**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**
**Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel**
**Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos**

Tese

# *Staphylococcus aureus* isolados de *Merluccius merluccius* durante o processamento do pescado salgado: caracterização fenotípica e genotípica

**Flávia Liége Schütz Voloski**

Pelotas, 2018

**Flávia Liége Schütz Voloski**

# ***Staphylococcus aureus*** **isolados de*Merluccius merluccius* durante o processamento do pescado salgado: caracterização fenotípica e genotípica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora:Prof[a]. Dra. Eduarda Hallal Duval

Pelotas, 2018

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

V929s Voloski, Flávia Liége Schütz

Staphylococcus aureus isolados de Merluccius merluccius durante o processamento do pescado salgado : caracterização fenotípica e genotípica / Flávia Liége Schütz Voloski ; Eduarda Hallal Duval, orientadora. — Pelotas, 2018.

80 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2018.

1. Resistência antimicrobiana. 2. Resistência a sanitizantes. 3. Enterotoxinas estafilocócicas. 4. Tolerância ao sal. 5. Produção de biofilme. I. Duval, Eduarda Hallal, orient. II. Título.

CDD : 664

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Flávia Liége Schütz Voloski

*Staphylococcus aureus* isolados de *Merluccius merluccius* durante o processamento do pescado salgado: caracterização fenotípica e genotípica

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Ciência e Tecnologia de Alimentos,Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 28/9/2018

Banca examinadora:

_____

Prof[a]. Dra. Eduarda Hallal Duval (Orientadora)
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Santa Catarina

_____

Prof[a]. Dra. Caroline Peixoto Bastos
Doutora em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

_____

Prof[a]. Dra. Helenice Gonzales de Lima
Doutora em Zootecnia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

_____

Prof[a]. Dra. Mirian Ribeiro Galvão Machado
Doutora em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

**Agradecimentos**

À Universidade Federal de Pelotas, especialmente ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela oportunidade de realizar este estudo.

À minha orientadora, Eduarda, pela confiança em meu trabalho, amizade e companheirismo durante esses 6 anos de pós-graduação.

Aos professores Wladimir, Eliézer e Ritinha, por todos os ensinamentos.

Aos amigos do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal e do Laboratório de Microbiologia de Alimentos.

À Gabi, pela amizade e ajuda incansável nessa reta final.

À minha família, em especial à minha mãe e à minha avó, por todo o apoio.

Ao meu namorado, João, por estar sempre ao meu lado.

E a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste estudo.

Muito obrigada!

**Resumo**

VOLOSKI, Flávia Liége Schütz. ***Staphylococcus aureus* isolados de pescado salgado: caracterização fenotípica e genotípica**. 2018. 80f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

A salga é uma das técnicas mais antigas e utilizadas em todo o mundo para prolongar a vida útil do pescado. *Staphylococcus aureus* é um micro-organismo capaz de crescer na presença de sal, podendo ser uma fonte de contaminação durante a manipulação e processamento de pescado salgado. Neste estudo, buscou-se identificar a presença de *S. aureus* em diferentes etapas da produção de pescado salgado em uma fábrica de conservas, avaliando a enterotoxigenicidade, capacidade de produção de biofilme, tolerância ao sal e o perfil de resistência a sanitizantes e antimicrobianos nos isolados através de testes fenotípicos e genotípicos. Um total de 18 isolados de *S. aureus* foram obtidos em diferentes dias de coleta e etapas do processamento. Todos os isolados foram resistentes à ação do sanitizante clorexidina (4µg/mL<CIM<16µg/mL), enquanto que 83% foram resistentes ao cloreto de benzalcônio (2µg/mL<CIM<8 µg/mL). O gene *mepA* foi identificado em 22% dos isolados. Um perfil de multirresistência antimicrobiana foi identificado nos isolados, sendo verificada a presença dos genes *ereb* (67%), *tetM* (50%), *blaZ* (50%), *Tn916-1545* (44%), *tetL* (33%) e *tetB*(17%). A presença dos genes *eea*, *eeb*, *icaA* e *icaD* foi verificada em 78%, 11%, 89% e 89% dos isolados, respectivamente. Além de tolerar altas concentrações de sal (30%), os isolados de *S. aureus* demonstraram uma forte adaptação a 10% de NaCl, concentração na qual a produção de biofilme foi melhor induzida e houve a expressão da enterotoxina A, a mais comumente envolvida em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica. Os resultados encontrados ressaltam a importância da adoção de corretas práticas higiênico-sanitárias durante o processamento e manipulação de pescado salgado, evitando a persistência e disseminação de *S. aureus*no ambiente e diminuindo os riscos à saúde da população.

**Palavras-chave**: Resistência antimicrobiana; Resistência a sanitizantes; Enterotoxinas estafilocócicas; Tolerância ao sal; Produção de biofilmes.

**Abstract**

VOLOSKI, Flávia Liége Schütz.***Staphylococcus aureus* isolated from salted fish: phenotypic and genotypic characterization**. 2018. 80f. Thesis(Doctorate in Food Science and Technology) – PostgraduateProgram in Food Science and Technology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2018.

Salting is one of the oldest techniques and used worldwide to prolong the shelf life of fish.*Staphylococcus aureus* is a microorganism capable of growing in the presence of salt and may be a source of contamination during handling and processing of salted fish.The objective of this study was to identify the presence of S. aureus in different stages of the production of salted fish in a canning factory, evaluating the enterotoxigenicity, biofilm production capacity, salt tolerance and the profile of resistance to sanitizers and antimicrobials in the isolated by phenotypic and genotypic tests.A total of 18 *S. aureus* isolates were obtained on different days of collection and processing steps. All isolates were resistant to the action of the chlorhexidine sanitizer (4 µg/mL<MIC<16 µg/mL), while 83% were resistant to benzalkonium chloride (2 µg/mL<MIC<8 µg/mL).The *mepA* gene was identified in 22% of the isolates. A multidrug resistance profile was identified in isolated and verified the presence of genes *ereb* (67%), *tetM* (50%),*blaZ* (50%), *Tn916-1545* (44%), *tetL* (33%) and *tetB* (17%).The presence of the genes *eea*, *eeb*, *icaA* and *icaD* was verified in 78%, 11%, 89% and 89% of the isolates, respectively.In addition to tolerating high salt concentrations (30%), *S. aureus* isolates showed a strong adaptation to 10% NaCl, concentration at which biofilm production was better induced and expression of enterotoxin A, most commonly involved in outbreaks of staphylococcal food poisoning.The results found highlight the importance of adopting correct hygienic-sanitary practices during the processing and handling of salted fish, avoiding the persistence and dissemination of *S. aureus* in the environment and reducing the health risks of the population.

**Keywords:**Antimicrobial resistance;Resistance to sanitizers; Staphylococcal enterotoxins; Salt tolerance;Biofilm production.

## Lista de Abreviaturas e Siglas

| | |
|---|---|
| DVA | Doenças Veiculadas por Alimentos |
| EE | Enterotoxina Estafilocócica |
| EPS | Exopolissacarídeos |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase |
| QACs | Compostos Quaternários de Amônio |
| qPCR | PCR em Tempo Real |

**Sumário**

**1 Introdução ..... 7**
**2 Objetivos ..... 10**
**2.1 Objetivo geral ..... 10**
**2.2 Objetivos específicos ..... 10**
**3 Revisão bibliográfica ..... 11**
3.1 *Staphylococcus aureus* ..... 11
3.2 Intoxicação alimentar estafilocócica e enterotoxinas estafilocócicas (EEs) ..... 11
3.3 Produção de biofilme por *S. aureus* ..... 13
3.4 Resistência a antimicrobianos ..... 16
**4 Artigo 1:Multirresistência antimicrobiana e a desinfetantes em *Staphylococcus aureus* isolados de pescado salgado ..... 18**
4.1 Introdução ..... 18
4.2 Materiais e Métodos ..... 19
4.2.1 Coleta de amostras ..... 19
4.2.2 Isolamento de Estafilococos Coagulase Positiva ..... 20
4.2.3 Confirmação fenotípica de *S. aureus* ..... 20
4.2.4 Confirmação molecular dos isolados ..... 21
4.2.4.1 Extração de DNA ..... 21
4.2.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ..... 21
4.2.5 Concentração inibitória mínima (CIM) de sanitizantes ..... 24
4.2.6 Teste de resistência antimicrobiana ..... 24
4.2.7 Detecção de genes de resistência a sanitizantes e antimicrobianos ..... 25
4.3 Resultados ..... 25
4.3.1 Isolamento de Estafilococos Coagulase Positiva ..... 25
4.3.2 Confirmação fenotípica e molecular de *S. aureus* ..... 26
4.3.3 Concentração inibitória mínima e detecção de genes de resistência a sanitizantes ..... 26
4.3.4 Resistência antimicrobiana e detecção de genes de resistência a antimicrobianos ..... 27
4.4 Discussão ..... 29
4.5 Conclusão ..... 33
Referências ..... 33

**5 Artigo 2:Influência da tolerância ao sal sobre a produção de enterotoxinas e biofilmes em *Staphylococcus aureus* isolados de pescado salgado ..... 40**
5.1 Introdução ..... 40
5.2 Materiais e métodos ..... 41
5.2.1 Confirmação fenotípica de *S. aureus* ..... 42
5.2.2 Confirmação molecular dos isolados ..... 42
2.2.1 Extração de DNA ..... 42
5.2.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) ..... 43
5.2.3 Detecção de genes *icaA*, *icaD* e de enterotoxinas clássicas ..... 44
5.2.4 Capacidade de produção de biofilme ..... 45
5.2.4.1 Poliestireno ..... 45
5.2.4.2 Aço inoxidável ..... 45
5.2.5 Eficiência de sanitizantes na remoção de biofilmes em aço inoxidável ..... 46
5.2.6 Tolerância ao sal ..... 47
5.2.7 PCR em Tempo Real (qPCR) ..... 47
5.2.8 Análise estatística ..... 48
5.3 Resultados ..... 48
5.3.1 Confirmação fenotípica e molecular dos isolados ..... 48
5.3.2 Detecção de genes de enterotoxinas clássicas ..... 49
5.3.3 Detecção dos genes *icaA* e *icaD* ..... 49
5.3.4 Capacidade de produção de biofilme ..... 49
5.3.5 Remoção de biofilmes por sanitizantes ..... 51
5.3.6 Tolerância ao sal ..... 52
5.3.7 Análises de transcrição ..... 52
5.4 Discussão ..... 53
5.5 Conclusões ..... 58
Referências ..... 58
**6 Considerações finais ..... 65**
**Referências ..... 66**

## 1 Introdução

A produção e o consumo de pescado tem aumentado entre os brasileiros. Em 2015, foram produzidas 483 mil toneladas de pescado no Brasil, com incremento de 1,5% em relação a 2014. O consumo é de, aproximadamente, 14,5 Kg/habitante/ano, superando o consumo mínimo recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que é de 12 Kg/habitante/ano. Este aumento no consumo tem sido influenciado pelos esforços do parque industrial pesqueiro nacional, aprimorando o sistema de pesca e cultivo de pescado, e das indústrias de processamento, trabalhando com a tecnificação dos processos produtivos, gerando maior aproveitamento e agregando valor aos produtos nacionais (BRASIL, 2017). Além disso, o crescente interesse dos consumidores com relação a aspectos nutricionais e de qualidade dos alimentos tem contribuído para o aumento do consumo de pescado e seus derivados (GHANBARI et al., 2013).

Embora o pescado seja um alimento de alto valor nutritivo, sua composição rica em nutrientes proporciona um ambiente ideal para o desenvolvimento e multiplicação de inúmerostipos de micro-organismos(EMBORG et al., 2002; DALGAARD et al., 2006; MEJLHOLM et al., 2008). A incidência de patógenos bacterianos em produtos de pesca está intimamente relacionada com as condições ambientais, qualidade microbiológica da água, métodos de captura e refrigeração, manipulação pós-colheita e condições de processamento (FELDHUSEN, 2000).

Diferentes técnicastêm sido desenvolvidas ao longo do tempo com o objetivo de prolongar a vida útil do pescadoe garantir a sua segurança microbiológica (GHANBARI et al., 2013). Dentre essas técnicas, a salga é uma das mais antigas e utilizadas em todo o mundo (THORARINSDOTTIR et al., 2004). Além de retardar a deterioração, também atua diretamente sobre o crescimento de micro-organismos patogênicos e produção de toxinas, através da redução da atividade de água no alimento (KÖSE, 2010).

Vários estudos apontam riscos associados ao consumo de pescado salgado, principalmente por ser frequentemente consumido sem tratamento térmico apropriado, exposto e comercializado à temperatura ambiente e também devido a

práticas inadequadas durante a sua manipulação, processamento e armazenamento, desde a matéria-prima até o produto final. Além disso, micro-organismos halofílicos e halotolerantes conseguem se desenvolver com facilidade em altas concentrações de sal(LAKSHMANAN; SHAKILA; JEYASEKARAN, 2002; BASTI et al., 2006).

*Staphylococcus aureus* éum dos principais agentes bacterianos causadores de DVAem todo o mundo.É um micro-organismo que coloniza a pele e as membranas mucosas de humanos, podendo, portanto, ser uma fonte de contaminação dos alimentos durante a sua manipulação e processamento(LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003; BATHIA & ZAHOOR, 2007; TODD et al., 2007). Por possuir inúmeros parâmetros de crescimento, incluindo diferentes temperaturas, pH e concentrações de sal, *S. aureus* é de grande importância em alimentos onde a microbiota normal já foi destruída ou inibida,como em produtos salgados (VISHWANATH; LILLABATI; BIJEN, 1998; BORE et al., 2007; RODE et al., 2007).

