de difusão com disco. Os resultados foram interpretados de acordo com o CLSI (2011) para o método de microdiluição em caldo. Como controle de qualidade foi utilizada a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213.

A determinação da MIC empregando as fitas M.I.C. Evaluator foi também realizada para os isolados resistentes aos antibióticos no método Kirby-Bauer de difusão com disco, porém somente aos antibióticos que cada isolado apresentou resistência.

Os isolados que apresentaram sensibilidade à penicilina foram submetidos ao teste de produção de β -lactamase, segundo recomendação do CLSI (2011). Este teste foi realizado com o emprego de discos impregnados com nitrocefina (BD®). Colônias isoladas obtidas de BHIA, com 24 horas de incubação, foram retiradas com auxílio de uma alça de inoculação e esfregadas em discos de nitrocefina previamente umedecidos com água destilada estéril. Foram considerados produtores de β -lactamase os isolados de *S. aureus* cujos discos mudaram da cor amarelada para rósea/avermelhada. Como controle positivo foi utilizada a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC® 29213 e como controle negativo a cepa *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923.

Para complementar os ensaios, a suscetibilidade aos agentes antimicrobianos foi também avaliada utilizando o equipamento VITEK 2 GP (bioMérieux). O método utilizado foi semelhante ao descrito em 3.2.4.1.1. O equipamento realizou automaticamente a leitura dos testes de suscetibilidade a antimicrobianos (realizado por MIC) em aproximadamente oito horas, além de realizar o teste de produção de β -lactamase e o teste de resistência induzida a Clindamicina. Os antibióticos testados foram: Cefoxitina, Benzilpenicilina, Ampicilina, Oxacilina, Gentamicina, Ciprofloxacina, Moxifloxacina, Norfloxacina, Eritromicina, Clindamicina, Linezolida, Teicoplanina, Vancomicina, Tigeciclina, Ácido Fusídico, Rifampicina e Trimetoprim/Sulfametoxazol.

3.2.8.2 Isolados de *Staphylococcus* não produtores de coagulase

Dentre os 243 isolados identificados como *Staphylococcus* sp., empregando o API Staph (item 3.2.4.1.2), foram selecionados 185 isolados de *Staphylococcus* não produtores de coagulase, representativos de todas as amostras, para realização do teste de Kirby-Bauer de difusão com disco, em ágar Mueller Hinton, seguindo as recomendações do CLSI (2011). Foram empregados discos (Oxoid) dos seguintes antibióticos e dose: cefoxitina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), clindamicina (2 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), linezolida (30 µg), penicilina G (10 unidades), quinupristina-dalfopristina (15 µg), rifampicina (5 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (1,25/23,75 µg) e tetraciclina (30 µg). O número de isolados testados para cada espécie está representado na tabela 3.

TABELA 3 – Distribuição das variáveis: número de isolados identificados, número de isolados testados e percentagem dos isolados testados de *Staphylococcus* não produtores de coagulase no Kirby-Bauer.

Espécie	N Identificados	n Testados	% Testados	Frequência Relativa Testados
<i>S. hyicus</i>	87	77	0,89	0,45
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticus</i>	71	54	0,76	0,31
<i>S. simulans</i>	44	30	0,41	0,10
<i>S. epidermidis</i>	15	11	0,73	0,06
<i>S. capitis</i>	15	7	0,47	0,04
<i>S. xylosus</i>	4	3	0,75	0,02
<i>S. hominis</i>	4	1	0,25	0,01
<i>S. sciuri</i>	2	1	0,50	0,01
<i>S. warneri</i>	1	1	1,00	0,01
<i>S. saprophyticus</i>	2	0	0	0
Total	243	185	1	1

Os isolados resistentes a eritromicina e sensíveis a clindamicina foram submetidos ao teste D, seguindo recomendações do CLSI 2011. As culturas foram semeadas em placas contendo ágar Mueller Hinton, conforme descrito em 3.2.6.1. Discos de eritromicina (15 µg) e clindamicina (2 µg) foram depositados nas placas com espaçamento de aproximadamente 15 mm, e estas foram incubadas a 37°C por 16 a 18 h. Neste teste, os isolados são considerados com resistência a clindamicina

induzida quando é formada uma zona de “achatamento”, adjacente ao disco de eritromicina, na zona de inibição da clindamicina. Os possíveis resultados do teste estão demonstrados na figura 9.

FIGURA 9 – Desenho esquemático com possíveis resultados para o teste D.

A- Positivo para o teste D; B- Negativo para o teste D. E – eritromicina (resistente) ; DA – Clindamicina (sensível)

3.2.9 Pesquisa da presença do gene *mecA* nos isolados de *S. aureus*

Para amplificação do gene *mecA*, foram utilizados os *primers forward* 5'TGCTATCCACCCTCAAACAGG3' e *reverse* 5'AACGTTGTAACCACCCCAAGA3', descritos por Kondo et al. (2007). A técnica de PCR e a eletroforese em gel de agarose foram as mesmas utilizadas para a detecção do gene *nuc*, descritas em 3.2.4.2.2 e 3.2.4.2.3, respectivamente. Como controle positivo foi utilizada a cepa MRSA 1968.

3.2.10 Análise estatística

Os resultados obtidos na pesquisa de micro-organismos aeróbios mesófilos e na simulação do *melichah* em laboratório foram submetidos à análise de variância (ANOVA), sendo aplicado o teste *T-student* com nível de significância de 95%. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software livre Assistat versão 7.5.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante as coletas, a temperatura média da sala de salga do abatedouro foi de 10,2°C, a temperatura média dos frangos foi de 5,8°C e o peso médio 1,9 kg. Ao contrário do abate convencional, em que normalmente ocorre padronização do tamanho das aves para otimização do maquinário, nesse abatedouro o tamanho das aves variou consideravelmente, sendo a menor ave de 1,2 kg e a maior de 2,6 kg. Na tabela 4 tem-se a média e o desvio padrão da temperatura média e do peso médio das carcaças por data de coleta. A temperatura das carcaças esteve sempre de acordo com o especificado na Portaria nº 210 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 1998), que recomenda que as carcaças não atinjam temperaturas superiores a 7°C no final do processo de pré-resfriamento, sendo toleradas temperaturas de até 10°C para as carcaças destinadas ao congelamento imediato.

O nível médio de cloro residual encontrado na água do tanque de dessalga foi de 1,14 ppm e o pH da água nesse tanque foi de 8,2. O nível de cloro residual observado no tanque de dessalga está de acordo com a legislação vigente, que exige no mínimo 0,05 ppm de cloro residual na água dos estabelecimentos de produtos de origem animal destinados à alimentação humana (BRASIL, 1952). O pH também está de acordo com a legislação vigente, uma vez que a Circular 175 do MAPA (BRASIL, 2005) estabelece que o pH da água na distribuição, em indústrias produtoras de alimentos de origem animal, seja mantido na faixa de 6,0 a 9,5. Neste abatedouro, a água utilizada na produção é proveniente de duas fontes: um poço artesiano localizado na própria indústria e a água proveniente de distribuição pública (SABESP). Para a água proveniente de poço artesiano, a indústria realiza apenas a cloração de forma a atender a legislação citada anteriormente. Não foi possível obter mais informações sobre a cloração da água.

TABELA 4 – Distribuição das variáveis peso médio e temperatura média das carcaças de frango avaliadas.

Data da coleta	Peso médio das carcaças (kg) $\pm$ DP*	Temperatura média das Carcaças (°C) $\pm$ DP
26/07/2010	1,9 $\pm$ 0,3	6,3 $\pm$ 0,9
25/08/2010	1,9 $\pm$ 0,2	6,6 $\pm$ 0,5
20/10/2010	1,8 $\pm$ 0,3	5,7 $\pm$ 0,7
25/10/2010	1,9 $\pm$ 0,3	6,3 $\pm$ 0,9
10/11/2010	2,0 $\pm$ 0,3	4,7 $\pm$ 1,3
24/11/2010	1,9 $\pm$ 0,3	5,0 $\pm$ 1,3
01/12/2010	2,1 $\pm$ 0,2	5,7 $\pm$ 1,0
08/12/2010	2,0 $\pm$ 0,3	6,0 $\pm$ 0,9
14/12/2010	1,8 $\pm$ 0,2	5,2 $\pm$ 1,2
24/03/2011	1,7 $\pm$ 0,2	6,6 $\pm$ 0,4
24/05/2011	1,8 $\pm$ 0,3	6,1 $\pm$ 0,9
02/06/2011	1,9 $\pm$ 0,2	6,1 $\pm$ 0,6
16/06/2011	1,8 $\pm$ 0,3	5,1 $\pm$ 0,8
Valor médio	1,9 $\pm$ 0,3	5,8 $\pm$ 0,9

* Desvio Padrão

4.1 Detecção e enumeração de *S. aureus*

Em todas as amostras foi realizada a enumeração de *Staphylococcus aureus*, porém duas metodologias foram utilizadas: as 176 amostras iniciais foram examinadas de maneira tradicional pela semeadura da solução de lavagem diretamente nas placas; as demais 128 amostras tiveram a solução de lavagem centrifugada. A etapa de centrifugação foi adicionada com a finalidade de aumentar a probabilidade de isolamento do patógeno, em função do baixo número de amostras positivas para *Staphylococcus aureus* obtido nas primeiras 176 análises.

Dentre as 304 amostras analisadas para *Staphylococcus aureus*, sendo 152 obtidas antes da etapa de salga e outras 152 após a dessalga, apenas 13 (4,3%) foram positivas para *S. aureus*. Destas, onze foram provenientes das amostras submetidas à centrifugação, tendo nove sido coletadas antes do processo de salga e duas após a dessalga. Das amostras restantes, uma foi obtida antes do processo de salga e uma após a dessalga. A população média do patógeno nessas amostras foi

de $1,7 \times 10$ UFC/g. A distribuição da população média de *S. aureus* obtida antes da salga e após a dessalga está apresentada na tabela 5.

TABELA 5 – População de *S. aureus* nas carcaças de frango obtidas em um abatedouro que realiza abate *Shechita* na cidade de São Paulo, SP.