A intoxicação alimentar estafilocócica ocorre após a ingestão de alimentos contaminados, contendo de 20 ng a <1 µg de enterotoxina estafilocócica (EE) (BERGDOLL, 1989). Este nível de toxina é alcançado quando o número de células viáveis do patógeno excede $10^5$ UFC/g de alimentos (BATHIA; ZAHOOR, 2007). As EEs são resistentes à proteólise e estáveis ao calor, de modo que sua presençaenvolve um risco significativo na segurança dos alimentos (OMOE et al., 2005). A DVA é autolimitante e os sinais clínicos (náuseas, cólicas abdominais, diarreias e vômitos) desaparecem dentro de 24 a 48 horas após o início. Como consequência, a incidência real de intoxicação alimentar por *S. aureus* é subestimada, já que a maioria dos casos não são relatados aos serviços de saúde (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003; LAWRYNOWICZ-PACIOREK et al., 2007).

No geral, as bactérias estão organizadas em ambientes naturais sob a forma de biofilmes, que consistem em comunidades estruturadas de células bacterianas, embutidas em uma matriz de polímero orgânico e aderidas a uma superfície inerte ou viva (CARPENTIER; CERF, 1993). A produção de biofilmes é considerada um importante fator de virulência para *S. aureus*(VASUDEVAN et al., 2003), tornando-o um micro-organismo facilmente adaptável a uma ampla variedade de ambientes(RODE et al., 2007).Segundo Costerton et al. (1987), bactérias agrupadas em biofilmes são, geralmente, mais resistentes ao stress ambiental do que quando em vida livre. Assim, a produção de biofilmes e a consequente fixação de bactérias

emsuperfícies de contatocom alimentos, ou aos próprios produtos alimentares, resulta em dificuldades na correta higienização dentro das indústrias de alimentos, perdas econômicas devido à contaminação com micro-organismos deteriorantes e patogênicos, e risco à saúde dos consumidores (RODE et al., 2007).

Um grande número de substâncias são utilizadas, tanto no ambiente clínico como em indústrias de alimentos, para reduzir a contaminação ambiental e de utensílios e equipamentos, e também para o controle de doenças infecciosas (AARESTRUP; HASMAN, 2004). A utilização indiscriminada desses compostos tem proporcionado o surgimento de bactérias resistentes a múltiplos fármacos, tornando difícil a sua erradicação e agravando os problemas de saúde pública em muitos países, devido à persistente circulação destas bactérias no ambiente e à possível contaminação da água e dos alimentos (SHELDON, 2005; NORMANNO et al., 2007). Vários genes de resistência a sanitizantes e diferentes perfis de resistência antimicrobiana têm sido observados para *S. aureus* (ENRIGHT, 2003; LIU et al., 2015; NORMANNO et al., 2007; PESAVENTO et al., 2007; PEREIRA et al., 2009).

A combinação de virulência mediada por toxinas, produção de biofilmes e resistência a sanitizantes e antimicrobianos torna *S. aureus* um importante patógeno relacionado àáreaclínica e de alimentos (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003). Assim, informações fenotípicas e genotípicas associadas a esses fatores devirulência são de grande valia para identificar os risco associados à contaminação por este micro-organismo.

# 2 Objetivos

## 2.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil fenotípico e genotípico de isolados de *S. aureus* provenientes de diferentes etapas do processamento de pescado salgado

## 2.2 Objetivos específicos

- Verificar a presença de *S. aureus* em diferentes etapas do processamento de pescado salgado em uma fábrica de conservas;
- Verificar a tolerância e capacidade de multiplicação dos isolados de *S. aureus* em diferentes concentrações de NaCl;
- Avaliar a enterotoxigenicidade dos isolados bacterianos;
- Avaliar a capacidade de produção de biofilme dos isolados bacterianos em poliestireno e aço inoxidável, sob diferentes temperaturas e condições de cultivo;
- Avaliar o perfil de resistência a sanitizantes e antimicrobianos dos isolados bacterianos;
- Avaliar a eficiência da remoção de biofilmes em aço inoxidável por três sanitizantes de uso comum na indústria de alimentos;
- Verificar a presença de genes envolvidos na produção de biofilmes, de enterotoxinas clássicas e de resistência a sanitizantes e antimicrobianos nos isolados bacterianos;
- Verificar o efeito de 10% de NaCl sobre os níveis de expressão transcricional de enterotoxina A.

# 3 Revisão bibliográfica

## 3.1*Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* é um micro-organismo Gram-positivo, anaeróbico facultativo, imóvel, não formador de esporos, catalase e coagulase positivo, cujas células apresentam-se na forma de cocos esféricos sozinhos ou dispostos em pares, formando grupamentos que aparentam um cacho de uva. A parede celular estafilocócica é resistente à lisozima e sensível à lisostafina, que cliva especificamente as pontes de pentaglicina (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003). Seu habitat natural consiste nas narinas, pele e cabelos de animais de sangue quente, sendo 30-50% da população humana portadores assintomáticos (TODD et al., 2007).

Capaz de crescer em uma ampla faixa de temperatura (7°C a 48,5°C, com crescimento ótimo entre 30°C e 37°C), pH (4,2 a 9,3, com crescimento ótimo entre 7,0 e 7,5) e concentrações de sal (até 15% de NaCl), *S. aureus* pode se desenvolver em diversos tipos de alimentos (BERGDOLL, 1989; SCHMITT et al., 1990; LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003). Essas características, aliadas ao seu nicho ecológico, justificam a sua alta incidência em produtos que requerem manipulação durante o processamento.

A combinação de virulência mediada por toxinas, invasividade, produção de biofilmes e resistência a antimicrobianos, torna *S. aureus* um importante patógeno tanto para a área clínica, como de alimentos. A sintomatologia dos quadros de doenças causadas pelo micro-organismo pode variar de espinhas e furúnculos à síndrome do choque tóxico e sepse, os quais dependem de numerosos fatores de virulência.Por outro lado, a intoxicação alimentar depende de um único fator de virulência: as EEs (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003).

## 3.2Intoxicação alimentar estafilocócica e enterotoxinas estafilocócicas (EEs)

As intoxicações alimentares estafilocócicas resultam da ingestão de alimentos contendo EEs pré-formadas por cepas enterotoxigênicas de *S. aureus* (BERGDOLL, 1989; LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003; KEROUANTON et al., 2007). Doses

inferiores a 1 µg de EE podem causar os sintomas da doença, em um indivíduo adulto saudável, dentro de 1 a 6 horas após o consumo de alimentos contaminados. Este nível de toxina é alcançado quando o número de células viáveis do patógeno excede $10^5$ UFC/g de alimentos (BATHIA; ZAHOOR, 2007). Como medida preventiva, limites legais variando entre $10^2$ e $5x10^3$ UFC/g foram definidos para Estafilococos Coagulase Positiva em diferentes tipos de alimentos no Brasil (BRASIL, 2001).Para pescados salgados, o limite estabelecido é de 5 x $10^2$UFC/g (BRASIL, 2001).

As EEs são proteínas de baixo peso molecular (P.M. 26,900-29,600), solúveis em água e em soluções salinas, ricas em lisina, ácido aspártico, ácido glutâmico e resíduos de tirosina. São altamente estáveis e resistem à maioria das enzimas proteolíticas, como pepsina ou tripsina, o que mantém sua atividade no trato disgestivo após a ingestão (BALABAN; RASOOLY, 2000; LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003). Além disso, são altamente resistentes ao calor (OMOE et al., 2005), sendo difícil prever o impacto de tratamentos térmicos sobre a sua atividade, uma vez que esta depende da matriz alimentar e do tipo e concentração de EE (SCHWABE et al., 1990).

Existem 18 EEsconhecidas até o momento, as quais são designadas com letras de A a U, em ordem alfabética, excluindo as letras F, S e T (HOLTFRETER; BRÖKER, 2005).As EEs são divididas em cinco tipos sorológicos com base na sua antigenicidade (EEs clássicas): EEA, EEB, EEC, EED e EEE (BERGDOLL, 1989). Nos últimos anos, novasEEs têm sido relatadas e, embora nove tipos sorológicos diferentes (EEA-EEE e EEG-EEJ) tenham provado possuir atividade emética (KEROUANTON et al., 2007; ORTEGA et al., 2010), 95% das intoxicações alimentares estafilocócicas ainda são causadas pelas EEs clássicas (VÁZQUEZ-SANCHÉZ et al., 2012). EEs que carecem de propriedades eméticas são designadas EE-*like*(EEl)(LINA et al., 2004) e foram inseridas como membros da família EE com base em suas similaridades de sequência com as EEs clássicas(OMOE et al., 2005).

Genes que codificam para enterotoxinas estão associados com elementos genéticos móveis, como ilhas de patogenicidade, prófagos e plasmídeos, o que implica que estes genes possam ser transferidos horizontalmente entre cepas estafilocócicas (YARWOOD et al., 2002; OMOE et al., 2003; HOLTFRETER; BRÖKER, 2005; OMOE et al., 2005).

### 3.3 Produção de biofilme por *S. aureus*

SegundoCarpentier e Cerf (1993), um biofilme é uma comunidade de micro-organismos embutidos em uma matriz de polímero orgânico, aderidos a uma superfície, sendo extremamente heterogêneos na sua estrutura e composição química.Em estado hidratado, um biofilme contém, aproximadamente, 98% de água, protegendo as células bacterianas contra a desidratação, uma vez que permite a retenção de água em quantidades muito superiores à sua própria massa, utilizando-a somente quando necessário (MORTON et al., 1998).

A formação de biofilmes é um processo dinâmico onde diferentes genes e mecanismos estão envolvidos na sua fixação e maturação (RODE et al., 2007). Segundo Costerton et al. (1987), primeiramente, de forma aleatória, ocorre a adesão de bactérias planctônicas à uma superfície, sendo esta reversível e mantida por interações físico-químicas não específicas, que constituem a base para o crescimento do biofilme. Posteriormente, as células bacterianas iniciamo processo de adesão irreversível através da secreção de exopolissacarídeos (EPS) pelo glicocálix, que serão responsáveis pela manutenção da adesão e da camada que envolve o biofilme. Em seguida, a divisão celular produz células-irmãs vinculadas com o glicocálix matriz, iniciando a formação de microcolônias aderentes e o desenvolvimento do biofilme maduro. Os biofilmes maduros são envoltos por diversas substâncias, principalmente açúcares, e rodeados por poros e canais de água que facilitam a troca de nutrientes, oxigênio e metabólitos.

A última fase da formação do biofilme ocorre quando o ambiente já não é mais favorável à sua manutenção, e consiste no descolamento do biofilme maduro,na forma de agregados celulares ou de células planctônicas. Após desprendidas, as bactérias livres podem colonizar novas superfícies, reiniciando a formação de biofilmes (COSTERTON et al., 1987). As diferentes fases da formação de um biofilme podem ser visualizadas na Figura 1.

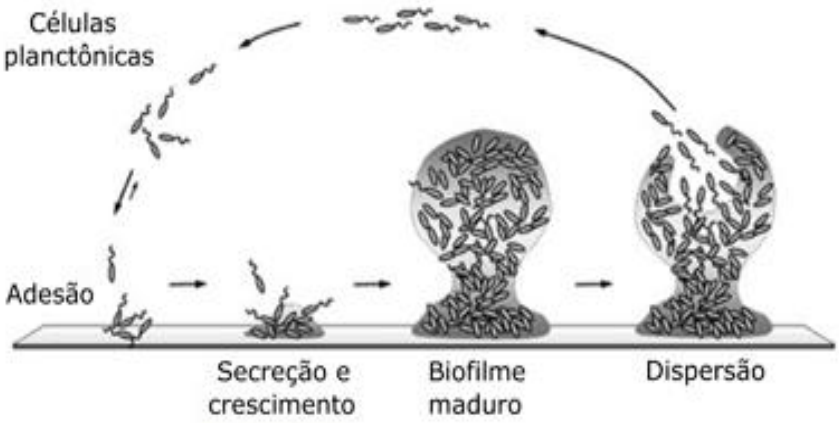


Figura 1 – Fases da formação de um biofilme bacteriano.
Fonte: Costerton et al. (1987) adaptado

Simões et al. (2010) explicam que a adesão bacteriana a superfícies pode ser influenciada por diversos fatores, como características físico-químicas da bactéria, propriedades da superfície e fatores ambientais. Além disso, propriedades biológicas da bactéria, como a presença de fímbrias, flagelos e a produção de EPS também influenciam nessa adesão.

*Staphylococcus aureus* é um micro-organismo facilmente adaptável que pode viver em uma ampla variedade de ambientes sob a forma de biofilme, um importante fator de virulência que o torna mais resistente ao stress ambiental (VASUDEVAN et al., 2003; RODE et al., 2007). Segundo Otto (2008), a produção de biofilme é considerada parte do ciclo normal de vida de *S. aureus* no ambiente, protegendo a comunidade bacteriana de tensões ambientais, do sistema imunológico do hospedeiro e da ação de antimicrobianos (COSTERTON et al., 1987). Assim, superfícies de contato com alimentos podem atuar como reservatório de *S. aureus* em indústrias, desempenhando um importante papel como fonte de contaminação dos alimentos (VÁZQUEZ-SANCHÉZ et al., 2014).