Data da Coleta	Amostra	População <i>S. aureus</i> (UFC/g)	
		Pré-salga	Após dessalga
26/07/2010	1*	-	$3,1 \times 10$
25/08/2010	2*	$2,2 \times 10^2$	-
08/12/2010	3	1,08	-
08/12/2010	4	0,48	-
08/12/2010	5	0,89	-
08/12/2010	6	2,58	-
08/12/2010	7	0,47	-
08/12/2010	8	-	0,46
08/12/2010	9	-	1,80
08/12/2010	10	-	2,29
24/05/2011	11	0,27	-
24/05/2011	12	0,31	-
24/05/2011	13	0,34	-
Média (UFC/g)		$2,5 \times 10$	8,9

*amostra positiva sem centrifugação

Com estes resultados verifica-se a baixa frequência e a baixa população de *S. aureus* nas amostras coletadas no abatedouro. Isso não permite que se avalie o efeito da etapa de salga na população desse patógeno.

Em estudos realizados em frangos provenientes de abate convencional, a prevalência de *S. aureus* em carcaças é variável. Lindblad et al. (2006), na Suíça, detectaram *Staphylococcus* coagulase positiva em 68% (414/605) das carcaças obtidas de abatedouros, amostradas pela técnica de enxágue. No Marrocos, Cohen et al. (2007) isolaram *S. aureus* de 10,4% (20/192) das amostras de carne e pele de frango. Já Lin et al. (2008), em Taiwan, ao analisarem por três anos consecutivos o

caldo obtido da lavagem de frangos coletados em abatedouros, verificaram a prevalência de *S. aureus* em 0,3% (1/305) das amostras em 2003, 0,4% (1/260) em 2004 e 7,8% (31/395) em 2005. Nos dois primeiros estudos as análises foram realizadas com a utilização de ágar Baird-Parker e no último com a utilização de ágar Baird-Parker RPF (*Rabbit Plasma Fibrinogen*). Estes trabalhos mostram que a população de *S. aureus* varia independente da região geográfica, pois houve variação na ocorrência de *S. aureus* entre países diferentes, mas também foi encontrada variação entre regiões, e anos, de um mesmo país.

A baixa frequência de *S. aureus* nesse abatedouro, provavelmente decorre da baixa rotina de abate (no máximo duas vezes por semana) e do pequeno número de aves abatidas. Com esta rotina de trabalho e com a fiscalização constante do Serviço de Inspeção Federal (SIF), os funcionários do abatedouro têm condições de se dedicar mais à higiene do ambiente e dos equipamentos, que são importantes fontes de contaminação por *Staphylococcus aureus* em uma planta de abate. Neste abatedouro, os equipamentos são higienizados antes do início e ao final de cada dia de abate. Além disso, por recomendações da empresa, durante a rotina de abate os funcionários adotam medidas preventivas para evitar a contaminação decorrente da manipulação, como higienizar as mãos e evitar conversas durante o trabalho.

Outra questão que deve ser considerada, é que apesar da depenadeira ser a principal fonte de contaminação da carcaça por *S. aureus* em abatedouros de aves com abate convencional, a ausência da etapa de escalda no abate *Shechita* parece influenciar na população final deste patógeno. Segundo publicação da ICMSF (2005), o calor proveniente dos frangos recém escaldados, associado à abundância de nutrientes das carcaças, cria condições favoráveis à multiplicação de *S. aureus* na depenadeira. Pode-se supor que no abate *Shechita* onde não é formado esse microclima favorável ao desenvolvimento de estafilococos, a população de *S. aureus* tenda a ser menor que no abate convencional. A avaliação da presença de *S. aureus* na depenadeira poderia trazer informações complementares.

Pode-se pensar que a realização de estudo em paralelo para avaliação da população, bem como da ocorrência, de *S. aureus* em aves provenientes de abate convencional pudesse ser interessante. Entretanto, a comparação dos dados seria de pouca utilidade, uma vez que existem diferenças importantes no que diz respeito ao número de animais abatidos/dia e ao número de dias de abate por semana. Enquanto no abatedouro avaliado abate-se 2.000 aves/dia e o abate ocorre somente

em dois dias/semana, um abatedouro tradicional de pequeno porte, com inspeção federal, abate em média 80.000 aves/dia e trabalha até sete dias/semana.

Como a maioria (8/11) das amostras positivas obtidas após centrifugação foi coletada no mesmo dia (Tabela 5), não se pode afirmar se o isolamento do patógeno foi decorrente da concentração da amostra ou de uma falha no processamento que ocorreu na indústria naquele dia específico. Dentre as falhas possíveis destacam-se a manipulação inadequada por algum funcionário novo na empresa ou novo na função; falha na higienização dos equipamentos, ou mesmo contaminação intrínseca daquele lote de aves devido à presença de alguma das patologias causadas por *S. aureus* (artrite, osteomielite, pneumonia, dentre outras). Neste dia de abate, 67% (8/12) das amostras coletadas foram positivas para *S. aureus*. Para avaliar a eficiência da centrifugação das amostras, o correto seria realizar paralelamente as duas metodologias para comparação dos resultados.

Uma forma de identificar a fonte da contaminação por *S. aureus* no abatedouro seria a determinação da origem dos isolados - se humanos ou animal. Devriese (1984) descreveu uma série de provas bioquímicas (teste de produção de β -hemolisina, teste de produção de estafiloquinase, teste de produção da enzima coagulase em plasma bovino e tipo de crescimento em ágar cristal violeta) que podem ser realizadas para classificar *Staphylococcus aureus* em seis biotipos de acordo com a origem do hospedeiro: humano, humano não β -hemolítico, aviário, bovino, ovino e sem hospedeiro específico. Esses resultados poderiam auxiliar esse abatedouro no controle de *S. aureus* e, assim permitir a implementação de medidas de controle específicas. Entretanto, esse assunto não estava contemplado no presente estudo, mas poderá vir a ser realizado no futuro.

4.2 Determinação da população de bactérias aeróbias mesófilas

A população média de micro-organismos aeróbios mesófilos, determinada em 216 amostras, sendo 110 obtidas antes da salga e 106 após a dessalga, foi de $4,9 \times 10^3$ UFC/g. Verificou-se que a população total de bactérias aeróbias foi de $5,4 \times 10^3$ UFC/g antes da etapa de salga para $4,5 \times 10^3$ UFC/g após a dessalga, variação esta que pode ser considerada normal e não decorrente da salga ($p > 0,05$).

Para Hajmeer et al. (1999), em estudo avaliando carne bovina, o tratamento com sal realizado no abate *Shechita* também apresentou uma baixa magnitude na redução da população total de micro-organismos aeróbios.

Apesar deste tipo de análise ser muito empregada no Brasil para avaliar a qualidade higiênico-sanitária do produto, a adesão às boas práticas de fabricação e, também, como um indicador de segurança microbiológica do alimento, não existe até o momento na legislação brasileira padrão para a população de micro-organismos aeróbios mesófilos nesse tipo de produto. Sabe-se, porém, que o processo de deterioração em carne de frango tem início quando há uma população de micro-organismos mesófilos superior a 10^7 - 10^8 UFC/g, momento em que um aroma desagradável (*off-odor*) pode ser percebido (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005). Além disso, de acordo com Morton (2001), a contagem total de micro-organismos aeróbios mesófilos típica em cortes de frango para o comércio internacional é de, aproximadamente, $1,0 \times 10^5$ UFC/g. Com base nisso, pode-se afirmar que a qualidade higiênico-sanitária das carcaças analisadas está adequada.

Durante as coletas, verificamos que esse abatedouro adota medidas de controle para cumprir as exigências do SIF, como BPF (Boas Práticas de Fabricação), que inclui PPHO (Procedimentos Padrão de Higiene Operacional), pois durante o abate existe uma preocupação constante em manter o ambiente higienizado. Além disso, como são abatidas poucas aves por dia, o manuseio e a fiscalização das aves pelos funcionários ocorrem de forma mais criteriosa. Além dos médicos veterinários do SIF, esse abatedouro contava com dois médicos veterinários no controle de qualidade, que trabalhavam para assegurar o cumprimento da legislação e a qualidade final do alimento produzido. Certamente essas medidas interferiram na população microbiana final do produto.

4.3 Identificação dos isolados de *Staphylococcus*

Todas as colônias vermelho-violeta (42 colônias), inclusive as seis que não produziram DNase e as sete colônias pretas que produziram DNase, foram avaliadas quanto a produção de coagulase e submetidas à coloração de Gram. Essas 49 colônias apresentaram morfologia e coloração típicas de *Staphylococcus*,

entretanto somente as 42 colônias vermelho-violeta foram capazes de produzir coagulase sendo consideradas como *S. aureus*, segundo a definição apresentada por Lancette e Bennett (2001).

Essas 49 colônias foram a seguir submetidas à identificação empregando o API Staph e as 42 produtoras de coagulase foram também avaliadas pelo VITEK para especiação. Dessas 42 colônias, 41 foram identificadas por ambos os métodos como *S. aureus*, enquanto a restante (produtora de coagulase, mas não de DNase) foi identificada pelo VITEK como *S. simulans* e pelo API Staph como *S. hyicus*. A identificação final desse isolado não pode ser realizada. Apesar de ambos os métodos serem fenotípicos e, segundo Ligozzi et al. (2002) o VITEK 2 GP apresentar boa acurácia para identificação de *Staphylococcus* sp., o resultado obtido com esse sistema parece não ser adequado, pois *S. simulans* não são produtores de coagulase (JAY; LOESSNER; GOLDEN, 2005). Para a identificação definitiva seria necessário o sequenciamento do DNA desse isolado.

As sete colônias pretas, não produtoras de coagulase, mas produtoras da enzima DNase, foram identificadas como sendo *S. hyicus*. Apesar de, neste estudo, não terem sido encontradas colônias pretas produtoras de coagulase, não se pode afirmar que colônias pretas no Petrifilm sejam sempre coagulase negativa. Isso porque Viçosa et al. (2010), ao analisarem leite cru e queijo minas frescal, constataram que algumas colônias consideradas atípicas nas placas Petrifilm foram capazes de produzir DNase e também coagulase.