A matriz extracelular de *S. aureus* é composta principalmente pelos polissacarídeos poli-N-acetilglicosamina (PNAG) e polissacarídeo adesina intercelular (PIA) (MACK et al., 1996; CRAMTON et al., 1999; MAIRA-LITRAN et al., 2002),sintetizados pela N-acetilglicosaminiltransferase, enzima que é induzida pela coexpressão dos genes *icaA* e *icaD*, produtos do operon cromossômico de adesão intercelular (*ica*) (CRAMTON et al., 1999). A expressão do operon *ica* tem sido considerada importante para a produção de biofilmes por *S. aureus* sob diferentes condições ambientais (HEILMANN et al., 1996; GERKE et al., 1998; VALLE et al.,

2003). Alterações nas propriedades físico-químicas da superfície e na topografia do substrato, além de fatores ambientais como osmolaridade, teor de nutrientes e temperatura, podem aumentar a expressão do operon *ica* e, consequentemente, a formação de biofilme(KUMAR; ANAND, 1998; CRAMTON et al., 2001). Além disso, mecanismos *ica*-independentes também já foram relatados (FITZPATRICK et al., 2005; KOGAN et al., 2006). Condições sub-ótimas de crescimento aumentam a produção de biofilme, sendo considerada uma estratégia de sobrevivência para*S. aureus* (RODE et al., 2007).

A produção de biofilmes pode ocorrer em uma grande variedade de superfícies de contato com alimentos (MARQUES et al., 2007).Dentre os materiais disponíveis, aço inoxidável e poliestireno são comumente utilizados na indústria de alimentos, onde o primeiro é fundamental na produção de equipamentos e superfícies de processamento, devido à sua resistência mecânica, à corrosão e aos danos causados pelo processo de limpeza, enquanto que o segundo é utilizado, principalmente, para a confecção de embalagens (PIMENTEL-FILHO et al., 2014).

Embora muitos tipos de sanitizantes sejam utilizados para eliminar micro-organismos nas indústrias de alimentos, as bactérias na forma de biofilme são capazes de tolerar com facilidade a ação destes compostos, ao contrário de suas células planctônicas (DONLAN; COSTERTON, 2002). Segundo Spoering e Lewis (2001), a resistência a esses compostos pode ocorrer em função do desenvolvimento de diferentes fenótipos e adaptações a microambientes.

Sanitizantes são compostos químicos aplicados para inativar ou destruir micro-organismos nos mais variados tipos de ambientes, sendo classificados em álcoois, formaldeídos, glutaraldeídos, compostos liberadores de cloro ativo, compostos quaternários de amônio, iodóforos e biguanidas (MC DONELL; RUSSEL, 1999; AARESTRUP; HASMAN, 2004; SHAMSUDIN et al., 2012). Ao contrário dos antimicrobianos, que interagem com estruturas ou processos metabólicos nas células microbianas, os sanitizantes agem de forma não específica contra alvos múltiplos (MEYER; COOKSON, 2010).

A escolha de um sanitizante deve considerar fatores como o espectro de atividade desejada, toxicidade, poder residual, custo, estabilidade e natureza do material a ser tratado, não havendo um único produto com todas as características desejadas. Cada sanitizante possui vantagens e desvantagens que devem ser avaliadas no momento da seleção para o uso (MCDONNEL; RUSSEL, 1999). A

eficácia dos sanitizantes está relacionada à ação sobre a parede celular ou membrana externa, membrana citoplasmática, proteínas funcionais e estruturais, DNA, RNA e outras proteínas citosólicas de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (BRIDIER et al., 2011).

Vários genes de resistência a sanitizantes têm sido identificados em *S. aureus*, os quais podem ser codificados via plasmídeos ou cromossomos. O gene *qacA* confere suscetibilidade reduzida a uma ampla gama de cátions antimicrobianos orgânicos, incluindo compostos quaternários de amônio e biguanidas, enquanto o gene *smr* codifica uma proteína pertencente a uma pequena família de resistência a múltiplas drogas, que reduz a suscetibilidade a compostos quaternários de amônio (QACs), brometo de etídio e cetrimida (LEELAPORN et al., 1994; MITCHELL; BROWN; SKURRAY, 1998; MC DONNELL; RUSSEL, 1999; FURI et al., 2013).Diferentemente dos genes *qacA* e *smr*, que são codificados por plasmídeos, o gene *mepA* é codificado cromossomicamente, sendo responsável por sete sistemas de efluxo em *S. aureus* (KAATZ; McALEESE; SEO, 2005; LIU et al., 2015).

### 3.4Resistência a antimicrobianos

A utilização generalizada de antimicrobianos tem proporcionado o aumento do surgimento de bactérias resistentes a múltiplos fármacos, o que torna cada vez mais difícil a sua erradicação (VÁZQUEZ-SÁNCHEZ et al., 2012) e agrava os problemas de saúde pública em muitos países, principalmente devido à persistente circulação destas bactérias no ambiente e à possível contaminação da água e dos alimentos (NORMANNO et al., 2007).

*Staphylococcus aureus* multirresistente tornou-se um problema emergente (POPOVICH et al., 2008), já tendo sido encontradas cepas resistentes a antimicrobianos em animais de produção (LEE, 2003) e alimentos como carne (NORMANNO et al., 2007; PESAVENTO et al., 2007), leite e produtos lácteos (GÜNDOGÂN et al., 2006; PEREIRA et al., 2009) e em produtos de pesca (BELENEVA, 2011; VÁZQUEZ-SANCHÉZ et al., 2012).

Segundo Mathur e Singh (2005), os principais mecanismos de resistência a antimicrobianos conhecidos incluem mudança na permeabilidade da membrana, inativação enzimática do antimicrobiano ($\beta$-lactamases, transferases), transporte ativo do antimicrobiano (sistemas de efluxo dependentes de ATP inseridos

namembrana), modificação do alvo (metilação do rRNA 23S, mutação da sequência deum aminoácido) ou mudanças de rotas metabólicas.

Historicamente, o desenvolvimento de resistência antimicrobiana em *S. aureus* tem sido rápido. A resistência à penicilina, por exemplo, foi observada apenas um ano após a sua introdução na terapia clínica em 1941. No início da década de 1950, três quartos das cepas de *S. aureus,*em muitos países, tornaram-se resistentes à penicilina (FINLAND, 1955).Em 2008,90-95% das cepas clínicas já eram resistentes a este antimicrobiano (SAKOULAS et al., 2008). Em 1959, foi criado o beta-lactâmico sintético meticilina, resistente à ação das beta-lactamases que *S. aureus* produzia. Da mesma maneira, dois anos depois surgiu a primeira cepa de *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) (PARKER; JEVONS, 1964).

Os genes que expressam resistência a antimicrobianos em *S. aureus* podem ser cromossomais ou plasmidiais. No primeiro caso, as características de resistência são codificadas por DNA cromossomal e podem ser transferíveis entre as cepas, que atuam como reservatórios de genes de resistência (TEALE, 2002). No caso da resistência plasmidial, *S. aureus* não consegue conjugar-se com outra célula em função da falta de pilus sexual, geralmente presente em bactérias Gram-negativas. Em tal condição, a transdução fágica ou a ligação à membrana, são necessárias (COURVALIN, 1994).

A contaminação cruzada de alimentos com biotipos distintos de *S. aureus* nas diferentes etapas da cadeia alimentar, bem como a transferência de genes de resistência entre diferentes cepas, são pontos preocupantes, que tornam necessária a detecção de qualquer expansão e/ou incremento de nova resistência a antimicrobianos que possa ser transferida a outras bactérias (PESAVENTO et al., 2007).

## 4 Artigo 1:

**Multirresistência antimicrobiana e a desinfetantes de*Staphylococcus aureus* isolados de pescado salgado**

### 4.1 Introdução

O consumo de pescado tem aumentado entre os brasileiros, atingindo o patamar de 14,4 Kg/habitante/ano, superando o consumo mínimo recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), que é de 12 Kg/habitante/ano. Este aumento no consumo tem ocorrido em função do aprimoramento do sistema de pesca e cultivo de pescados, bem como pela tecnificação dos processos produtivos, gerando maior aproveitamento e agregando valor aos produtos nacionais (BRASIL, 2017).

O pescado é um alimento de alto valor nutritivo, rico em proteínas, vitaminas e ácidos graxos essenciais, o que proporciona um ambiente ideal para o desenvolvimento de micro-organismos (EMBORG et al., 2002; DALGAARD et al., 2006; MEJLHOLM et al., 2008). Dentre os principais patógenos de origem alimentar, *Staphylococcus aureus*já foi associado a doenças veiculadas pelo consumo de pescados e produtos de pesca (FELDHUSEN, 2000; SIMON; SANJEEV, 2007). Por ser pouco competitivo e capaz de crescer em diferentes temperaturas, pH e concentrações de sal, *S. aureus* é de grande importância em alimentos onde a microbiota normal já foi destruída ou inibida, como em pescados salgados (VISHWANATH; LILLABATI; BIJEN, 1998; BORE et al., 2007; RODE et al., 2007), podendo resultar em casos de intoxicação alimentar (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003).

De acordo com Aarestrup e Hasman (2004), um grande número de substâncias são utilizadas na produção de alimentos de origem animal, incluindo sanitizantes, para reduzir a contaminação ambiental e de utensílios e equipamentos, e antimicrobianos, para o tratamento ou controle de doenças infecciosas. A utilização generalizada desses compostos tem proporcionado o surgimento de bactérias multirresistentes a fármacos, tornando difícil a sua erradicação e

agravando os problemas de saúde pública em muitos países, devido à persistente circulação destas bactérias no ambiente e à possível contaminação da água e dos alimentos (SHELDON, 2005; NORMANNO et al., 2007).

Nos últimos anos, compostos quaternários de amônio (QACs), como cloreto de benzalcônio, e biguanidas, como clorexidina, têm sido amplamente utilizados para controlar o crescimento microbiano em ambientes clínicos e industriais (MILSTONE; PASSARETTI; PERL, 2008; TIMSIT et al., 2009; BUFFET-BATAILLON et al., 2012). Vários genes de resistência a sanitizantes têm sido identificados em *S. aureus*, os quais podem ser codificados via plasmídeos ou cromossomos. O gene *qacA* confere suscetibilidade reduzida a uma ampla gama de cátions antimicrobianos orgânicos, incluindo compostos quaternários de amônio e biguanidas, enquanto o gene *smr* codifica uma proteína pertencente a uma pequena família de resistência a múltiplas drogas, que reduz a suscetibilidade a QACs, brometo de etídio e cetrimida (LEELAPORN et al., 1994; MITCHELL; BROWN; SKURRAY, 1998; MC DONNELL; RUSSEL, 1999; FURI et al., 2013).Diferentemente dos genes *qacA* e *smr*, que são codificados por plasmídeos, o gene *mepA* é codificado cromossomicamente, sendo responsável por sete sistemas de efluxo em *S. aureus* (KAATZ; McALEESE; SEO, 2005; LIU et al., 2015).

Segundo Taheri et al. (2016), a maioria dos estudos avalia o perfil de resistência a sanitizantes e antimicrobianos em isolados clínicos de *S. aureus,* havendo poucos relatos em isolados de alimentos. Portanto, o objetivo deste estudo foi identificar a presença de *S. aureus* durante o processamento de pescado salgado, avaliando o perfil fenotípico e genotípico de resistência dos isolados frente a diferentes sanitizantes e antimicrobianos.

## 4.2 Materiais e Métodos

### 4.2.1 Coleta de amostras

Coletas foram realizadas em uma fábrica de conservas de pescado, localizada na região Sul do Rio Grande do Sul, Brasil, a qual comercializa diferentes espécies de pescados salgados, além de pescados congelados e farinha de peixe para ração animal.

Um total de 30 amostras de pescada (*Merluccius merluccius*) (n = 30) foram coletadas em diferentes etapas do processamento de pescado salgado (após a

seleção, no tanque de salga, na pilha de escorrimento e após a pesagem) através de swabs esterilizados, os quais foram mantidos em solução salina 0,85% até o momento das análises.

O estudo foi realizado no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal e no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, ambos pertencentes à Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

### 4.2.2 Isolamento de Estafilococos Coagulase Positiva

Diluições decimais das amostras foram realizadas em solução salina 0,85%, das quais alíquotas de 0,1 mL foram semeadas na superfície de placas contendo ágar Baird-Parker (ABP, Acumedia®), que foram incubadas a 35°C ± 1°C por 48h. Colônias típicas e atípicas foram selecionadas, transferidas para caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Acumedia®) e incubadas a 35°C ± 1°C por 48h. Alíquotas foram semeadas em ágar Tripticase de Soja (TSA, Acumedia®) e incubadas a 35°C ± 1°C. As colônias foram submetidas à coloração de Gram e aquelas com características morfológicas do gênero *Staphylococcus*foram submetidas aos testes bioquímicos da coagulase e catalase (SILVA et al., 2010).