Silva et al. (2005), ao pesquisarem a presença de *Staphylococcus aureus* em amostras de leite utilizando Petrifilm, também encontraram colônias vermelho-violeta que foram negativas na prova da DNase utilizando o Staph Express Disk. Porém, nesse caso os isolados não foram identificados como *S. aureus* nas provas bioquímicas, diferentemente do presente estudo.

De acordo com Devriese e Oeding (1975), a prova da DNase em *S. aureus* isolados de aves deve ser interpretada com bastante cautela. Segundo os autores, uma grande percentagem de cepas típicas de *S. aureus* isolados dessa espécie animal são negativas para a produção de DNase. Isso mostra que, ao pesquisar *S. aureus* em aves, não se pode confiar somente nos testes tradicionais, sendo que outros testes de identificação devem ser empregados.

Na tabela 6 estão apresentados os resultados obtidos nas provas de coagulase e DNase.

TABELA 6 – Distribuição dos isolados com base nos resultados das provas de coagulase, DNase e na identificação pelo API Staph.

Ensaio	Característica da colônia✕	Nº isolados	Frequência (%)	Identificação
Coagulase positiva / DNase positiva	vermelho-violeta	36	73,5	<i>S. aureus</i>
Coagulase positiva / DNase negativa	vermelho-violeta	6	12,2	<i>S. aureus</i> / <i>S. hyicus</i> ☆
Coagulase negativa / DNase positiva	pretas	7	14,3	<i>S. hyicus</i>
Total		49	100	

✕ obtida no Petrifilm™ Staph Express count (3M™)

☆ somente 1 isolado foi identificado como *S. hyicus*

A partir das 304 amostras de carcaças examinadas, foi selecionado e submetido ao congelamento um total de 890 colônias atípicas (pretas, não produtoras de coagulase e/ou DNase). Um cultivo representativo de cada amostra de ave foi selecionado para ser submetido à avaliação morfo-tintorial e ao API Staph. Quando o isolado selecionado não apresentava morfologia e coloração de Gram típicas de estafilococos, ou quando se obteve uma identificação “inaceitável” ou “duvidosa” no API Staph um novo cultivo proveniente da mesma amostra de ave foi reativado e testado até que não mais houvesse cultivo representativo da amostra. Dessa forma, foram testados 412 cultivos.

Desses 412 cultivos, 104 não apresentaram morfologia típica de estafilococos e foram descartados; os 308 restantes foram submetidos à identificação empregando o kit API Staph sendo que 63 apresentaram identificação inaceitável ou duvidosa para o gênero *Staphylococcus*, sendo esses descartados e restando 245 isolados representantes de igual número de amostras de aves.

As espécies de *Staphylococcus* identificadas a partir das colônias atípicas foram: *S. hyicus*, *S. cohnii* subsp. *urealyticus*, *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. hominis*, *S. xylosus*, *S. sciuri*, *S. saprophyticus* e *S. warneri*. Na tabela 7 está apresentado o número de isolados identificados de cada espécie.

TABELA 7 – Espécies do gênero *Staphylococcus*, não produtores de coagulase e/ou DNase, isoladas de frangos provenientes de abate *Shechita*.

Identificação	N	Frequência relativa
<i>S. hyicus</i>	87	0,35
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticus</i>	71	0,29
<i>S. simulans</i>	44	0,18
<i>S. epidermidis</i>	15	0,06
<i>S. capitis</i>	15	0,06
<i>S. hominis</i>	4	0,02
<i>S. xylosus</i>	4	0,02
<i>S. sciuri</i>	2	0,01
<i>S. saprophyticus</i>	2	0,01
<i>S. warneri</i>	1	0,00
TOTAL	245	1,0

Dentre os *Staphylococcus* que não produziram coagulase nesse estudo, *Staphylococcus hyicus* foi a espécie mais frequente representando 35% dos isolados (tabela 7). Essa espécie é normalmente encontrada na cavidade nasal e da pele de aves, podendo explicar essa ocorrência. Mesmo sendo um micro-organismo comensal em aves, *S. hyicus* já foram descritos como agentes patogênicos em frangos, sendo responsáveis por casos de espondilite (DEVRIESE, 1990). É importante considerar que nesse estudo foram isolados tanto *S. hyicus* produtores como não produtores da enzima coagulase, pois essa espécie pode apresentar resultados variáveis para a produção dessa enzima. Segundo Devriese et al. (1978) entre 11 e 89% dos *S. hyicus* são produtores da enzima coagulase.

A segunda espécie predominante foi *S. cohnii* (Tabela 7) que, assim como *S. simulans*, *S. epidermidis*, *S. capitis*, *S. hominis*, *S. xylosus* e *S. saprophyticus* são frequentemente isolados de humanos. *S. xylosus* podem ser ocasionalmente isolados do solo e da água, assim como da pele de bovinos. *S. sciuri* também podem ser encontrados no ambiente, mas dificilmente são isolados de humanos. *S. warneri* são bem pouco frequentes na pele de humanos, tendo seus principais hospedeiros os primatas não humanos (KLOOS, 1980). Com base nesses dados, pode-se supor que a principal origem desses micro-organismos nas carcaças de frango examinadas nesse estudo foi a pele das pessoas que manipularam as carcaças durante o abate. A baixa ocorrência de *S. warneri* na pele humana explica

o único isolado identificado nesse estudo (Tabela 7). Já *S. sciuri* e *S. xylosus* a origem pode ter sido o ambiente.

A presença de *S. epidermidis* nas carcaças pode ser decorrente de dois fatores: contaminação pelos manipuladores ou presença de biofilme na esteira da salga e outros equipamentos. *S. epidermidis* é considerada a espécie de *Staphylococcus* mais prevalente e persistente na pele humana, porém também pode ser encontrado em poeira, mas é raro em animais. Entretanto, em alguns estudos foram isolados *S. epidermidis* da pele de animais domésticos e de animais com mastite subclínica. Acredita-se que esse micro-organismo seja transferido para os animais por contato humano (DEVRIESE, 1990; KLOSS, 1980). Além disso, *S. epidermidis* são bem conhecidos pela capacidade de produzir biofilmes em superfícies inertes, assim como *S. aureus*. Outras espécies de *Staphylococcus* sp. também possuem capacidade de formar biofilmes, mas com menor frequência quando comparado a *S. epidermidis* e *S. aureus* (OTTO, 2008).

Para que essas hipóteses possam ser comprovadas há necessidade de se fazer coletas de amostras de mãos dos manipuladores e também do ambiente da planta e submeter os isolados à tipagem molecular.

Quando se compara a variedade de espécies de *Staphylococcus* não produtores de coagulase isoladas no presente estudo (Tabela 7) com outros estudos, verifica-se que há uma variação. Apesar de algumas espécies serem as mesmas como *S. hyicus*, *S. cohnii* e *S. epidermidis*, em nenhum dos demais estudos a espécie predominante foi *S. hyicus*. Outras espécies, como *S. lentus* e *S. xylosus*, foram isoladas com frequência mais elevada pelos diferentes pesquisadores, porém o mesmo não ocorreu nesse estudo. Huber et al. (2011) ao identificarem, com o método de espectrometria de massa (MALDI-TOF MS), 38 isolados obtidos de carcaças de aves provenientes de abatedouros na Suíça, encontraram apenas *S. sciuri*, *S. epidermidis* e *S. lentus*, sendo que o último representava 79% (30/38) dos isolados. Em contrapartida, Nagase et al. (2002) ao pesquisarem *Staphylococcus* não produtores de coagulase obtidos da pele de aves sadias no Japão, verificaram que a espécie mais frequente foi *S. xylosus* (38,4% de 73 aves), seguido de *S. cohnii* subsp. *cohnii* (34,2%), *S. lentus* (32,9%), *S. saprophyticus* (17,8%), *S. epidermidis* (15,1%) e *S. sciuri* (13,7%). A identificação das espécies de *Staphylococcus* sp. por esses autores também foi realizada utilizando o kit API

Staph. Shimizu et al. (1992), também analisando pele de aves sadias no Japão, verificaram que a espécie predominante era *S. xylosus* (37,5% de 64 aves), seguido de *S. hyicus* (32,8%) e *S. epidermidis* (21,9%). As espécies foram identificadas utilizando provas bioquímicas tradicionais.

Deve-se considerar que a população de *Staphylococcus* sp. pode variar após a depenagem das aves, conforme demonstrado por Mead e Scott (1993). Os autores constataram que antes da depenagem a população de *Staphylococcus* sp. era composta principalmente por *S. xylosus*, seguido de *S. simulans* e *S. warneri*, mas após a depenagem a população desse gênero nas carcaças passou a ser composta principalmente por *S. sciuri*, seguido por uma pequena percentagem de *S. cohnii*, *S. hyicus*, *S. simulans* e *S. xylosus*. Para a identificação dos isolados, os autores também utilizam o kit API Staph. Esses resultados mostram que as espécies de *Staphylococcus* sp. presentes em aves variam independente do tempo e da região geográfica, e que o maquinário do abatedouro é uma importante fonte do micro-organismo para carcaças de frango. Como no abate *Shechita* não ocorre a escalda antes da depenagem, e as carcaças desse estudo foram coletadas após a depenagem, não se pode afirmar que ocorra essa mudança nas espécies de *Staphylococcus* como no abate convencional. Estudos complementares seriam necessários para avaliar a presença desse gênero na depenadeira utilizada no abate *Shechita*.

4.3.3 Identificação genotípica

Os 41 isolados identificados como *S. aureus* foram submetidos à pesquisa do gene *nuc*, com *primers* específicos para essa espécie. Como o API Staph e o VITEK não diferenciam *S. aureus* de *S. intermedius*, espécie de *Staphylococcus* positiva nos testes de coagulase e de DNase e importantes em medicina veterinária, era imprescindível confirmar a identificação dos isolados em nível molecular.

Todos os isolados identificados como *S. aureus* pelo API Staph e pelo VITEK foram positivos para o gene *nuc* (figura 10).

FIGURA 10 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR, para detecção dos genes *nuc* e *mecA* em isolados de *S. aureus*. M = Marcador de peso molecular 100pb. + *nuc*: isolado positivo para o gene *nuc*. – *mecA*: isolado negativo para o gene *mecA*. Controle positivo para os genes *nuc* e *mecA*: MRSA 1968.