### 4.2.3 Confirmação fenotípica de *S. aureus*

A confirmação fenotípica dos isolados foi realizada através do teste de resistência dos isolados bacterianos à acriflavina, utilizando ABP suplementado com acriflavina (7µg.mL$^{-1}$ - Sigma Aldrich®). Os isolados foram repicados em caldo BHIe incubados a 37°C por 24h. Um inóculo de cada isolado foi semeado em placas contendo ABP acrescido de acriflavina, que foram incubadas a 37°C por 48h. O resultado típico consistiu no aparecimento de dois halos em torno das colônias. Esse teste foi realizado uma vez que, dentre todas as espécies de Estafilococos Coagulase Positiva, apenas *S. aureus* é resistente à acriflavina (DEVRIESE, 1981).

### 4.2.4 Confirmação molecular dos isolados

4.2.4.1 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de acordo com protocolo recomendado por Matthews et al. (1997), com modificações. Uma cultura do isolado em ágar tripticase de soja (TSA, Acumedia®) foi transferida para 100µL de solução TE-A (10mM hidroximetil aminoetano - TRIS e 5 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA) até turbidez 1,0 da escala de MacFarland. A lise do peptideoglicano celular ocorreu pela adição de 100µL de lisostafina (100 µg/mL, Sigma Aldrich®) e incubação a 37°C por 45min, seguido pela adição de 20 µL de solução TE-B (50mM hidroximetil aminoetano - TRIS e 20 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA) contendo 20% de SDS (Dodecil sulfato de sódio, Invitrogen®)e 3µL de proteinase K (Invitrogen®), e incubação a 37°C por uma hora. Em seguida, foram adicionados 200 µL de solução NaCl 5M (Cloreto de Sódio, Synth®) e agitou-se, suavemente, por 15 segundos, seguido de centrifugação (10.000 x *g*, 4ºC por 15min). O sobrenadante foi transferido para um tubo estéril e extraído com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1, Synth®) por centrifugação (16.000 x *g*, 4ºC, 15min). O DNA foi precipitado com dois volumes de etanol frio a 95% e manutenção *overnight* (-20°C). Após centrifugação (16.000 x *g*, 4°C, 10min), o *pellet* foi lavado duas vezes com etanol (70%), seco durante 30 minutos e suspenso em 30µL de água ultrapura. Em seguida, 2 µL de RNAse (10 mg/mL, Invitrogen®) foi adicionado e a mistura foi incubada a 37°C durante uma hora. O DNA foi mantido a -20°C e quantificado por espectrofotometria em Eppendorf BioSpectrometer kinetic® (Eppendorf).

4.2.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os isolados foram confirmados como *S. aureus* através de PCR, tendo como alvo o gene 16S do rRNA para a identificação do gênero, e o gene *nuc*, que codifica a termonuclease, para a determinação da espécie. Os *primers* utilizados, o tamanho esperado dos fragmentos e o protocolo utilizado estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – *Primers,* tamanho esperado dos produtos de amplificação (pb) e protocolos utilizados para a identificação de genes de resistência a sanitizantes e diferentes classes de antimicrobianos.

| *Primer* | Sequência 5'-3' | Pb | Referência |
|---|---|---|---|
| 16S1<br>16S2 | GGACGGGTGAGTAACACGTGG<br>TCCCGTAGGAGTCTGGACCGT | 252 | Baron et al. (2004) |
| NUC1<br>NUC2 | ATGAAGTCAAATAAATCGCT<br>TTTGGTGAAAAATACTTCTC | 458 | Baron et al. (2004) |
| *qacA* F<br>*qacA* R | ACTACTGATATGATGACATCA<br>AGTTATATCAAGTGATTTGGG | 1512 | Mereghetti et al. (2000) |
| *mepA* F<br>*mepA* R | ATGTTGCTGCTGCTCTGTTC<br>TCAACTGTCAAACGATCACG | 718 | Hassanzadeh et al. (2017) |
| *smr* F<br>*smr* R | ATAGCCATAAGTACTGAAGTT<br>ACCGAAAATGTTTAACGAAAC | 291 | Mereghetti et al. (2000) |
| *ereB* F<br>*ereB* R | AGAAATGGAGGTTCATACTTACCA<br>CATATAATCATCACCAATGGCA | 546 | Sutcliffe et al. (1996) |
| *ermB* F<br>*ermB* R | CATTTAACGACGAAACTGGC<br>GGAACATCTGTGGTATGGCG | 424 | Jensen et al. (1999) |
| *ermC* F<br>*ermC* R | AATCGTCAATTCCTGCATGT<br>TAATCGTGGAATACGGGTTTG | 299 | Strommenger et al. (2003) |
| *tetA* F<br>*tetA* R | GTAATTCTGAGCACTGT<br>CCTGGACAACATTGCTT | 953 | Frech & Schwarz (2000) |
| *tetB* F<br>*tetB* R | ACGTTACTCGATGCCAT<br>AGCACTTGTCTCCTGTT | 4169 | Frech & Schwarz (2000) |
| *tetK* F<br>*tetK* R | GTAGCGACAATAGGTAATAGT<br>GTAGTGACAATAAACCTCCTA | 360 | Strommenger et al. (2003) |
| *tetL* F<br>*tetL* R | CAAACTGGGTGAACACTG<br>CCTGTTCCCTCTGATAAA | 1028 | Pang et al. (1994) |
| *tetM* F<br>*tetM* R | AGTGGAGCGATTACAGAA<br>CATATGTCCTGGCGTGTCTA | 158 | Strommenger et al. (2003) |
| *tetO* F<br>*tetO* R | AATGAAGATTCCGACAATTT<br>CTCATGCGTTGTAGTATTCCA | 781 | Li et al. (2007) |
| *Tn916-1545* F<br>*Tn916-1545* R | GCGTGATTGTATCTCACT<br>GACGCTCCTGTTGCTTCT | 1028 | Li et al. (2007) |
| *sul1* F<br>*sul1* R | ATGGTGACGGTGTTCGGCATTCTG<br>CTAGGCATGATCTAACCCTCGGTCT | 884 | Grape et al. (2003) |
| *sul2* F<br>*sul2* R | GCGCTCAAGGCAGATGGCATT<br>GCGTTTGATACCGGCACCCGT | 293 | Kerm et al. (2002) |
| *dfrG* F<br>*dfrG* R | TTTCTTTGATTGCTGCGATG<br>CCCTTTTTGGGCAAATACCT | 422 | Bertsch et al. (2013) |
| *blaZ* F | ACTTCAACACCTGCTGCTTTC | 172 | Martineau et al. |

| | | | |
|---|---|---|---|
| *blaZ* R | TGACCACTTTTATCAGCAACC | | (2000) |
| *mecA* F<br>*mecA* R | AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC<br>AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC | 533 | Murakami et al. (1991) |

As amostras foram submetidas à técnica de PCR em termociclador MJ Research PTC 100. Para cada reação, foram adicionados 12,5 µL de GoTaq® GreenMaster Mix 2X (Promega Corp.), 1 pmol de cada *primer* para o gene 16S rRNA e 10 pmol para o gene da termonuclease, 2 µL de DNA (50 ng), e água ultrapura (Promega Corp.) até um volume final de 25 µL. As reações foram realizadas com as seguintes condições: 95°C por 4 min, 95°C por 2 min, 52,7°C por 2 min, seguido por 32 ciclos de 72°C por 2 min (BARON et al., 2004). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5x (solução de Tris, ácido bórico e EDTA)a 80V por 70min, utilizando um marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen®). O produto amplificado foi visualizado sob luz UV em transiluminador(Loccus®,L-Pix Touch).

As cepas utilizadas como controle positivo da reação, controle negativo para a identificação da espécie bacteriana e controle negativo para a identificação de gênero são mostradas na tabela 2.

Tabela 2 – Caracterização de espécies de cepas e isolados utilizados neste estudo.

| Espécies | Cepas | Aplicação |
|---|---|---|
| *S. aureus* | ATCC 25923 | CP: PCR (nuc1, 2), testes de resistência a sanitizantes e a antimicrobianos |
| *S. xylosus* | ATCC 29971 | CN: PCR (espécies bacterianas) |
| *S. sciuri* | ATCC 29061 | CN: PCR (espécies bacterianas) |
| *S. lugdunensis* | ATCC 49576 | CN: PCR (espécies bacterianas) |
| *S. epidermidis* | ATCC 12228 | CN: PCR (espécies bacterianas) |
| *S. haemolyticus* | ATCC 29970 | CN: PCR (espécies bacterianas) |
| *S. capitis* | ATCC 35661 | CN: PCR (espécies bacterianas) |
| *S. saprophyticus* | ATCC 15305 | CN: PCR (espécies bacterianas) |
| *Escherichia coli* | ATCC 11229 | CN: PCR (gênero) |
| SASF | Este estudo | Testes de resistência a antimicrobianos |

CP: Controle Positivo; CN: Controle negativo; ATCC: *American Type Culture Collection*; FRI: *Food Research Institute*; SASF 1-18: *S. aureus* isolados de pescado salgado.

### 4.2.5 Concentração inibitória mínima (CIM) de sanitizantes

A CIM de dois sanitizantes, cloreto de benzalcônio (Fluka Analytical®) e digluconato de clorexidina (Sigma Aldrich®), foi determinada em duplicata usando o método de microdiluição em caldo, de acordo com o protocolo descrito pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). Determinou-se a CIM através da dupla diluição em série de cada solução biocida, variando de 0,25µg/mL a 128µg/mL, em caldo Mueller Hinton (MH, Acumedia®). Em uma placa de microdiluição, cada diluição foi inoculada com cultivos celulares (aproximadamente $5x10^6$ UFC/mL) dos isolados bacterianos, seguido de incubação a 37°C por 24h, sendo observada a presença ou ausência de crescimento em cada diluição. Os isolados foram considerados sensíveis ao cloreto de benzalcônio quando CIM ≤3 mg/L e à clorexidina quando CIM ≤ 1,0mg/L. Sensibilidade reduzida foi considerada quando o CIM variou de 1,5 a 3mg/L (SHAMSUDIN et al., 2012).

### 4.2.6 Teste de resistência antimicrobiana

A partir das culturas mantidas em ágar tripticase de soja (TSA, Acumedia®), os isolados bacterianos foram cultivados em caldo Brain Heart Infusion (BHI, Acumedia®) durante 16-18 horas a 37°C. Inóculos bacterianos com 0,5 de densidade óptica ($OD_{600nm}$) foram semeados sobre a superfície de placas de ágar Mueller-Hinton (MHA, Acumedia®). O teste de difusão em disco, recomendado pelo CLSI (2015), foi utilizado para determinar a susceptibilidade a 15 diferentes antimicrobianos: eritromicina (ERI, 15µg), trimetoprima (TRI, 5µg), sulfametoxazol-trimetoprima (SUT, 25µg), clindamicina (CLI, 2µg), norfloxacina (NOR, 10µg), ácido nalidíxico (NAL, 30µg), tetraciclina (TET, 30µg), ciprofloxacina (CIP, 5µg), penicilina (PEN, 10µg), cloranfenicol (CLO, 30µg), ceftriaxona (CRO, 30µg), nitrofurantoína (NIT, 300µg), gentamicina (GEN, 10µg), ampicilina (AMP, 10µg) e vancomicina (VAN, 30µg), adquiridos da empresa LaborClin®.Os resultados foram interpretados de acordo com os diâmetros dos halos de inibição para *Staphylococcus* spp. (CLSI, 2015). *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 foi utilizado como controle positivo para os testes. Multirresistência antimicrobiana foi definida como a resistência a três ou mais classes de agentes antimicrobianos.

### 4.2.7 Detecção de genes de resistência a sanitizantes e antimicrobianos

Os isolados de *S. aureus*foram avaliados por PCR quanto à presença de genes que codificam resistência a sanitizantes (*qacA,mepA* e *smr*) e a antimicrobianos da classe dos macrolídeos (*ereB*, *ermB* e *ermC*), tetraciclinas (*tetA,tetB*, *tetL*, *tetM*, *tetO* e *Tn916-1545*), inibidores da via do folato (*sul1*, *sul2* e *dfrG*) e β-lactâmicos (*blaZ* e *mecA*). Os *primers* utilizados em cada reação, bem como o tamanho esperado dos produtos de amplificação, são mostrados na tabela 1.

## 4.3 Resultados

### 4.3.1 Isolamento de Estafilococos Coagulase Positiva

Um total de 18 isolados de *S. aureus* foram obtidos de diferentes dias de coleta (terceira, quarta, sexta, sétima e oitava coletas) e etapas do processamento de pescado salgado, conforme é demonstrado na Tabela 3. Quarenta e quatro porcento (8/18) dos isolados foram provenientes da seleção dos pescados, 28% (5/18) do tanque de salga, 22% (4/18) após a etapa de pesagem e 5% (1/18) na pilha de escorrimento.

Tabela 3 – Designação dos isolados de *S. aureus* obtidos de diferentes etapas do processamento de pescado salgado.

| Isolado | Etapa |
|---|---|
| SASF-1 TS | Tanque de salga |
| SASF-2 S | Seleção |
| SASF-3 TS | Tanque de salga |
| SASF-4 S | Seleção |
| SASF-5 S | Seleção |
| SASF-6 TS | Tanque de salga |
| SASF-7 S | Seleção |
| SASF-8 P | Pesagem |
| SASF-9 E | Escorrimento |
| SASF-10 S | Seleção |
| SASF-11 S | Seleção |
| SASF-12 S | Seleção |
| SASF-13 P | Pesagem |
| SASF-14 TS | Tanque de salga |
| SASF-15 S | Seleção |
| SASF-16 P | Pesagem |
| SASF-17 TS | Tanque de salga |
| SASF-18 P | Pesagem |

### 4.3.2 Confirmação fenotípica e molecular de *S. aureus*

Todos os isolados foram resistentes à acriflavina e, portanto, fenotipicamente caracterizados como *S. aureus.*

Após os testes moleculares, todos os isolados foram considerados *S. aureus*, já que houve a amplificação de um fragmento de 252 pb relacionado ao gene 16S rRNA, específico para o gênero *Staphylococcus*, e também de um fragmento de 458 pb produzido pelo par de *primers* nuc 1 e 2, referente à termonuclease, específica para *S. aureus*.

### 4.3.3 Concentração inibitória mínima e detecção de genes de resistência a sanitizantes

A CIM para o cloreto de benzalcônio variou de 2 µg/mL a 8 µg/mL, enquanto para a clorexidina variou de 4µg/mL a 16µg/mL. Apenas 17% (3/18) dos isolados de *S. aureus* foram sensíveis ao cloreto de benzalcônio, sendo, portanto, 83% (15/18) resistentes a esse sanitizante. Todos os isolados de *S. aureus* foram resistentes à

clorexidina. A Tabela 4apresenta a distribuição da CIM dos dois sanitizantes testados frente aos isolados de *S. aureus.*

Tabela 4– CIM de cloreto de benzalcônio e clorexidine frente a isolados de *S. aureus*(n = 18) provenientes de pescado salgado.

| Sanitizante | n (%) de isolados com CIM (µg/mL) | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 0,25 | 0,5 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 | 128 |
| CBZ | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 3 (17) | 14 (78) | 1 (5) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) |
| CLX | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 0 (0) | 1 (5) | 15 (83) | 2 (11) | 0 (0) | 0 (0) |

*CBZ: cloreto de benzalcônio; CLX: digluconato de clorexidina.

Não foi verificada a presença dos genes *qacA* e *smr* nos isolados testados, enquanto o gene *mepA* foi identificado nos isolados SASF-9, SASF-13, SASF-16 e SASF-17.

### 4.3.4 Resistência antimicrobiana e detecção de genes de resistência a antimicrobianos

Observou-se um perfil de multirresistência antimicrobiana nos isolados de *S. aureus* utilizados neste estudo (Tabela 5), já que 100% dos isolados apresentaram resistência à trimetoprima-sulfametaxol, trimetoprima, clindamicina, penicilina e ceftriaxona. Além disso, a maioria dos isolados foi resistente à eritromicina (17/18), tetraciclina (17/18), ácido nalidíxico (16/18) e vancomicina (16/18). Todos os isolados foram sensíveis à norfloxacina, enquanto que 94% (17/18) foram sensíveis à gentamicina, 89% (16/18) à ciprofloxacina e 78% (14/18) à ampicilina. Com relação ao cloranfenicol e nitrofurantoína, observou-se um perfil fenotípico de resistência antimicrobiana variável, tendo sido identificados tanto isolados sensíveis, como resistentes.

Tabela 5 – Perfil de resistência antimicrobiana dos isolados de *S. aureus* utilizados neste estudo (n = 18).

| Classe | Antimicrobiano | Sensível | | Intermediário | | Resistente | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | n | % | n | % | n | % |
| Macrolídeos | Eritromicina (eri) | 0 | 0 | 1 | 5 | 17 | 94 |
| Inibidores da síntese do folato | Trimetoprima-sulfametaxol (sut) | 0 | 0 | 0 | 0 | 18 | 100 |
| | Trimetoprima (tri) | 0 | 0 | 0 | 0 | 18 | 100 |
| Lincosaminas | Clindamicina (cli) | 0 | 0 | 0 | 0 | 18 | 100 |
| Quinolonas | Norfloxacina (nor) | 18 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Ácido nalidíxico (nal) | 0 | 0 | 2 | 11 | 16 | 89 |
| | Ciprofloxacina (cip) | 16 | 89 | 2 | 11 | 0 | 0 |
| Tetraciclinas | Tetraciclina (tet) | 0 | 0 | 1 | 5 | 17 | 94 |
| β-lactâmicos | Penicilina (pen) | 0 | 0 | 0 | 0 | 18 | 100 |
| | Ampicilina (amp) | 14 | 78 | 0 | 0 | 4 | 22 |
| Anfenicois | Cloranfenicol (clo) | 9 | 50 | 2 | 11 | 7 | 39 |
| Cefalosporinas | Ceftriaxona (cro) | 0 | 0 | 0 | 0 | 18 | 100 |
| Nitrofuran | Nitrofurantoína (nit) | 7 | 39 | 3 | 17 | 8 | 44 |
| Aminoglicosídeos | Gentamicina (gen) | 17 | 94 | 1 | 5 | 0 | 0 |
| Glicopeptídeos | Vancomicina (van) | 1 | 5 | 1 | 5 | 16 | 89 |

Com relação aos genes de resistência, 67% (12/18) dos isolados apresentaram o gene *ereB*, 50% (9/18) os genes *tetM* e *blaZ*, 44% (8/18) o gene *Tn916-1545*, 33% (6/18) o gene tetL, e 17% (3/18) apresentaram o gene *tetB*. Os genes *ermB*, *ermC*, *tetA*, *tetK*, *tetO*, *sul1*, *sul2*, *drfG* e *mecA* não foram identificados nos isolados de *S. aureus* (Tabela 6).

Tabela 6 – Características de isolados de *S. aureus* multirresistentes.

| Isolado | Fenótipo de resistência | Genótipo de resistência |
|---|---|---|
| SASF-1 | Tri, Sut, Pen, Cro, Cli, Nal, Tet, Nit, Van, Eri | *tetL, Tn916-1545* |
| SASF-2 | Tri, Sut, Pen, Cro, Cli, Nal, Tet, Clo, Van, Eri | *ereB, tetM, Tn916-1545* |
| SASF-3 | Tri, Sut, Pen, Cro, Cli, Tet, Nit, Eri | *tetB, tetL, tetM* |
| SASF-4 | Tri, Sut, Pen, Cro, Cli, Nal, Tet, Clo, Van, Eri | *ereB, tetM, blaZ* |
| SASF-5 | Tri, Sut, Pen, Cro, Cli, Nal, Tet, Van, Eri | *ereB, blaZ* |
| SASF-6 | Tri, Sut, Pen, Cro, Cli, Nal, Tet, Clo, Nit, Amp, Van, Eri | *Tn916-1545* |
| SASF-7 | Tri, Sut, Pen, Cro, Cli, Nal, Tet, Van, Eri | *tetL, tetM, Tn916-1545* |
| SASF-8 | Tri, Sut, Pen, Cro, Cli, Nal, Tet, Van, Eri | *ereB, tetB, tetL, tetM* |
| SASF-9 | Tri, Sut, Pen, Cro, Cli, Nal, Tet, Clo, Amp, Van | *ereB, blaZ* |
| SASF-10 | Tri, Sut, Pen, Cro, Cli, Nal, Tet, Nit, Van, Eri | *ereB, tetM, blaZ* |
| SASF-11 | Tri, Sut, Pen, Cro, Cli, Nal, Tet, Nit, Van, Eri | *tetM, blaZ* |
| SASF-12 | Tri, Sut, Pen, Cro, Cli, Nal, Tet, Clo, Eri | *ereB, tetB, tetM, Tn916-1545, blaZ* |
| SASF-13 | Tri, Sut, Pen, Cro, Cli, Nal, Clo, Nit, Amp, Van, Eri | *ereB* |
| SASF-14 | Tri, Sut, Pen, Cro, Cli, Nal, Tet, Clo, Amp, Van, Eri | *ereB, Tn916-1545, blaZ* |
| SASF-15 | Tri, Sut, Pen, Cro, Cli, Tet, Van, Eri | *Tn916-1545, blaZ* |
| SASF-16 | Tri, Sut, Pen, Cro, Cli, Nal, Tet, Van, Eri | *ereB, tetL* |
| SASF-17 | Tri, Sut, Pen, Cro, Cli, Nal, Tet, Nit, Van, Eri | *ereB, Tn916-1545, blaZ* |
| SASF-18 | Tri, Sut, Pen, Cro, Cli, Nal, Tet, Clo, Nit, Amp, Van, Eri | *ereB, tetL, tetM* |

## 4.4 Discussão

*Staphylococcus aureus* é um micro-organismo que coloniza a pele e as membranas mucosas de humanos, sendo considerado uma fonte de contaminação dos alimentos durante a sua manipulação e processamento (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003). Segundo Puah, Chua e Tan (2016), *S. aureus* não faz parte da microbiota de pescados marinhos, estando a sua presença nesses alimentos associada a falhas higiênico-sanitárias durante o processamento. A incidência de patógenos bacterianos em pescados está intimamente relacionada com as condições ambientais, qualidade microbiológica da água, métodos de captura e refrigeração, manipulação pós-colheita e condições de processamento (FELDHUSEN, 2000).

Neste estudo, um total de 18 isolados de *S. aureus* foram obtidos de diferentes etapas do processamento de pescado salgado em uma fábrica de conservas, onde 44,4% (8/18) foram identificados após a etapa de seleção dos pescados, 27,7% (5/18) no tanque de salga, 22,2% (4/18) após a pesagem e 5,5% (1/18) durante o escorrimento. Vázquez-Sanchéz et al. (2012) observaram uma alta incidência de *S. aureus* em produtos de pesca comercializados em Galicia, Espanha, sendo a presença do patógeno detectada em 27% das amostras de pescado salgado analisadas. Da mesma forma, Basti et al. (2006) identificaram *S. aureus* como o patógeno predominante em amostras de pescado salgado no Irã. Além disso, Albuquerque et al. (2007) identificaram a presença de *S. aureus* em superfícies de processamento e nas mãos, cavidades nasais e orais de manipuladores de pescado em Fortaleza/CE, Brasil.

Segundo Vishwanath, Lillabati e Bijen (1998) e Rode et al. (2007), *S. aureus* pode facilmente crescer em alimentos salgados, onde a microbiota competidora é rapidamente inibida. Alguns osmoprotetores, como colina, glicina betaína e prolina, acumulam-se nas células de *S. aureus* como resposta ao estresse osmótico causado pela presença de sal (AMIN; LASH; WILKINSON, 1995). Assim, para diminuir os riscos associados ao consumo de pescado salgado, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabelece como padrão microbiológico para esses produtos uma contagem máxima de $5x10^2$UFC.$g^{-1}$de Estafilococos Coagulase Positiva (BRASIL, 2001), já que condições impróprias de manipulação, processamento e armazenamento podem aumentar os níveis de *S. aureus* (>$10^5$ UFC.$g^{-1}$), permitindo a produção de enterotoxinas estafilocócicas (PEDRO et al., 2004; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ et al., 2012).

A resistência de *S. aureus* a diferentes sanitizantes utilizados no ambiente clínico e de alimentos tem sido relatada (AARESTRUP; HASMAN, 2004; UEDA; KUWABARA, 2007; HO et al., 2012; McDANEL et al., 2013). Os genes *qacA,smr* e *mepA* são conhecidos como genes de multirresistência estafilocócicos, aos quais é atribuída a redução da suscetibilidade a alguns sanitizantes (NAKIPOGLU et al., 2012; FURI et al., 2013; YE et al. 2014).

No presente estudo, a concentração inibitória mínima (CIM) de cloreto de benzalcônio variou de 2µg/mL a 8µg/mL, sendo 83,2% dos isolados de *S. aureus* resistentes à ação desse sanitizante, enquanto que a CIM de clorexidina variou de 4µg/mL a 16µg/mL, sendo observado um perfil de resistência em 100% dos isolados.

Aarestrup e Hasman (2004), ao avaliarem a suscetibilidade de diferentes isolados bacterianos frente a sanitizantes de uso comum em processos de desinfecção, observaram em isolados de *S. aureus*provenientes de bovinos uma CIM variando de 1 µg/mL a 8 µg/mL para o cloreto de benzalcônio, e de 0,5 µg/mL a 2 µg/mL para a clorexidina. Nossos resultados assemelham-se aos observados pelos referidos autores para o cloreto de benzalcônio, porém são bastante superiores com relação à clorexidina. Da mesma forma, Ho et al. (2012), avaliando isolados clínicos de *S. aureus,* observaram a CIM de clorexidina variando de 0,5 µg/mL a 4 µg/mL, e McDanel et al. (2013) verificaram, para 100% dos isolados de *S. aureus* provenientes de amostras nasais de residentes em casas de repouso, uma CIM ≤ 4 µg/mL deste sanitizante. Segundo Bridier et al. (2011), a eficácia desses sanitizantes está relacionada à ação sobre a parede celular ou membrana externa, membrana citoplasmática, proteínas funcionais e estruturais, DNA, RNA e outras proteínas citosólicas.