4.4 Simulação do *melichah* em laboratório

Como nos três experimentos realizados (Apêndice A) a população de *S. aureus* atingiu a fase estacionária na 4ª hora de incubação a 37°C, sob agitação, com uma população de aproximadamente 10^8 UFC/mL esse foi o tempo utilizado para preparar os inóculos a serem utilizados na simulação do *melichah*. Os isolados de *Staphylococcus aureus* utilizados para a contaminação dos frangos foram provenientes deste estudo, sendo representativos de três diferentes coletas.

O pH e o cloro residual da água utilizada na simulação do *melichah* foram monitorados em todos os ensaios tendo os valores 5 e 0,6 ppm, respectivamente, sido encontrados em todas as repetições. Esses valores estão abaixo do nível médio de cloro residual e pH encontrados no abatedouro durante a coleta. Isso porque a água utilizada nos ensaios de simulação foi proveniente de distribuição pública e a utilizada no abatedouro é proveniente de poço artesiano, sendo a cloração realizada na própria empresa.

A população média de *Staphylococcus aureus* nas amostras analisadas no tempo zero foi de $1,2 \times 10^5$ UFC/sobrecoxa, sendo a população média dos controles, após a manutenção por 1h a 10°C e 25°C de $1,6 \times 10^4$ e $1,5 \times 10^4$ UFC/sobrecoxa, respectivamente. As amostras salgadas e dessalgadas apresentaram população média de *S. aureus* de $6,7 \times 10^3$ UFC/sobrecoxa quando mantidas a 10°C e de $4,0 \times 10^3$ UFC/sobrecoxa quando mantidas a 25°C.

Observa-se que a etapa de lavagem simulando o *chiller* já propiciou a redução significativa ($p < 0,05$) na população de *S. aureus* nas sobrecoxas artificialmente contaminadas, o que pode ser visto nos resultados obtidos com as amostras controle. Deve-se considerar, porém, que essa redução pode ter ocorrido porque não houve tempo suficiente para a fixação de alguns *S. aureus* nas sobrecoxas de frango. Entretanto, redução adicional ($p < 0,05$) foi verificada nas amostras submetidas à salga e dessalga, o que comprova que a redução do patógeno foi decorrente da etapa de salga. Por outro lado, a temperatura em que os cortes foram mantidos durante a salga (1h) não afetou significativamente ($p > 0,05$) a população de *S. aureus*. As médias da população de *S. aureus* obtidas nos diferentes ensaios estão apresentadas na tabela 8.

TABELA 8 – População de *S. aureus* em sobrecoxas de frango artificialmente contaminadas e submetidas ao *Melichah*.

Ensaio	Pop. Inicial	Controle		<i>Melichah</i> ✕	
	LogUFC/corte	10°C	25°C	10°C	25°C
1	5,04	4,26	4,08	3,70	3,71
2	5,15	4,09	4,11	3,82	3,32
3	5,08	4,28	4,36	3,85	3,63
Média	5,09	4,21	4,18	3,79	3,55

✕ População média de três sobrecoxas

4.5 Pesquisa de genes para a produção de enterotoxinas estafilocócicas

4.5.1 Isolados de *S. aureus*

Dentre os 41 isolados de *S. aureus*, 36 (88%) possuíam genes codificadores para enterotoxinas estafilocócicas, sendo que 26 (63%) apresentaram o gene *seg* e 26 o gene *sei*. Desses isolados, 16 apresentaram concomitantemente os dois genes e os outros 20 apresentaram apenas um dos genes. Nenhum outro gene codificador para enterotoxinas foi encontrado. A figura 11 mostra um gel de agarose representativo dos resultados da PCR para os genes avaliados.

FIGURA 11 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR, para detecção dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej* em isolados de *S. aureus*. M = Marcador de peso molecular 100pb. Controles positivos: *sea* (*S. aureus* Mu50); *seb* (*S. aureus* ATCC 14.458); *sec* (*S. aureus* N315); *sed* (*S. aureus* RN 4220); *see* (*S. aureus* T47); *seg*, *sei* e *sej* (*S. aureus* FRI 472); *seh* (*S. aureus* FRI 137).

Como os genes *seg* e *sei* podem ser encontrados no locus *egc*, é possível que os outros genes que compõem o cluster (*selo*, *selm*, *seln* e ocasionalmente *selu2* e *selv*), assim como os dois pseudogenes (ϕ ent-1 e ϕ ent-2), estejam presentes nos isolados de *S. aureus* desse estudo. Esses resultados seriam interessantes apenas para fins epidemiológicos, pois os demais genes do *egc* não codificam enterotoxinas estafilocócicas eméticas.

Não existe relato da ocorrência de surtos de ETA relacionado a enterotoxinas estafilocócicas G e I no Brasil, entretanto esses já foram relatados em outros países. Martín et al. (2004), ao pesquisarem três surtos de ETA causados por *S. aureus* em restaurantes na Espanha, encontraram os genes codificadores de SEG e SEI em *S. aureus* isolados de vários alimentos. Os pesquisadores Chen, Chiou e Tsen (2003) também encontraram *seg* e *sei* em isolados de *S. aureus* provenientes de alimentos envolvidos em intoxicações alimentares em Taiwan. Nos dois casos, os genes *seg* e *sei* normalmente ocorriam juntos, associados ou não a outras enterotoxinas estafilocócicas. Apesar de os genes codificadores para as enterotoxinas G e I não serem encontrados com frequência em isolados de *S. aureus* envolvidos em intoxicações estafilocócicas, talvez por serem pouco pesquisados, a presença de SEG e SEI em alimentos representa um risco potencial para o consumidor.

Os resultados desse estudo mostram a necessidade de pesquisar não somente as SE clássicas (A-E), mas também as outras enterotoxinas, pois estas podem causar intoxicação. Apesar desses 36 isolados serem portadores de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas, não se sabe se os mesmos são capazes de expressá-los. O método fenotípico empregado nesse estudo para avaliar a produção das enterotoxinas detecta apenas as enterotoxinas clássicas, não sendo útil para esse caso específico. Para avaliar a capacidade de produção de SEG e SEI seria necessário empregar ou o método de dupla difusão (BENNETT; HAIT, 2011) ou então a transcriptase reversa (LEE et al., 2007).

Deve-se considerar, porém, que a população bacteriana encontrada nessas aves não seria suficiente para produzir a quantidade de enterotoxina necessária para causar intoxicação estafilocócica. De acordo com Zhang e Stewart (2001), a quantidade de SE necessária para causar sintomas de intoxicação alimentar só é alcançada quando a população bacteriana é maior que 10^5 UFC/g. Nesse estudo, as populações mais elevadas de *Staphylococcus aureus* encontradas foram de $2,2 \times 10^2$ UFC/g antes da salga e $3,1 \times 10$ UFC/g após a dessalga. Entretanto, se o produto for

mantido em temperatura abusiva (superior a 10°C) por período prolongado, os *S. aureus* presentes nos frangos podem se multiplicar e produzir enterotoxinas em quantidade suficiente para causar intoxicação (ELLERBROEK, 2004). Vale ressaltar que, uma vez presentes no alimento, as enterotoxinas dificilmente são inativadas pelo calor devido a sua elevada termoresistência. Isso reforça a necessidade da manutenção da temperatura adequada durante toda a cadeia: do abatedouro até a mesa do consumidor.

Dentre os isolados positivos para genes codificadores de SE, 86% (31/36) eram produtores das enzimas coagulase e DNase. Porém, deve-se considerar que todos os cinco isolados de *S. aureus* produtores de coagulase e não produtores de DNase (item 4.3) possuíam os genes *seg* e/ou *sei*. Esses resultados indicam que não há correlação entre a produção da enzima DNase e a presença de genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas.

4.5.2 Isolados de *Staphylococcus* não produtores de coagulase

Dentre os 182 isolados de *Staphylococcus* não produtores de coagulase testados com o kit VIDAS[®], apenas três foram positivos para a produção de SE. Contudo, outros nove isolados apresentaram fluorescência fraca que não é considerada positiva pelo equipamento. Como o princípio da técnica indica que os resultados sejam interpretados de acordo com o nível de fluorescência produzida, devido à reação da fosfatase alcalina com o 4-metil-umbeliferil fosfato, optou-se por pesquisar os genes de produção de enterotoxinas estafilocócicas também nesses isolados uma vez que os mesmos podem ser produtores fracos de toxina.

Os 12 isolados pertenciam à espécie *Staphylococcus epidermidis*. Esses isolados representam 80% (12/15) do total dos isolados identificados como *S. epidermidis*. É importante ressaltar que os isolados foram provenientes de amostras de aves coletadas em dias diferentes de abate: um foi isolado na terceira coleta (20/10/2010), dois foram isolados na quarta coleta (25/10/2010), um na quinta coleta (10/11/2010), dois na sexta coleta (24/11/2010), quatro na sétima coleta (01/12/2010), seis na nona coleta (14/12/2010) e um na décima primeira coleta (24/05/2011).

Quando submetidos à pesquisa dos genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas clássicas, apenas os três isolados que apresentaram fluorescência acima do limite de detecção do VIDAS® possuíam gene *sec*.

Embora os *primers* utilizados nesse estudo para a pesquisa de genes codificadores para SE em *S. epidermidis* terem sido descritos para *S. aureus*, os resultados levam a crer que esses isolados possuíam o gene *sec*, pelo tamanho do fragmento de DNA amplificado (297 pb) (figura 12). Para confirmar esse achado seria necessário realizar a comparação das sequências desse gene para as duas espécies de microrganismo. Essa comparação ainda será realizada.

FIGURA 12 – Eletroforese em gel de agarose 1% dos produtos amplificados por PCR, para detecção do gene *sec* de *S. epidermidis* (coagulase negativo). M= Marcador de peso molecular 100pb (Fermentas). C+ - cepa N315 – *S. aureus* (controle positivo); C- - controle negativo; 1, 2 e 3 - isolados positivos para o gene *sec*; - - isolados negativos.