Não foi verificada a presença dos genes *qacA* e *smr* nos isolados testados,enquanto que o gene *mepA* foi identificado em 22,2% dos isolados (SASF-9, SASF-13, SASF-16 e SASF-17). Segundo Batra et al. (2010), a presença de genes *qac* é associada a maiores CIM de clorexidina, indo de encontro aos resultados deste estudo, onde altos valores de CIM foram observados para este sanitizante mesmo na ausência do gene *qacA* nos isolados de *S. aureus* avaliados. Ho et al. (2012) verificaram a presença do gene *qacA* em 28,2% (44/156) dos isolados clínicos de *S. aureus* avaliados, enquanto que 17,3% (27/156) eram portadores do gene *smr*. McDanel et al. (2013) observaram uma baixa incidência (0,6%) de *S. aureus* isolados de bovinos portando o gene *qacA*. Liu et al. (2015), avaliando a distribuição de genes de resistência a sanitizantes em isolados clínicos de *S. aureus* na China, verificaram a presença dos genes *mepA, qacA* e *smr* em 90,6%, 83% e 77,4% dos isolados, respectivamente.

Cepas de *S. aureus* são reconhecidamente resistentes à antibioticoterapia em função de sua capacidade de produzir uma barreira exopolissacarídica viscosa, localizada em microabscessos, o que dificulta a fagocitose e aumenta a adesão aos tecidos do hospedeiro, limitando a ação de drogas (GÜNDOGAN et al., 2006).

Um perfil de multirresistência antimicrobiana foi observado nos isolados de *S. aureus*deste estudo, onde 100% dos isolados apresentaram resistência a pelo menos três antimicrobianos. Albuquerque et al. (2007) verificaram um perfil de

multirresistência em 44,4% dos isolados de *S. aureus* provenientes de manipuladores de pescado. Pesavento et al. (2007) isolaram *S. aureus* de amostras de carne bovina, suína e de aves *in natura*, identificando multirresistência antimicrobiana em 31% (13/42) dos isolados. Waters et al. (2011) também identificaram perfis de multirresistência antimicrobiana em isolados de *S. aureus* provenientes de amostras de carne de peru (79%; 22/28), suína (64%; 7/11), bovina (35%; 6/17) e de frango (26%; 6/23).

Os resultados observados no presente estudo se assemelham aos obtidos por Obdait et al. (2015) para alguns dos antimicrobianos testados. Estes autores verificaram 86,5% (135/156) dos isolados de *S. aureus* com resistência à penicilina e apenas 5,8% (9/156) e 3,8% (6/156) com resistência à ciprofloxacina e gentamicina, respectivamente, perfis que vão ao encontro dos observados neste estudo. Apesar disso, apenas 1,3% (2/156) dos isolados foram resistentes à trimetoprima-sulfametoxazol, 36,5% (57/156) à tetraciclina e 30,1% (47/156) à eritromicina, diferindo dos resultados verificados neste estudo, onde acima de 90% dos isolados de *S. aureus* apresentaram resistência a estes antimicrobianos.

No estudo de Vázquez-Sánchez et al. (2012), os isolados de *S. aureus* obtidos de diferentes produtos de pesca (n = 125) não apresentaram diferença em relação ao perfil de resistência a antimicrobianos, com exceção para tetraciclina, frente a qual foram identificadas tanto cepas resistentes como sensíveis. Todas as cepas foram resistentes à penicilina, cloranfenicol e ciprofloxacina, e sensíveis à clindamicina, eritromicina, gentamicina e trimetoprima-sulfametoxazol. Com exceção da penicilina e gentamicina, estes resultados diferem dos obtidos no presente estudo, onde 100% dos isolados foram resistentes à clindamicina e trimetoprima-sufametoxazol, 94,4% (17/18) à eritromicina, e 88,8% (16/18) foram sensíveis à ciprofloxacina.

Métodos genéticos são utilizados para confirmar a presença de genes específicos que conferem resistência antimicrobiana. Apesar disso, o perfil fenotípico de resistência também deve ser levado em consideração. Neste estudo, foram avaliados 15 genes que codificam resistência a diferentes classes de antimicrobianos (*tetA*, *tetB*, *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO*, *Tn916-1545*, *blaZ*, *mecA*, *ereB*, *ermB*, *ermC*, *sul1*, *sul2* e *drfG*). Observou-se que, embora 100% dos isolados de *S. aureus* tenham apresentado um perfil fenotípico de resistência à penicilina, apenas 44,4% (8/18) carreavam o gene *blaZ,* enquanto o gene *mecA*não foi verificado nos

isolados testados. Da mesma maneira, resistência à trimetoprima-sulfametoxazol foi verificada em 100% dos isolados, porém não foi verificada a presença dos genes *sul1*, *sul2* e *drfG*nos mesmos isolados. Resistência fenotípica à eritromicina foi observada em 94,4% (17/18) dos isolados, enquanto que o gene *ereB*, um dos que codifica resistência a este antimicrobiano, foi encontrado apenas em 66,6% (12/18) destes. O isolado SASF-9, que carreava o gene *ereB*, não apresentou perfil fenotípico de resistência à eritromicina. Com exceção dos isolados SASF-5 e SASF-9, a presença de pelo menos um dos genes de resistência à tetraciclina (*tetB*, *tetL*, *tetM*, *Tn916-1545*) foi verificada em 88,8% (16/18) dos isolados de *S. aureus*.

Diferenças entre os perfis fenotípicos e genotípicos de resistência antimicrobiana foram observadas para alguns dos isolados estudados, o que permite inferir, segundo Haubert et al. (2015), que outros mecanismos contribuam para os fenótipos de resistência ou que outros genes possam estar envolvidos na aquisição de resistência antimicrobiana.

## 4.5 Conclusão

Os isolados de *S. aureus* provenientes do processamento de pescado salgado apresentaram multirresistência a sanitizantes e antimicrobianos de diferentes classes, comumente utilizados na clínica médica e na indústria de alimentos.

## Referências

AARESTRUP, F. M.; HASMAN, H. Susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substances used for disinfection. **Veterinary Microbiology**, v. 100, p. 83-89, 2004.

ALBUQUERQUE, W. F.; MACRAE, A.; SOUSA, O. V.; VIEIRA, G. H. F.; VIEIRA, R. H. S. F. Multidrug resistant Staphylococcus aureus strains isolated from a fish market and from fish handlers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p.131-134, 2007.

AMIN, U. S.; LASH, T. D.; WILKINSON, B. J. Proline betaine is a highly effective osmoprotectant for Staphylococcus aureus. **Archives of Microbiology**, v. 163, n. 2, p. 138-142, 1995.

BARON, F.; COCHET, M.-F.; PELLERIN, J.; BEN ZAKOUR, N.; LEBON, A.; NAVARRO, A.; PROUDY, I.; LE LOIR, Y.; GAUTIER, M. Development of a PCR test

to differentiate between Staphylococcus aureus and Staphylococcus intermedius. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 2302-2305, 2004.

BASTI, A. A.; MISAGHI, A.; SALEHI, T. Z.; KAMKAR, A. Bacterial pathogens in fresh, smoked and salted Iranian fish. **Food Control**, v. 17, p. 183-188, 2006.

BATRA, R.; COOPER, B. S.; WHITELY, C.; PATEL, A. K.; WYNCOLL, D.; EDGEWORTH, J. D. Efficacy and limitation of a chlorhexidine-based decolonization strategy in preventing transmission of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in an intensive care unit. **Clinical Infection Diseases**, v. 50, p. 210–217, 2010.

BERTSCH, D.; URUTY, A.; ANDEREGG, J.; LACROIX, C.; PERRETEN, V.; MEILE, L. Tn6198, a novel transposon containing the trimethoprim resistance gene dfrG embedded into a Tn916 element in Listeria monocytogenes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, p. 986-991, 2013.

BORE, E.; LANGSRUD, S.; LANGSRUD, Ø.; RODE, T. M.; HOLCK, A. Acid-shock responses in Staphylococcus aureus investigated by global expression analysis. **Microbiology**, v. 153, p. 2289-2303, 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução n° 12, de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b> Acesso em: 10 abr. 2017.

BRASIL. Governo do Brasil. **Produção de peixes no Brasil cresce com o apoio de pesquisas da Embrapa**. 2017.Disponível em:<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2017/01/producao-de-peixes-no-brasil-cresce-com-apoio-de-pesquisas-da-embrapa> Acesso em: 10 set. 2018.

BRIDIER, A.; BRIANDET, R.; THOMAS, V.; DUBOIS-BRISSONNET, F. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. **Biofouling**, v. 27, n. 9, p. 1017-1032, 2011.

BUFFET-BATAILLON, S.; TATTEVIN, P.; BONNAURE-MALLET, M.; JOLIVET-GOUGEON, A. Emergence of resistance to antibacterial agents: the role of quaternary ammonium compounds – a critical review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, p. 381-389, 2012.

CLSI. Clinical Laboratory Standards Institute. M100-S25. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twentieth informational supplement**. 2015. Disponível em: <http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/m100S25_sample.pdf.> Acesso em: 6 set. 2018.

DALGAARD, P.; MADSEN, H. L.; SAMIEIAN, N.; EMBORG, J. Biogenic amine formation and microbial spoilage in chilled garfish (Belone belone belone) – effect of modified atmosphere packaging and previous frozen storage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 80-95, 2006.

DEVRIESE, L. A. Baird-Parker medium supplemented with acriflavine, polymyxins and sulphonamide for the selective isolation of Staphylococcus aureus from heavily contaminated materials.**Journal of Applied Bacteriology**, v. 50, p. 351-357, 1981.

EMBORG, J.; LAURSEN, B. G.; RATHJEN, T.; DALGAARD, P. Microbial spoilage and formation of biogenic amines in fresh and thawed modified atmosphere-packed salmon (Salmo salar) at 2°C. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 790-799, 2002.

FELDHUSEN, F. The role of seafood in bacterial foodborne diseases.**Microbes and Infection**, v. 2, p. 1651-1660, 2000.

FRECH, G.; SCHWARTZ, S. Molecular analysis of tetracycline resistance in Salmonella enterica subsp. enterica serovars Typhimurium, Enteritidis, Dublin, Choleraesuis, Hadar and Saintpaul: Construction and application of specific gene probes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 633-641, 2000.

FURI, l.; CIUSA, M. L.; KNIGHT, D.; DI LORENZO, V.; TOCCI, N.; CIRASOLA, D., et al. Evaluation of reduced susceptibility to quaternary ammonium compounds and bisbiguanides in clinical isolates and laboratory-generated mutants of Staphylococcus aureus.**Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 8, p. 3488-3497, 2013.

GRAPE, M.; SUNDSTRÖM, L.; KRONVALL, G. Sulphonamide resistance gene sul3 found in Escherichia coli isolates from human sources. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 1022-1024, 2003.

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

HASSANZADEH, S.; MASHHADI, R.; YOUSEFI, M.; ASKARI, E.; SANIEI, M.; POURMAND, M.R. Frequency of efflux pump genes mediating ciprofloxacin and antiseptic resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates. **Microbial Pathogenesis**, v. 111, p. 71-74, 2017.

HAUBERT, L.; MENDONÇA, M.; LOPES, G. V.; CARDOSO, M. R. de; SILVA, W. P. da. Listeria monocytogenes isolates from food and food environment harbouring tetM and ermB resistance genes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 62, p. 23-29, 2015.

HO, C.-M.; LI, C.-Y.; HO, M.-H.; LIN, C.-Y.; LIU, S.-H.; LU, J.-J. High rate of qacA- and qacB positive methicilinn-resistant Staphylococcus aureus isolates from chlorhexidine-impregnated catheter-related bloodstream infections. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v. 56, n. 1, p. 5693-5697, 2012.

KAATZ, G. W.; FIONNUALA, M. A.; SUSAN, M. S. Multidrug Resistance in Staphylococcus aureus Due to Overexpression of a Novel Multidrug and Toxin - Extrusion (MATE) Transport Protein. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1857-1864, 2005.

KERRN, M. B.; KLEMMENSEN, T.; ESPERSEN, F. Susceptibility of Danish Escherichia coli strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia , and distribution of sul genes conferring sulphonamide resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 513-516, 2002.

JENSEN, L. B.; FRIMODT-MÖLLER, N.; AARESTRUP, F. M. Presence of erm gene classes in Gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. **FEMS Microbiology Letters**, v. 31, p. 60-158, 1999.

LEELAPORN, A.; PAULSEN, I. T.; TENNENT, J. M.; LITTLEJOHN, T. G.; SKURRAY, R. A. Multidrug resistance to antiseptics and disinfectants in coagulase-negative staphylococci. **Journal of Medical Microbiology**, v. 40, p. 214–220, 1994.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. Staphylococcus aureus and food poisoning (Review). **Genetic and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.

LI, Q.; SHERWOOD, J. S.; LOGUE, C. M. Antimicrobial resistance of Listeria spp. recovered from processed bison. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p. 86-91, 2007.

LIU, Q.; ZHAO, H.; HAN, L.; SHU, W.; WU, Q.; NI, Y. Frequency of biocide-resistant genes and susceptibility to chlorhexidine in high-level mupirocin-resistant, methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MuH MRSA). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 82, n. 4, p. 278–283, 2015.

MARTINEAU, F.; PICARD, F. J.; GRENIER, L.; ROY, P. H.; OUELLETTE, M.; TRIAL, E.; BERGERON, M. G. Multiplex PCR assays for the detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from patients infected after cardiac surgery. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, p. 527-533, 2000.

MATTEWS, K. R.; ROBERSON, J.; GILLESPIE, B. E.; LUTHER, D. A.; OLIVER, S.P., MATTEWS, K. R. R. J. Identification and Differentiation of Coagulase-Negative Staphylococcus aureus by Polymerase Chain Reaction. **Journal of Food Protection**, v. 60, p. 686-688, 1997.