Apesar de não produzirem as enterotoxinas clássicas que são detectadas com o VIDAS®, os isolados de *Staphylococcus* sp. podem conter os genes codificadores, porém sem expressá-los. Rall et al. (2010), ao pesquisarem *Staphylococcus* não produtores de coagulase isolados de queijo minas, encontraram

S. saprophyticus, *S. warneri*, *S. xylosus*, *S. haemolyticus* e *S. capitis* que possuem genes codificadores de enterotoxinas estafilocócicas clássicas, mas que não produziam as enterotoxinas *in vitro*. A realização de estudos complementares para avaliar com mais detalhes a capacidade enterotoxigênica desses isolados seria bastante interessante, assim como a pesquisa de genes para as demais SE.

4.6 Triagem da presença de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) com a utilização de meio de cultura cromogênico

Os isolados confirmados como *S. aureus* foram semeados em placas contendo ágar ChromID MRSA para avaliação de sua resistência à meticilina. Dezesesseis dos 41 isolados foram capazes de multiplicar em ágar ChromID MRSA após incubação por 40 h, porém, ao contrário do controle positivo, não eram visíveis em 18 h de incubação. Apesar de terem multiplicado, essas colônias de coloração verde-azulada apresentavam característica ligeiramente diferente do controle positivo, pois apresentavam centro escurecido. Uma vez que o ágar ChromID MRSA foi desenvolvido para pesquisa clínica e ainda não foi avaliado para a pesquisa de MRSA de origem alimentar, era importante a pesquisa do gene *mecA* nesses isolados.

Segundo Nonhoff et al. (2009), com o passar do tempo a sensibilidade do meio de cultura cromogênico ChromID MRSA aumenta e a especificidade diminui. Isso pode ser explicado pela instabilidade a 35°C da cefoxitina, antibiótico utilizado neste meio de cultura, que degrada a essa temperatura sendo essa reação tempo dependente. Isso pode explicar a detecção de crescimento dos isolados avaliados apenas após 40h de incubação.

Resultados discrepantes como os obtidos no presente estudo também foram relatados por Corrente et al. (2007) ao compararem métodos de detecção de MRSA isolados de alimentos. Após detecção do gene *mecA* por PCR, os autores observaram resultados falso-positivos e falso-negativos com a utilização de meio cromogênico e, também, verificaram que algumas cepas que continham o gene *mecA* eram sensíveis à oxacilina e à cefoxitina no método Kirby-Bauer de difusão

em disco. Contudo, esses dados reforçam a necessidade da utilização da PCR para pesquisa do gene *mecA* nesse estudo.

4.7 Pesquisa da presença do gene *mecA* nos isolados de *S. aureus*

Ao serem submetidos à pesquisa do gene *mecA*, todos os isolados de *S. aureus* foram negativos. Exemplos de controles positivo e negativo, assim como um isolado negativo para o gene *mecA*, estão apresentados na figura 10.

Até o momento, nunca foram isolados MRSA de aves no Brasil. Isso é muito bom, pois o Brasil, como um importante exportador de carne de aves deve assegurar a qualidade microbiológica dos produtos aqui produzidos. Outros estudos, com frangos de abate convencional, deveriam ser realizados no país para verificar a presença ou ausência de MRSA nas carcaças desses animais. Esses resultados seriam importantes não somente para confirmar a qualidade da carne de aves produzidas no país, mas também para estudar métodos que evitem a propagação desses micro-organismos, caso sejam encontrados em aves.

4.8 Perfil de suscetibilidade a antimicrobianos

4.8.1 Isolados de *Staphylococcus aureus*

Os 41 isolados identificados como *S. aureus* foram submetidos ao teste de sensibilidade a antimicrobianos pelo método de Kirby-Bauer de difusão com disco, sendo que apenas 4,9% (2/41) deles foram resistentes a tetraciclina, 2,4% (1/41) resistentes a penicilina e 4,9% (2/41) apresentaram resistência intermediária à ciprofloxacina. Apenas um isolado apresentou concomitantemente resistência à tetraciclina e resistência intermediária à ciprofloxacina, sendo os demais resistentes a apenas um antimicrobiano. Todos os isolados foram sensíveis aos demais antibióticos. Os resultados dos testes de sensibilidade a antimicrobianos, apenas para os isolados que apresentaram resistência, estão apresentados no Quadro 3.

De acordo com o CLSI (2011) a maioria dos isolados de *S. aureus* detectados é resistente à penicilina; quando ocorrem isolados sensíveis a esse antibiótico pelo método Kirby-Bauer de difusão em disco, é imprescindível verificar se os mesmos produzem a enzima β -lactamase. Em caso afirmativo, o isolado é considerado resistente à penicilina. Dessa forma, todos os 41 isolados identificados como *S. aureus* foram submetidos ao teste de produção de β -lactamase com a utilização dos discos de nitrocefina. Verificou-se que 40 deles eram sensíveis à penicilina, não demonstrando a produção da enzima; já o isolado resistente foi capaz de alterar a coloração do disco de nitrocefina, o que indica ser ele produtor da enzima β -lactamase.

QUADRO 3 – Perfil de resistência a antimicrobianos (CLSI, 2011) dos isolados de *S. aureus* provenientes de carcaças de frango *kosher* coletadas na cidade de São Paulo.

Isolado*	Ciprofloxacina (5 µg)	Penicilina (10 UI**)	Tetraciclina (30 µg)
1			
2			
3			
4			

*Sensíveis a clindamicina (2 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), linezolida (30 µg), oxacilina (1 µg), quinupristina-dalfopristina (15 µg), rifampicina (5 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (1,25/23,75 µg), e vancomicina (30 µg). Verde: sensível; amarelo: resistência intermediária; vermelho: resistente.

** Unidades internacionais.

Nossos resultados diferem bastante dos relatados pelo CLSI 2011, entretanto aqueles são provenientes de isolados de origem clínica o que pode explicar essa diferença. Yucel et al. (2011), ao compararem a frequência de resistência a antibióticos em *S. aureus* isolados de amostras clínicas e de amostras de alimentos (frango, leite cru e queijo) na Turquia, verificaram que a ocorrência de resistência entre cepas de *S. aureus* isoladas de alimentos não foi alta quando comparado com o perfil das isoladas de amostras clínicas. Dentre os antibióticos testados por aqueles autores destacam-se a ciprofloxacina, clindamicina, gentamicina, linezolida,

meticilina, penicilina, quinupristina/dalfopristina, tetraciclina e vancomicina, antibióticos esses também utilizados no presente estudo. Para penicilina a ocorrência de resistência foi alta tanto para cepas de amostras de alimentos (92%) quanto para cepas de amostras clínicas (98,3%). A segunda maior percentagem de resistência encontrada foi para tetraciclina, sendo que 56,3% dos isolados provenientes de amostras clínicas e 9,5% daqueles provenientes de alimentos apresentaram essa característica. Esses valores são muito superiores aos encontrados no presente estudo, onde apenas 2,4% (1/41) de isolados mostraram-se resistentes à penicilina e 4,9% à tetraciclina.

Todos os 41 isolados foram sensíveis à vancomicina quando testados com as fitas M.I.C. Evaluator. A realização da MIC para vancomicina foi decorrente de orientações do CLSI (2011) que especificam que MIC é necessária para diferenciar isolados suscetíveis daqueles que apresentam resistência intermediária a esse antibiótico.

Já os dois isolados que apresentaram resistência intermediária à ciprofloxacina (Quadro 3) pelo método Kirby-Bauer de difusão em disco, quando avaliados com as fitas M.I.C Evaluator apresentaram concentrações inibitórias mínimas condizentes com isolados sensíveis à ciprofloxacina. A MIC encontrada para esses dois isolados foi de 1 µg/mL, sendo que um valor de MIC de 2 µg/mL é considerado como resistência intermediária (CLSI, 2011). Com os isolados resistentes à tetraciclina (Quadro 3) observou-se que esses apresentam maior sensibilidade a esse agente antimicrobiano, pois a MIC observada foi 16 µg/mL, 1,9 vezes menor que o testado em disco.

Os 41 isolados foram também submetidos à avaliação de seu perfil de resistência empregando o sistema automatizado VITEK e os resultados para resistência a penicilina e ciprofloxacina foram divergentes dos encontrados com a difusão em disco. No VITEK, apresentaram resistência intermediária à ciprofloxacina 46% (19/41) dos isolados contra 2/41 encontrados com a difusão em disco. Já para penicilina o método automatizado considerou 100% dos isolados como resistentes a esse antibiótico, enquanto pelo Kirby-Bauer apenas um isolado foi resistente. Dentre os isolados testados no VITEK, 70% (29/41) foram resistentes à norfloxacina, antibiótico este não testado no método Kirby-Bauer de difusão em disco, mas pertencente à classe das fluorquinolonas, assim como a ciprofloxacina. Conforme citado anteriormente, 46% dos isolados apresentaram resistência intermediária a

ciprofloxacina no VITEK. Essa alta resistência a norfloxacina (70%) e à ciprofloxacina encontrada nesse estudo pode ser explicada pela utilização dos antibióticos norfloxacina e enrofloxacina no tratamento clínico das aves (comunicação pessoal).

Segundo a granja produtora, somente esses dois antibióticos são utilizados no tratamento clínico, o que explica a alta percentagem de isolados sensíveis a antibióticos, inclusive à penicilina. Além disso, são utilizados na produção da ração os aditivos zootécnicos os medicamentos anticoccidianos nicarbazina, narasina e salinomicina, que agem contra protozoários do gênero *Eimeria* e o antibiótico enramicina, polipeptídico não autorizado para fins terapêuticos em medicina humana ou veterinária. De acordo com a Portaria nº 40 do MAPA (Brasil, 2006), a enramicina não é absorvida pelo trato gastrointestinal, não deixando resíduos nos tecidos dos animais tratados. Não foram encontrados dados na literatura relativos à possível ocorrência de resistência cruzada entre enramicina e outros antibióticos (BRASIL, 2006).

Apesar da maioria (40/41) dos isolados ser sensível à penicilina pelo teste de Kirby-Bauer, o VITEK identificou produção da enzima β -lactamase em todos os 41 e os considerou positivos, ou seja, resistente à penicilina.