McDANEL, J. S.; COURTNEY, R. M.; DIEKEMA, D. J.; QUAN, V.; KIM, D. S.; PETERSON, E. M.; EVANS, K. D.; TAN, G. L.; HAYDEN, M. K.; HUANG, S. S. Chlorhexidine and Mupirocin Susceptibilities of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus from Colonized Nursing Home Residents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 552-558,2013.

McDONNELL, G.; RUSSEL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 147-179, 1999.

MEJLHOLM, O.; KJELDGAARD, J.; MODBERG, A.; VEST, M. B.; BOKNAES, N.; KOORT, J.; BJÖRKROTH, J.; DALGAARD, P. Microbial changes and growth of Listeria monocytogenes during chilled storage of brined shrimp (Pandalus borealis). **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, p. 250-259, 2008.

MEREGHETTI, L.; QUENTIN, R.; MEE, N. M.; DER AUDURIER, A. Low Sensitivity of Listeria monocytogenes to Quaternary Ammonium Compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5083–5086, 2000.

MILSTONE, A. M.; PASSARETTI, C. L.; PERL, T. M. Chlorhexidine: expanding the armamentarium for infection control and prevention. **Clinical Infection Disease**, v. 46, p. 274–281, 2008.

MITCHELL, B. A.; BROWN, M. H.; SKURRAY, R. A. QacA multidrug efflux pump from Staphylococcus aureus: comparative analysis of resistance to diamidines, biguanidines, and guanylhydrazones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 475-477, 1998.

NAKIPOGLU, Y.; IGNAK, S.; GÜRLER, N.; GÜRLER, B. The prevalence of antiseptic resistance genes (qaca/b and smr) and antibiotic resistance in clinical Staphylococcus aureus strains. **Mikrobiyoloji bülteni**, v. 46, n. 2, p. 180-189, 2012.

NORMANNO, G.; SALANDRA, G. La; DAMBROSIO, A.; QUAGLIA, N. C.; CORRENTE, M.; PARISI, A.; SANTAGADA, G.; FIRINU, A.; CRISETTI, E.; CELANO, G. V. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic Staphylococcus aureus isolated from meat and dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 290-296, 2007.

OBDAIT, M. M.; SALMAN, A. E. B.; LAFI, S. Q.; Prevalence of Staphylococcus aureus in imported fish and correlations between antibiotic resistance and enterotoxigenicity. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 11, p.1999-2005, 2015.

PANG, Y.; BOSCH, T.; ROBERTS, M. C. Single polimerase chain reaction for the detection of tetracycline-resistant determinants Tet K and Tet L. **Molecular and Cellular Probes**, v. 8, p. 417-422, 1994.

PEDRO, S.; ALBUQUERQUE, M. M.; NUNES, M. L.; BERNARDO, M. F. Pathogenic bacteria and indicators in salted cod (Gadus morhua) and desalted products at low and high temperatures.**Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 13, n. 3, p. 39-48, 2004.

PESAVENTO, G.; DUCCI, B.; COMODO, N.; LO NOSTRO, A. Antimicrobial resistance profile of Staphylococcus aureus isolated from raw meat: A research of methicillin resistant S. aureus (MRSA). **Food Control**, v. 18, p. 196-200, 2007.

PUAH, S. M.; CHUA, K. H.; TAN, J. A.. M. A. Virulence factors and antibiotic susceptibility of Staphylococcus aureus isolates in ready-to-eat foods: Detection of S. aureus contamination and a high prevalence of virulence genes. **International Journal of Environmental Research and Public Health**. v. 13, p. 199, 2016.

RODE, T. M; LANGSRUD, S.; HOLCK, A.; MORETRO, T. Different patterns of biofilm formation in Staphylococcus aureus under food-related stress conditions.**International Journal of Food Microbiology**, v. 116, p. 372-383, 2007.

SHAMSUDIN, M. N.; ALRESHIDI, M. A.; HAMAT, R. A.; ALSHARI, A. S.; ATSHAN, S. S.; NEELA, V. High prevalence of qaca/b carriage among clinical isolates of meticillin-resistant Staphylococcus aureus in malaysia. **Journal of Hospital Infection**, v. 81, n. 3, p. 206-208, 2012.

SHELDON JR, A. T. Antiseptic “resistance”: real or perceived threat? **Clinical Infection Disease**, v. 40, p. 1650-1656, 2005.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. de A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. São Paulo: Livraria Varela, 2010. 4ed.

SIMON, S. S.; SANJEEV, S. Prevalence of enterotoxigenic Staphylococcus aureus in fishery products and fish processing factory workers. **Food Control**, n. 18, p. 1565-1568, 2007.

STROMMENGER, B.; KETTLITZ, C.; WERNER, G. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in Staphylococcus aureus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4089-4094, 2003.

SUTCLIFFE, J.; GREBE, T.; TAIT-KAMRADT, A.; WONDRACK, L. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 2562-2566, 1996.

TAHERI, N.; ARDEBILI, A.; AMOUZANDEH-NOBAVEH, A.; GHAZNAVI-RAD, E. Frequency of antiseptic resistance among Staphylococcus aureus and coagulase-negative Staphylococcu isolated from a University Hospital in Central Iran. **Oman Medical Journal**, v. 31, n. 6, p. 426-432, 2016.

TIMSIT, J. F.; SCHWEBEL, C.; BOUADMA, L.; GEFFROY, A.; GARROUSTE-ORGEAS, M.; PEASE, S.; HERAULT, M. C.; HAOUACHE, H.; CALVINO-GUNTHER, S.; GESTIN, B.; ARMAND-LEFEVRE, L.; LEFLON, V.; CHAPLAIN, C.; BENALI, A.; FRANCAIS, A.; ADRIE, C.; ZAHAR, J. R.; THUONG, M.; ARRAULT, X.; CROIZE, J.; LUCET, J. C. Chlorhexidine impregnated sponges and less frequent dressing changes for prevention of catheter-related infections in criticallyill patients: a randomized controlled trial. **Journal of the American Medical Association**, v. 301, p. 1231-1241, 2009.

UEDA, S.; KUWABARA, Y. Susceptibility of biofilm Escherichia coli, Salmonella Enteritidis and Staphylococcus aureus to detergents and sanitizers.**Biocontrol Science**, v. 12, n. 4, p. 149-153, 2007.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; LÓPEZ-CABO, M.; SAÁ-IBUSQUIZA, P.; RODRÍGUEZ-HERRERA, J. J. Incidence and characterization of Staphylococcus aureus in fishery products marketed in Galicia (Northwest Spain). **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, p. 286-296, 2012.

VISHWANATH, W.; LILABATI, H.; BIJEN, M. Biochemical, nutritional and microbiological quality of fresh and smoked mud eel fish Monopterus albus – a comparative study. **Food Chemistry**, v. 61, n. 1/2, p. 153-156, 1998.

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 Disease**, v. 52, n. 10, p. 1227-1230, 2011.

YE, J. Z.; YU, X.; LI, X. S.; SUN, Y.; LI, M. M.; ZHANG, W. et al. Antimicrobial resistance characteristics of and disinfectant resistant gene distribution in Staphylococcus aureus isolates from male urogenital tract infection. **Zhonghua nan Ke Xue**, v. 20, n. 7, p. 630-636, 2014.

## 5 Artigo 2:

**Influência da concentração de NaCl sobre a produção de enterotoxinas e biofilmes por*Staphylococcus aureus* isolados de pescado salgado**

### 5.1 Introdução

No Brasil, o crescente interesse dos consumidores com relação a aspectos nutricionais e de qualidade dos alimentos tem contribuído para o aumento do consumo de pescado e seus derivados (GHANBARI et al., 2013). Apesar disso, este grupo de alimentos já foi associado a surtos de doenças veiculadas por alimentos (DVA) (HUSS, 1997; DAVIES et al., 2001).

A salga é uma das técnicas mais antigas, utilizadas em todo o mundo, para prolongar a vida útil de pescados e garantir a sua segurança microbiológica, atuando diretamente sobre o crescimento de micro-organismos através da redução da atividade de água (THORARINSDOTTIR et al., 2004; KÖSE, 2010; GHANBARI et al., 2013).

*Staphylococcus aureus* é um micro-organismo que tolera concentrações de até 15% de NaCl (CLEMENDS; FOSTER, 1999; KURODA et al., 2008; BUNNIA, 2008), alterando algumas características fisiológicas na presença desse composto (RODE et al., 2007). Este patógeno coloniza a pele e as membranas mucosas de humanos, sendo considerado uma fonte de contaminação dos alimentos durante a sua manipulação e processamento (LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003). Por ser pouco competitivo e possuir uma ampla gama de parâmetros de crescimento, *S. aureus* é de grande importância em alimentos onde a microbiota normal já foi destruída ou inibida, como em pescados salgados (VISHWANATH; LILLABATI; BIJEN, 1998; BORE et al., 2007; RODE et al., 2007).

As intoxicações alimentares estafilocócicas resultam da ingestão de alimentos contendo enterotoxinas (EE) pré-formadas por *S. aureus* enterotoxigênicos. Doses inferiores a 1 µg de EE podem causar os sintomas da doença, em um indivíduo adulto saudável, dentro de 1 a 6 horas após o consumo de alimentos contaminados

(BERGDOLL, 1989; LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003). A patogênese da intoxicação depende de condições favoráveis à sobrevivência e multiplicação de *S. aureus* em determinado alimento, até que sua concentração possibilite a produção das enterotoxinas (>$10^5$ UFC.$g^{-1}$) (BATHIA; ZAHOOR, 2007; HENNEKINE; DE BUYSER; DRAGACCI, 2012).

A capacidade de *S. aureus* de aderir à superfícies e produzir biofilmes aumenta a sua sobrevivência em plantas de processamento de alimentos, sendo considerada parte do ciclo normal de vida deste patógeno no ambiente (OTTO, 2008). Células bacterianas embutidas na matriz de biofilme expressam fenótipos diferentes de suas contrapartes planctônicas. Assim, essa estrutura protege a comunidade bacteriana de tensões ambientais, do sistema imunológico do hospedeiro e da ação de antimicrobianos (COSTERTON et al., 1987). Segundo Rode et al. (2007), a formação de biofilmes é um processo dinâmico, onde diferentes genes e mecanismos estão envolvidos na sua fixação e maturação. A expressão do operon *ica* tem sido considerada importante para a produção de biofilmes por *S. aureus* sob diferentes condições ambientais (HEILMANN et al., 1996; GERKE et al., 1998; VALLE et al., 2003). Além disso, condições sub-ótimas de crescimento parecem aumentar a produção de biofilme por *S. aureus* (RODE et al., 2007).

Com base no que foi exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da tolerância ao sal sobre a produção de enterotoxinas e biofilmes por isolados de *S. aureus* provenientes de pescado salgado.

## 5.2 Materiais e métodos

Foram utilizados 18 isolados de *Staphylococcus aureus* obtidos a partir de amostras de pescados salgados provenientes de uma fábrica de conservas de pescado, localizada na região Sul do Rio Grande do Sul, Brasil. Os isolados foram denominados pela sigla SASF, seguido pela numeração 1 a 18. Culturas estoque foram mantidas em glicerol 20% a -20°C e cultivadas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI, Acumedia®) ou Tripticase de Soja (TSB, Kasvi®) por 16-18h a 37°C antes dos experimentos.

As análises foram realizadas no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Laboratório de Virologia, todos pertencentes à Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

### 5.2.1 Confirmação fenotípica de *S. aureus*

A confirmação fenotípica dos isolados foi realizada através do teste de resistência dos isolados bacterianos à acriflavina, utilizando ágar Baird Parker (ABP, Acumedia®) suplementado com acriflavina (7µg.mL$^{-1}$ - Sigma Aldrich®). Os isolados foram repicados em caldo BHIe incubados a 37°C por 24h. Um inóculo de cada isolado foi semeado em placas contendo ABP acrescido de acriflavina, que foram incubadas a 37°C por 48h. O resultado típico consistiu no aparecimento de dois halos em torno das colônias. Esse teste foi realizado uma vez que, dentre todas as espécies de Estafilococos Coagulase Positiva, apenas *S. aureus* é resistente à acriflavina (DEVRIESE, 1981).

### 5.2.2 Confirmação molecular dos isolados

2.2.1 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de acordo com protocolo recomendado por Matthews et al. (1997), com modificações. Uma cultura do isolado em ágar tripticase de soja (TSA, Acumedia®) foi transferida para 100µL de solução TE-A (10mM hidroximetil aminoetano - TRIS e 5 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA) até turbidez 1,0 da escala de MacFarland. A lise do peptideoglicano celular ocorreu pela adição de 100 µL de lisostafina (100µg/mL, Sigma Aldrich®) e incubação a 37°C por 45 minutos, seguido pela adição de 20 µL de solução TE-B (50mM hidroximetil aminoetano - TRIS e 20 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA) contendo 20% de SDS (Dodecil sulfato de sódio, Invitrogen®)e 3 µL de proteinase K (Invitrogen®), e incubação a 37°C por uma hora. Em seguida, foram adicionados 200µL de solução NaCl 5M (Cloreto de Sódio, Synth®) e agitou-se, suavemente, por 15 segundos, seguido de centrifugação (10.000 x*g*, 4ºC por 15 min). O sobrenadante foi transferido para um tubo estéril e extraído com fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1, Synth®) por centrifugação (16.000 x *g*, 4ºC, 15 min). O DNA foi precipitado com dois volumes de etanol frio a 95% e manutenção *overnight* (-20°C). Após centrifugação (16.000 x *g*, 4°C, 10 min), o *pellet* foi lavado duas vezes com etanol (70%), seco durante 30 minutos e suspenso em 30 µL de água ultrapura. Em seguida, 2 µL de RNAse (10 mg/mL, Invitrogen®) foi adicionado e a mistura foi incubada a 37°C durante uma hora. O DNA foi mantido a -20°C e quantificado por espectrofotometria em Eppendorf BioSpectrometer kinetic® (Eppendorf).