Resultados discrepantes entre métodos de avaliação de perfil de resistência de *S. aureus* já foram observados por outros pesquisadores. Kaase et al. (2008), ao compararem cinco métodos de detecção da enzima β -lactamase, verificaram que a sensibilidade dos discos de nitrocefina é relativamente baixa e que pode haver variação dependendo da forma do teste empregado (fita, líquido ou disco). Os resultados do estudo de Kaase et al. (2008) indicam que os discos de nitrocefina apresentam boa especificidade. Dessa forma, para garantir que os isolados de *S. aureus* do presente estudo não são produtores da enzima β -lactamase, o ideal seria submetê-los à pesquisa do gene *blaZ* codificador para essa enzima.

4.8.2 Isolados de *Staphylococcus* não produtores de coagulase

Os isolados desse grupo foram submetidos somente à avaliação de sensibilidade a antimicrobianos pelo teste de Kirby-Bauer de difusão em disco.

Dentre os 245 isolados identificados como *Staphylococcus* foram selecionados 185, representando as principais espécies identificadas e amostras de aves, para serem submetidos ao teste. Desses, 80% (148/185) apresentaram algum tipo de resistência a antimicrobianos, sendo que 28 (18,9%) apresentaram apenas resistência intermediária, na maioria das vezes (25/28) resistência intermediária à tetraciclina.

A frequência de resistência observada à tetraciclina (112/185, 60,5%) foi bastante significativa não tendo sido observada resistência tão elevada a nenhum outro dos agentes testados. Para os demais agentes observou-se: eritromicina (23/185, 12,4%); clindamicina (22/185, 11,9%); cloranfenicol (4/185, 2,2%); ciprofloxacina (2/185, 1,1%); penicilina (1/185, 0,5%) e trimetoprim-sulfametoxazol (1/185, 0,5%). Somam-se a esses os isolados que apresentaram resistência intermediária: 1,1% (2/185) a ciprofloxacina; 8,1% (15/185) a clindamicina; 2,7% (5/185) a eritromicina; 0,5% (1/185) a trimetoprim-sulfametoxazol; e 14,6% (27/185) a tetraciclina. Todos os isolados foram sensíveis a cefoxitina, gentamicina, linezolida, quinupristina-dalfopristina e rifampicina. Os isolados que apresentaram resistência à eritromicina e sensibilidade à clindamicina, quando submetidos ao teste D foram negativos, indicando que esses isolados não apresentam resistência induzida à clindamicina.

A tabela 9 mostra a percentagem de resistência encontrada nas diferentes espécies para cada antibiótico. Nessa tabela, os isolados com resistência intermediária também foram classificados como resistentes. O perfil completo de suscetibilidade a antimicrobianos dos *Staphylococcus* não produtores de coagulase está apresentado no apêndice B.

Desses isolados, 75% (139/185) apresentaram algum tipo de resistência à tetraciclina, antibiótico esse muito utilizado em avicultura. Entretanto, segundo a granja produtora das aves esse antibiótico não tem sido utilizado no tratamento clínico das mesmas, mas não foi informado se a granja já utilizou tetraciclina para o tratamento das aves criadas no local. Em contrapartida, apenas 2% (4/185) dos isolados foram resistentes à ciprofloxacina, antibiótico este da mesma classe dos antimicrobianos que tiveram sua utilização confirmada no tratamento clínico. O ideal seria visitar a granja produtora para avaliar quais antibióticos já foram e/ou estão sendo utilizados.

TABELA 9 – Perfil de resistência a antimicrobianos de espécies de *Staphylococcus* sp. provenientes de frango *kosher*.

Espécies	% de isolados resistentes						
	CIP	DA	C	E	P	SXT	TE
<i>S. hyicus</i>	-	3,2	-	1,6	1,6	-	95,1
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticus</i>	1,1	24,7	3,4	13,5	-	2,2	55,1
<i>S. simulans</i>	2,1	21,3	-	19,1	-	-	57,4
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	100,0	-	-	
<i>S. capitis</i>	20,0	40,0	-	20,0	-	-	20,0
<i>S. xylosus</i>	14,3	14,3	14,3	14,3	-	-	42,9

*CIP – Ciprofloxacina (5 µg); DA – Clindamicina (2 µg); C – Cloranfenicol (30 µg); E – Eritromicina (15 µg); P – Penicilina (10 unidades); SXT – Trimetoprim-Sulfametoxazol (1,25/23,75 µg); TE – Tetraciclina (30 µg). Todos os isolados foram sensíveis a Cefoxitina (30 µg), Gentamicina (10 µg), Linezolida (30 µg), Quinupristina-Dalfopristina (15 µg), Rifampicina (5 µg).

Os dados do presente estudo são semelhantes aos de Aarestrup et al. (2000) no que diz respeito à resistência a tetraciclina, mas não à ciprofloxacina. Aqueles autores, ao pesquisarem a resistência a antimicrobianos de *Staphylococcus* sp. isolados de aves na Dinamarca, encontraram uma percentagem elevada de isolados resistentes a tetraciclina (49%) e à ciprofloxacina (30%). Já para os demais agentes testados (bacitracina, canamicina, cloranfenicol, ciprofloxacina, eritromicina, estreptomicina, gentamicina, oxacilina, penicilina, sulfametoxazol, quinupristina/dalfopristina, tetraciclina, trimetoprim e vancomicina) verificaram alta sensibilidade. Os autores não apontaram possíveis origens da elevada resistência à tetraciclina encontrada.

Dos isolados que apresentaram resistência a antimicrobianos 100 (69,4%) foram resistentes a somente um agente e 30,6% (44/144) deles foram resistentes a mais de um tipo de droga. A tabela 10 mostra o número de isolados resistentes a um ou mais antimicrobianos de acordo com as espécies de *Staphylococcus* não produtores de coagulase. Para facilitar a visualização da tabela, os isolados com resistência intermediária foram considerados como resistentes.

Proporcionalmente, os isolados de *S. xylosus* foram os que apresentaram maior percentagem de multirresistência (66,7%), seguido de *S. simulans* (33,3%) e *S. cohnii* subsp. *urealyticus* (51,9%). Conforme apresentado em 4.3.2, todos esses isolados podem ter origem humana.

TABELA 10 – Ocorrência de *Staphylococcus* sp. provenientes de carcaças de frango *kosher* apresentando multirresistência a antibióticos.

Espécies	N isolados total/ resistentes (%)	Nº antibióticos*			
		1	2	3	4
<i>S. hyicus</i>	77/ 59 (76,6)	56	2	1	
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticus</i>	54/ 52 (96,3)	24	19	3	6
<i>S. simulans</i>	30/ 29 (96,7)	19	3	6	1
<i>S. capitis</i>	7/ 1 (14,3)				1
<i>S. xylosus</i>	3/ 3 (100,0)	1		2	
TOTAL	171 / 144 (84,2)	100	24	12	8

* Resistentes à ciprofloxacina (5 µg), clindamicina (2 µg), cloranfenicol (30 µg), eritromicina (15 µg), penicilina (10 unidades), trimetoprim-sulfametoxazol (1,25/23,75 µg) e tetraciclina (30 µg). Sensíveis à cefoxitina (30 µg), gentamicina (10 µg), linezolida (30 µg), quinupristina-dalfopristina (15 µg), rifampicina (5 µg), e vancomicina (30 µg).

Esses resultados mostram que as carcaças de frango *kosher* produzidas no abatedouro em que foi realizado o presente estudo não representam risco de disseminação de *Staphylococcus* resistentes a agentes antimicrobianos, exceto a tetraciclina. Entretanto, os médicos veterinários responsáveis pelo controle de qualidade do abatedouro já foram informados sobre a alta ocorrência de resistência à tetraciclina verificada nos isolados *Staphylococcus* não produtores de coagulase para tomada de providências.

Por outro lado, a alta sensibilidade à penicilina dos *Staphylococcus* não produtores de coagulase testados é muito promissora, pois indica que a granja evita

o uso de β -lactâmicos na produção, o que diminui o risco de surgirem MRSA nos frangos produzidos no local.

Foi gratificante observar o cuidado e a preocupação demonstrados por esse abatedouro e pelo fiscal do SIF local com relação à qualidade das aves abatidas e com as boas práticas de produção. Isso pode ser verificado pela baixa frequência de *Staphylococcus aureus* e baixa população de micro-organismos aeróbios mesófilos encontrada nas carcaças de frango, além do cuidado em atender à legislação vigente do MAPA.

5 CONCLUSÕES

A baixa frequência e a baixa população de *Staphylococcus aureus* encontradas no abatedouro em que o estudo foi realizado mostram que a contaminação por este patógeno não é importante nesse abatedouro. Porém, com a simulação do *melichah* em laboratório, ficou comprovado que a etapa de salga realizada no abate *Shechita* reduz significativamente a população de *Staphylococcus aureus* e que a temperatura em que essa etapa é realizada não influencia na população do patógeno. Por outro lado, para a população de micro-organismos aeróbios mesófilos, a etapa de salga não apresentou qualquer influência.

REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F.M.; AGERSÙ, Y.; AHRENS, P.; JÜRGENSEN, J.C.E.; MADSEN, M.; JENSEN, L.B. Antimicrobial susceptibility and presence of resistance genes in staphylococci from poultry. **Veterinary Microbiology**, v. 74, p. 353-364, 2000
- ALMEIDA, L.M.; DE ALMEIDA, M.Z.P.R.B.; DE MENDONÇA, C.L.; MAMIZUKA, E.M. Novel sequence types (STs) of *Staphylococcus aureus* isolates causing clinical and subclinical mastitis in flocks of sheep in the northeast of Brazil. **Journal of Dairy Research**, v. 78, p. 373-378, 2011.
- ALOUF, J.E.; MÜELLER-ALOUF, H. Staphylococcal and streptococcal superantigens: molecular, biological and clinical aspects. **International Journal of Medical Microbiology**, n. 292, p. 429-440, 2003.
- ARGUDÍN, M.A.; MENDOZA, M.C.; RODICIO, M.R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**. n. 2, p. 1751-1773, 2010.
- BENNETT R.W.; LANCETTE G.A. *Staphylococcus aureus* in U.S. Food and Drugs Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition. **Bacteriological Analytical Manual Online**. FDA/CFSAN 2001. Disponível em <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-12.html>>. Acesso em: 25/03/2010.
- BENNETT, R.W.; HAIT, J.M. Staphylococcal enterotoxins: micro-slide double diffusion and ELISA-based methods in Food and Drugs Administration, Center for Food Safety & Applied Nutrition. **Bacteriological Analytical Manual Online**. FDA/CFSAN 2011. Disponível em <<http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm073674.htm>>. Acesso em: 13/03/2012.
- BENNETT, R.W.; MONDAY, S.R. *Staphylococcus aureus*. In: MILIOTIS, M.D.; BIER, J.W. ed **International Handbook of Foodborne Pathogens**. New York: Marcel Dekker, 2003.
- BERGDOLL, M.S. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 10, p. 91-100, 1990.
- BIRNBAUM, P. **Encyclopedia of Jewish concepts**. New York: Hebrew Publishing Company, 1995. p.592.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Circular nº 175 de 16 de maio de 2005. Procedimentos de verificação dos

programas de autocontrole (versão preliminar). Disponível em <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=18810>>. Acesso em: 10/08/2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Instrução Normativa nº 26 de 9 de julho de 2009. Aprova o regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. In: **Diário Oficial da União**, Brasília, Seção 1, 10 de julho de 2009

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Portaria nº 40 de 8 de janeiro de 2006. Relatório Técnico. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/Qualidade%20dos%20alimentos/Relat%C3%B3rio%20T%C3%A9cnico%20GT%20II%20-%2031_07_06.doc>. Acesso em: 27 fev. 2012

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal (RIISPOA). Decreto nº 30.691 de 29 de março de 1952. **Diário Oficial da União**, Brasília, 7 de julho de 1952.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde – Coordenação de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. Análise epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil em 2009. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos_dta_15.pdf>. Acesso em: 17 fev. 2012.

BREMNER, A.; JOHNSTON, M. **Poultry Meat Hygiene and Inspection**. London: WB Saunders Company, 1996. p. 126.

BRYSKIER, A. **Antimicrobial Agents – Antibacterials and Antifungals**. Washington: ASM Press, 2005.

CHEN, T.R.; CHIOU, C.S.; TSEN, H.Y. Use of novel PCR primers specific to the genes of staphylococcal enterotoxin G, H, I for the survey of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-poisoning cases and food samples in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, n. 2, p. 189-197, 2004.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement**, v. 31, n. 1, CLSI, 2011 (CLSI document M100-S21).

- COHEN, N.; ENNAJI, H.; BOUCHRIF, B.; HASSAR, M.; KARIB, H. Comparative study of microbiological quality of raw poultry meat at various seasons and for different slaughtering processes in Casablanca (Morocco). **The Journal of Applied Poultry Research**, v. 16, p. 502-508, 2007.
- CORRENTE, M.; NORMANNO, G.; MARTELLA, V.; BELLACICCO, A.L.; QUAGLIA, N.C.; DAMBROSIO, A.; BUONAVOGLIA, D. D'ABRAMO, M.; BUONAVOGLIA, C. Comparison of methods for the detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates from food products. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, p. 535-539, 2007.
- DERZELLE, S.; DILASSER, F.; DUQUENNE, M.; DEPERROIS, V. Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth. **Food Microbiology**, v. 26, p. 896-904, 2009.
- DEVRIESE, L.A. A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species. **Journal of Applied Bacteriology**, n. 56, p. 215-220, 1984
- DEVRIESE, L.A. Staphylococci in healthy and diseased animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 19, n. 19, p. 71S-80S, 1990.
- DEVRIESE, L.A.; HAJEK, V.; OEDING, P.; MEYER, S.A.; SCHLEIFER, K.H. *Staphylococcus hyicus* (Sompolinsky 1953) comb. nov. and *Staphylococcus hyicus* subsp. chromogenes subsp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 28, n. 4, p. 482-490, 1978.
- DEVRIESE, L.A.; OEDING, P. Coagulase and heat-resistant nuclease producing *Staphylococcus epidermidis* strains from animals. **Journal of Applied Microbiology**, n. 39, p. 197-207, 1975.
- ELLERBROEK, L.I. Research update on major pathogens associated with the processing of poultry and poultry products. In: SMULDERS, F.J.M.; COLLINS, J.D. ed. **Food Safety Assurance and Veterinary Public Health**. The Netherlands: Wageningen Academic Publishers, v. 2, 2004, pp. 81-98
- FESSLER, A.; KADLEC, K.; HASSEL, M.; HAUSCHILD, T.; EIDAM, C.; EHRLICH, R.; MONECKE, S.; SCHWARZ, S. Characterization of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from food and food products of poultry origin in Germany. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 20, p. 7151-7157, 2011.

- FREITAS, M.F.L.; LEÃO, A.E.D.S.; STAMFORD, T.L.M.; MOTA, R.A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em carcaças de frango. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 22, n. 2, p. 271-282, 2004.
- GOMIDE, L.A. de M.; RAMOS, E.M.; FONTES, P.R. **Tecnologia de Abate e Tipificação de Carcaças**. Viçosa: Editora UFV, 2006. p. 86-93.
- HAJMEER, M.N.; MARSDEN, J.L.; CROZIER-DODSON, B.A.; BASHEER, I.A.; HIGGINS, J.J. Reduction of microbial counts at a commercial beef koshering facility. **Journal of Food Science**, v. 64, n. 4, 1999.
- HENNEKINNE, J.A.; OSTYN, A.; GUILLIER, F.; HERBIN, S.; PRUFER, A.L.; GRAGACCI, S. How should staphylococcal food poisoning outbreaks be characterized? **Toxins**, v. 2, p. 2106-2116, 2010
- HUBER, H.; ZIEGLER, D.; PFLÜGER, V.; VOGEL, G.; ZWEIFEL; STEPHAN, R. Prevalence and characteristics of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from livestock, chicken carcasses, bulk tank milk, minced meat, and contact persons. **BMC Veterinary Research**, v. 7, n. 6, 2011.
- ICMSF. **Microorganisms in foods: microbial ecology of food commodities**. New York, 2005. p. 115-130.
- JAN, M. Staphylococci. In: STORRS, M. ed. **Food Safety Handbook**. France: bioMérieux Editions, 2007. pp. 154-163.
- JARRAUD, S.; MOUGEL, C.; THIOULOUSE, J; LINA, G.; MEUGNIER, H.; FOREY, F.; NESME, X.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, *agr* groups (alleles), and human disease. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2; p. 631-641, 2002.
- JAY, J.M.; LOESSNER, M.J.; GOLDEN, D.A. **Modern Food Microbiology**. Gaithersburg: Aspen Publications, 2005. pp. 545-566.
- KAASE, M.; LENG, S.; FRIEDRICH, S.; SZABADOS, F.; SAKINC, T.; KLEINE, B.; GATERMANN, S.G. Comparison of phenotypic methods for penicillinase detection in *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. 6, p. 614-616, 2008.
- KLEIN, I. **A Guide to Jewish Religious Practice**. Jersey City: KTAV Publishing house, 1992. pp. 350-352.
- KLOSS, W.E. Natural populations of the genus *Staphylococcus*. **Annual Review of Microbiology**, v. 34, p. 559-592, 1980.

- KLUYTMANS, J.; VAN LEEUWEN, W.; GOESSENS, W.; HOLLIS, R.; MESSER, S.; HERWALDT, L.; BRUNING, H.; HECK, M.; ROST, J.; VAN LEEUWEN, N. Food-initiated outbreak of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* analyzed by pheno- and genotyping. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 1121-1128, 1995.
- KONDO, Y.; ITO, T.; MA, X.X.; WATANABEL, S.; KREISWIRTH, B.N.; ETIENNE, J.; HIRAMATSU, K. Combination of multiplex PCR for Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* type assignment: rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in Junkyard regions. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 1, p. 264-274, 2007.
- LANCETTE, G.A.; BENNETT, R.W. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. ed. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: American Public Health Association, 2001. pp. 387-403.
- LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.
- LEE, J.H. Methicillin (Oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from major food animals and their potential transmission to humans. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 6489-6494, 2003.
- LEE, Y.D. Expression of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates based on mRNA analysis. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 3, p. 461-467, 2007.
- LIGOZZI, M.; BERNINI, C.; BONORA, M.G.; DE FATIMA, M.; ZULIANI, J.; FONTANA, R. Evaluation of the VITEK 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant gram-positive cocci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 1681-1686, 2002.
- LIN, J.; YEH, K.S.; LIU, H.T.; LIN, J.H. *Staphylococcus aureus* isolated from pork and chicken carcasses in Taiwan: Prevalence and antimicrobial susceptibility. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 3, p. 608-611, 2009.
- LINDBLAD, M.; LINDMARK, H.; LAMBERTZ, S.T.; LINDQVIST, R. Microbiological baseline study of broiler chickens at swedish slaughterhouses. **Journal of Food Protection**, v. 69, n. 12, p. 2875-2882, 2006.
- LIS, E.; PODKOWIK, M.; BYSTRON, J.; STEFANIAK, T.; BANIA, J. Temporal Expression of Staphylococcal Enterotoxin H in Comparison with accessory gene

- regulator-dependent and -independent Enterotoxins. **Journal of Food Protection**, v. 75, n. 2, p. 238-244, 2012
- LOWY, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. **The New England Journal of Medicine**. v. 339, n. 27, p. 520-532, 2003.
- MARTÍN, M.C.; FUEYO, J.M.; GONZALEZ-HEVIA, M.A.; MENDOZA, M.C. Genetic procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three food poisoning outbreaks. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 279-286, 2004.
- MEAD, G.C.; DODD, C.E.R. Incidence, origin and significance of staphylococci on processed poultry. **Journal of Applied Microbiology**, v. 69, Issue Supplement S19, p. 81S-91S, 1990.
- MEAD, G.C.; SCOTT, M.J. Coagulase-negative staphylococci and coliform bacteria associated with mechanical defeathering of poultry carcasses. **Letters in Applied Microbiology**, v. 18, p. 62-64, 1993.
- MIYAGUSKU, L.; CHEN, F.; LEITÃO, M.F.F.; BAFFA, O. Avaliação microbiológica e sensorial da vida-útil de cortes de peito de frango irradiados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, p. 7-16, 2003.
- MORTON, R.D. Aerobic plate count. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. ed. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington: American Public Health Association, 2001, p. 63.
- MULDERS, M.N.; HAENEN, A.P.J.; GEENEN, P.L.; VESSEUR, P.C.; POLDERVAART, E.S.; BOSCH, T.; HUIJSDENS, X.W.; HENGVELD, 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, 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, v. 64, n. 3, p. 245-250, 2002.
- NONHOFF, C.; DENIS, O.; BRENNER, A.; BUIDIN, P.; LEGROS, N.; THIROUX, C.; DRAMAIX, M.; STRUELENS, M.J. Comparison of three chromogenic media and enrichment broth media for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from mucocutaneous screening specimens. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 28, p. 363-369, 2009.

- NORMANNO, G.; CORRENTE, A.; SALANDRA, G.; DAMBROSIO, A.; QUAGLIA, N.C.; PARISI, A.; GRECO, G.; BELLACICCO, A.L.; VIRGILIO, S.; CELANO, G.V. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, n. 117, p. 219-222, 2007.
- OSCAR, T.P. Persistence of *Salmonella* serotypes on chicken skin after exposure to kosher salt and rising. **Journal of Food Safety**, v. 28, p. 389-399, 2008.
- OTTO, M. Staphylococcal Biofilms. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 322, p. 207-228, 2008.
- PALERMO-NETO, J.; DE ALMEIDA, R.T. Antimicrobianos como aditivos em animais de produção. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNADI, M.M. ed. **Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 5 ed., 2011, pp. 608-629.
- PERSOONS, D.; VAN HOOREBEKE, 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, 2009.
- PESAVENTO, G.; DUCCI, B.; COMODO, N.; LO NOSTRO, A. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from raw meat: A research for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Food Control**, v. 18, p. 196-200, 2007.
- PLETINCKX, L.J.; VERHEGGHE, M.; DEWULF, J.; CROMBÉ, F.; DE BLEECKER, Y.; RASSCHAERT, G.; GODDEERIS, B.M.; DE MAN, I. Screening of poultry-pig farms for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: Sampling methodology and within herd prevalence in broiler flocks and pigs. **Infection Genetics and Evolution**, v. 11, n. 8, p. 2133-2137, 2011.
- QUDDOUMI, S.S.; BDOUR, M.; MAHASNEH, A.M. Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from livestock and poultry meat. **Annals of Microbiology**, n. 56, v. 2, p. 155-161, 2006.
- RALL, V.L.M.; SFORCIN, J.M.; DE DEUS, M.F.R.; DE SOUSA, D.C.; CAMARGO, C.H.; GODINHO, N.C.; GALINDO, L.A.; SOARES, T.C.S.; ARAUJO, J.P. Polymerase Chain Reaction detection of enterotoxins genes in coagulase-negative *Staphylococci* isolated from Brazilian Minas Cheese. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 7, n. 9, p. 1121-1123, 2010.

- REGENSTEIN, J.M.; CHAUDRY, M. A brief introduction to some of the practical aspects of the Kosher and Halal laws for the poultry industry. **In:** SAMS, A.R. ed. **Poultry Meat Processing**. Boca Raton: CRC Press, 2001. pp. 281-300.
- REGENSTEIN, J.M.; REGENSTEIN, C.E. A brief introduction to the kosher laws and possible implications for food safety. **In:** WILSON, C.L.; DROBY, S. ed. **Microbial Food Contamination**. Boca Raton: CRC Press, 2001.
- SEO, K.S.; BOHACH, G.A. *Staphylococcus aureus*. **In:** DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R. ed. **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. Washington: ASM Press, 2007. pp. 493-518.
- SHIMIZU, A.; OZARI, J.; KAWANO, J.; SAITOH, Y.; KIMURA, S. Distribution of *Staphylococcus* species on animal skin. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 54, n. 2, p. 355-357, 1992.
- SILVA, B.O.; CARAVIELLO, D.Z.; RODRIGUES, A.C.; RUEGG, P.L. Evaluation of Petrifilm for the Isolation of *Staphylococcus aureus* from Milk Samples. **Journal of Dairy Science**, n. 88, p. 3000-3008, 2005.
- STAMFORD, T.L.; SILVA, C.G.M.; MOTA, R.A.; CUNHA NETO, A. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. Isolados de leite in natura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 1, mar 2006.
- THOMAS, D.Y.; JARRAUD, S.; LEMERCIER, B.; COZON, G.; ECHASSERIEAU, K.; ETIENNE, J.; GOUGEON, M.L.; LINA, G.; VANDENESCH, F. Staphylococcal Enterotoxin-Like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the Enterotoxin Gene Cluster. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 8, p. 4724-4734, 2006.
- TOMPKIN, R.B.; McNAMARA, A.M.; ACUFF, G.R. Meat and poultry products. **In:** DOWNES, F.P.; ITO, K. ed. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington: American Public Health Association, 2001, p. 463-465.
- VANDERHAEGHEN, W.; HERMANS, K.; HAESBROUCK, F.; BUTAYE, P. Review article: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in food production animals. **Epidemiology and Infection**, v. 138, n. 5, p. 606-625, 2010.
- VERNOZY-ROZAND, C.; MAZUYA, C.; PREVOSTB, G.; LAPEYREC, C.; BESD, M.; BRUND, Y.; FLEURETTED, J.. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese. **International Journal of Food Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 271-280, 1996.

- VIÇOSA, G.N.; MORAES, P.M.; YAMAZI, A.K.; NERO, L.A. Enumeration of coagulase and thermonuclease-positive *Staphylococcus* spp. In raw milk and fresh soft cheese: An evaluation of Baird-Parker agar, Rabbit Plasma Fibrinogen agar and the Petrifilm Staph Express count system. **Food Microbiology**, n. 27, p. 447-452, 2010.
- WATERS, A.E.; CONTENTE-CUOMO, T.; BUCHHAGEN, J.; LIU, C.M.; WATSON, L.; PEARCE, K.; FOSTER, J.T.; BOWERS, J.; DRIEBE, E.M.; ENGELTHALER, D.M.; KEIM, P.S.; PRICE, L.B. Multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in US meat and poultry. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 10, p. 1227-1230, 2011
- WIDERSTRÖM, M.; WISTRÖM, J.; SJÖSTEDT, A.; MONSEN, T. Coagulase-negative staphylococci: update on the molecular epidemiology and clinical presentation, with a focus on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, p. 7-20, 2012.
- YARWOOD, J.M.; SCHLIEVERT, P.M. Toxin production. In: HONEYMAN, A.L.; FRIEDMAN, H.; BENDINELLI, M. ed. ***Staphylococcus aureus* infection and disease**. Hingham: Kluwer Academic Publishers, 2001. p. 93.
- YUCEL, N.; CITAK, S.; BAYHÜN, S. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples and foods of animal origin. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 3, p. 427-431, 2011.
- ZHANG, K.; MCCLURE, J.A.; ELSAYED, S.; LOUIE, T.; CONLY, J.M. Novel Multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of Staphylococcal Cassette Chromosome mec types I to V in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 5026-5033, 2005.
- ZHANG, S.; STEWART, G.C. Staphylococcal enterotoxins. In: HONEYMAN, A.L.; FRIEDMAN, H.; BENDINELLI, M. ed. ***Staphylococcus aureus* infection and disease**. Hingham: Kluwer Academic Publishers, 2001. p. 127-136.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Curva de crescimento média (três repetições) de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 em meio BHI.

APÊNDICE B – Perfil de suscetibilidade de *Staphylococcus* spp a antimicrobianos

Espécie	ID	CIP	DA	C	E	P	STX	TE
<i>S. capitis</i>	13							
	16							
	19							
	27							
	29							
	248							
	271							
	20							
	22							
	24							
	25							
	26							
	28							
	30							
	36							
	37							
	39							
	40							
	41							
	43							
	49							
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticus</i>	52							
	54							
	55							
	56							
	65							
	67							
	70							
	71							
	72							
	88							
	93							
	96							
	105							
	107							
	110							
	111							
	113							
	114							
	117							
	128							
	129							
<i>S. epidermidis</i>	134							
	147							
	153							
	155							
	156							
	159							
	161							
	162							
	165							
	169							
	173							
	176							
	189							
	190							
	220							
	249							
	251							
	284							
	287							
	34							
	75							
<i>S. hominis</i>	108							
	121							
	137							
	158							
	163							
	201							
	205							
<i>S. hominis</i>	206							
	207							
<i>S. hominis</i>	15							

Continua

Espèce	ID	CIP	DA	C	E	P	STX	TE
<i>S. hyicus</i>	3							
	4							
	6							
	8							
	9							
	18							
	21							
	51							
	61							
	73							
	85							
	86							
	87							
	92							
	97							
	102							
	109							
	115							
	116							
	122							
	123							
	142							
	150							
	151							
	157							
	178							
	180							
	183							
	185							
	187							
	188							
	191							
	199							
	204							
	212							
	213							
	214							
	215							
	217							
	218							
	219							
	222							
	224							
	225							
	226							
	227							
	228							
	229							
<i>S. sciuri</i>	231							
	232							
	233							
	234							
	240							
	243							
	247							
	254							
	256							
	257							
	258							
	261							
	263							
	265							
	268							
	273							
	276							
	277							
	280							
	286							
	289							
	292							
	295							
	296							
	297							
	301							
	302							
	304							
	305							
	17							

Continua

Espécie	ID	CIP	DA	C	E	P	STX	TE
<i>S. simulans</i>	31							
	32							
	33							
	46							
	53							
	57							
	58							
	59							
	60							
	62							
	63							
	64							
	66							
	74							
	87							
	90							
	95							
	100							
	106							
	125							
	126							
	127							
	130							
	132							
	133							
	135							
	143							
	145							
	148							
	166							
<i>S. warneri</i>	68							
<i>S. xylosus</i>	10							
	168							
	253							

* CIP – Ciprofloxacina (5 µg); DA – Clindamicina (2 µg); C – Cloranfenicol (30 µg); E – Eritromicina (15 µg); P – Penicilina (10 unidades); STX – Trimetoprim-Sulfametoxazol (1,25/23,75 µg); TE – Tetracilina (30 µg). Verde: sensível; amarelo: resistência intermediária; vermelho: resistente.