5.2.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os isolados foram confirmados como *S. aureus* através de PCR, tendo como alvo o gene 16S do rRNA para a identificação do gênero, e o gene *nuc*, que codifica a termonuclease, para a determinação da espécie. Os *primers* utilizados, o tamanho esperado dos fragmentos e o protocolo utilizado estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – *Primers*, tamanho esperado dos produtos de amplificação (pb) e programas utilizados para a identificação dos genes 16S rRNA, *nuc* e de virulência nos isolados de *S. aureus* avaliados neste estudo.

| *Primer* | Sequência 5'-3' | Pb | Programa | Referência |
|---|---|---|---|---|
| 16S1<br>16S2 | GGACGGGTGAGTAACACGTGG<br>TCCCGTAGGAGTCTGGACCGT | 252 | P1 | Baron et al. (2004) |
| NUC1<br>NUC2 | ATGAAGTCAAATAAATCGCT<br>TTTGGTGAAAAATACTTCTC | 458 | P1 | Baron et al. (2004) |
| EEA1<br>EEA2 | ACGATCAATTTTTACAGC<br>TGCATGTTTTCAGAGTTAATC | 544 | P2 | Rosec and Gigaud (2002) |
| EEB1<br>EEB2 | ATTCTATTAAGGACACTAAGTTAGGGGA<br>ATCCCGTTTCATAAGGCGAGT | 404 | P2 | Jarraud et al. (2002) |
| EEC1<br>EEC2 | GACATAAAAGCTAGGAATTT<br>AAATCGGATTAACATTATCCA | 257 | P3 | Rosec and Gigaud (2002) |
| EED1<br>EED2 | CAAATATATTGATATAATGA<br>AGTAAAAAAGAGTAATGCAA | 330 | P2 | Zocche et al. (2009) |
| EEE1<br>EEE2 | CAAAGAAATGCTTTAAGCAATCTTAGGC<br>CACCTTACCGCCAAAGCTG | 482 | P2 | Jarraud et al. (2002) |
| *ica*A1<br>*ica*A2 | CCTAACTAACGAAAGGTAG<br>AAGATATAGCGATAAGTGC | 1315 | P4 | Vasudevan et al. (2003) |
| *ica*D1<br>*ica*D2 | AAACGTAAGAGAGGTGG<br>GGCAATATGATCAAGATAC | 381 | P4 | |

**P1** = 4 min a 95°C, 2 min a 95°C, 2 min a 52,7°C, 2 min a 72°C por 32 ciclos. **P2** = 5 min a 95°C, 1 min a 95°C, 1 min a 44,5°C, 1 min a 72°C, 10 min a 72°C por 37 ciclos. **P3** = 5 min a 95°C, 45 s a 95°C, 45 s a 46,2°C, 45 s a 72°C por 35 ciclos; **P4** = 45 s a 92°C, 45 s a 49°C, 1 min a 72°C por 30 ciclos.

As amostras foram submetidas à técnica de PCR em termociclador MJ Research PTC 100. Para cada reação, foram adicionados 12,5 µL de GoTaq® GreenMaster Mix 2X (Promega Corp.), 1 pmol de cada *primer* para o gene 16S rRNA e 10 pmol para o gene da termonuclease, 2 µL de DNA (50 ng), e água ultrapura (Promega Corp.) até um volume final de 25 µL. As reações foram realizadas com as seguintes condições: 95°C por 4 min, 95°C por 2min, 52,7°C por 2 min, seguido por

32 ciclos de 72°C por 2 min (BARON et al., 2004). Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão TBE 0,5x (solução de Tris, ácido bórico e EDTA)a 80V por 70 min, utilizando um marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen®). O produto amplificado foi visualizado sob luz UV em transiluminador(Loccus®,L-Pix Touch).

As cepas utilizadas como controle positivo da reação, controle negativo para a identificação da espécie bacteriana e controle negativo para a identificação de gênero são mostradas na Tabela 2.

Tabela 2 – Caracterização de espécies de cepas e isolados utilizados neste estudo.

| Espécies | Cepas | Aplicação |
|---|---|---|
| *S. aureus* | ATCC 25923 | CP: PCR (nuc1, 2), genes *icaA* e *icaD*, testes de produção de biofilme |
| *S. xylosus* | ATCC 29971 | CN: PCR (espécies bacterianas) |
| *S. sciuri* | ATCC 29061 | CN: PCR (espécies bacterianas) |
| *S. lugdunensis* | ATCC 49576 | CN: PCR (espécies bacterianas) |
| *S. epidermidis* | ATCC 12228 | CN: PCR (espécies bacterianas) |
| *S. haemolyticus* | ATCC 29970 | CN: PCR (espécies bacterianas) |
| *S. capitis* | ATCC 35661 | CN: PCR (espécies bacterianas) |
| *S. saprophyticus* | ATCC 15305 | CN: PCR (espécies bacterianas) |
| *Escherichia coli* | ATCC 11229 | CN: PCR (gênero) |
| *S. aureus* | FRI S6 | CP: genes *eea* e *eeb* |
| *S. aureus* | ATCC 19095 | CP: gene *eec* |
| *S. aureus* | FRI 361 | CP: gene *eed* |
| *S. aureus* | FRI 326 | CP: gene *eee* |

CP: Controle Positivo; CN: Controle negativo; ATCC: *American Type Culture Collection*; FRI: *Food Research Institute*.

### 5.2.3 Detecção de genes *icaA*, *icaD* e de enterotoxinas clássicas

A avaliação da presença dos genes *icaA* e *icaD* foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Vasudevan et al. (2003), com adaptações (Tabela 1). Para cada reação foram utilizados 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix 2X (Promega Corp.), 1µL de cada *primer* (10 pmol), 2 µL de DNA (50 ng) e água ultrapura (Promega Corp.) até um volume final de 25 µL.

Para a identificação de genes que codificam para enterotoxinas estafilocócicas clássicas (*eea*, *eeb*, *eec*, *eed* e *eee*), foram utilizados *primers* e protocolos específicos, conforme demonstrado na Tabela 1.

Os controles positivos e negativos utilizados nas reações dos genes *icaA*, *icaD* e de enterotoxinas clássicas são mostrados na Tabela 2.

### 5.2.4 Capacidade de produção de biofilme

O ensaio foi realizado em aço inoxidável e poliestireno por serem materiais comumente utilizados no setor de alimentos.

#### 5.2.4.1 Poliestireno

A capacidade de produção de biofilme por *S. aureus*foi avaliada sob diferentes temperaturas (25°C e 37°C) e duas condições de cultivo (caldo TSB puro e caldo TSB acrescido de 10% de NaCl). Além disso, avaliou-se a combinação das condições de cultivo com a indução da formação do biofilme em TSB puro e TSB acrescido de 10, 20 e 30% de NaCl em microplacas de 96 cavidades. Como controle negativo dos experimentos, utilizou-se caldo TSB puro, e como controle positivo,*S. aureus* ATCC 25923 (Tabela 2).

Foram distribuídos, uniformemente, 200µL de caldo TSB(puro ou acrescidode 10, 20 ou 30% de NaCl) em microplacas de 96 cavidades. Os cultivos bacterianos foram ajustados para valor 1,0 de densidade óptica ($DO_{600}$), diluídos (1:25) e semeados (8µL) em cada cavidade da placa, a qual recebeu uma tampa onde o biofilme se forma, no caso de produção. As placas foram incubadas a 25°C ou 37°C por 48h. Transcorrido este período, as tampas das placas foram lavadas com solução salina tamponada de fosfato (Phosfat e Buffered Saline – PBS) e coradas com cristal violeta (isopropanol, metanol e PBS, v/v: 1:1:18) por 30 minutos. Após, foram lavadas com água destilada estéril, secas à temperatura ambiente por 30min e colocadas em ácido acético a 30%.Esta última etapa foi realizada para que o biofilme formado na tampa se solte e fique no meio. Removidas as tampas, foi realizada a leitura da densidade óptica em umleitor de microplacas ELISA plate analyser (Robonick®, readwell PLATE), utilizando comprimentos de onda de 600 nm e 570 nm, conforme recomendado por Steenackers et al. (2011), com algumas modificações.Os valores da densidade óptica foram tomados como a média das leituras. As cepas foram classificadas segundo a aderência na tampa da placa e divididas em quatro categorias, de acordo com Stepanovic et al. (2007).

#### 5.2.4.2 Aço inoxidável

Corpos de prova de aço inoxidável (AISI 316) de tamanho 7 cm x 2 cm x 0,1 cm foram imersos em uma solução contendo detergente neutro por 1h. Após, foram lavados manualmente com uma esponja, enxaguados em água corrente e em água destilada, pulverizados com álcool 70°, secos em estufa a 60°C e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 min.

Os isolados testados foram cultivados em TSB puro e TSB acrescido de 10% de NaCl, seguido de incubação por 24 horas a 25ºC e 37ºC. Os cultivos bacterianos foram ajustados para valor 1,0 de densidade óptica ($DO_{600}$). Após, 1 mL de cadacultivo foi transferido, separadamente, para falcons contendo 40 mL de solução salina 0,85%, nos quais foram imersos os corpos de prova, seguido de incubação a 25°C e 37°C por 24h. Para a remoção de células fracamente aderidas, os corpos de prova foram lavados com 1 mL de água destilada esterilizada. Em seguida, swabs umedecidos foram friccionados sobre os dois lados de cada corpo de prova, imersos em solução salina 0,85%, homogeneizados em vórtex, e realizou-se diluições decimais seriadas. Alíquotas de 0,1 mL foram semeadas, em duplicata, sobre placas de Petri contendo ágar padrão para contagem (PCA, Acumedia®), as quais foram incubadas a 37°C por 24 h para a contagem de células viáveis ($UFC.cm^{-2}$) (ROSSONI; GAYLARDE, 2000). A formação de biofilme foi considerada quando o número de células aderidas à superfície variou entre $10^3$ $UFC.cm^{-2}$ e $10^5$ $UFC.cm^{-2}$ (WIRTANEN; HUSMARK; MATTILA-SANDHOLM, 1996).

### 5.2.5 Eficiência de sanitizantes na remoção de biofilmes em aço inoxidável

Cloro orgânico (Rioquímica®), quaternário de amônio (Delaware®) e ácido peracético (Rioquímica®) na concentração de 200 partes por milhão (200 ppm), foram testados quanto à eficiência na remoção de biofilmes de *S. aureus* em aço inoxidável. A indução à formação de biofilme nos corpos de prova de aço inoxidável se deu da mesma forma como descrito no item 2.4.2. Após a última lavagem, os corpos de prova foram imersos, separadamente, em frascos contendo os sanitizantes por um período de 10 min, seguido do contato com uma solução de Tween 2% por 3 s. Em seguida, após a fricção de swabs umedecidos sobre os dois lados de cada corpo de prova, foram realizadas diluições decimais seriadas e semeadura, em duplicata, em PCA a 37°C por 24h para a contagem de células viáveis ($UFC.cm^{-2}$). Como controle, um corpo de prova do material com biofilme foi imerso em solução salina 0,85%, sem contato com os sanitizantes (ROSSONI;

GAYLARDE, 2000). A remoção de biofilme nos corpos de prova de aço inoxidável foi considerada quando as contagens indicaram número menor ou igual a $10^2$ UFC.cm$^{-2}$ (APHA, 2001).

### 5.2.6 Tolerância ao sal

Os isolados foram cultivados, inicialmente, em condições ótimas de crescimento (BHI a 37°C por 24h), sendo realizadas diluições decimais seriadas e plaqueamento na superfície de ágar PCA, seguidosde incubação a 37°C por 48h e determinação do número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC.mL$^{-1}$).Três novos repiques foram realizados para cada isolado em caldo BHI contendo diferentes concentrações de NaCl (10%, 20% e 30%), seguidos de incubação a 37°C por 48h e determinação do número de UFC.mL$^{-1}$(SILVA et al., 2010).

### 5.2.7 PCR em Tempo Real (qPCR)

O gene *eea*, envolvido na produção da enterotoxina A, foi estudado por PCR em tempo real para avaliar o efeito da adição de 10% de NaCl sobre a expressão gênica no isolado SASF-4. Para isso, o isolado SASF-4 e a cepa-padrão FRI-S6 foram cultivados em condições ideais de crescimento (caldo BHI puro por 24h a 37°C) e em meio de cultura acrescido de 10% de NaCl (caldo BHI + 10% NaCl por 24h a 37°C). Os cultivos foram centrifugados a 13000 RPM por 3 min e o sedimento foi ressuspenso em 500 µL de tampão Tris-EDTA contendo 10 µL de lisozima (50mg/mL - Sigma Aldrich®) e 10 µL de lisostafina (1mg/mL - Sigma Aldrich®). O RNA total foi extraído das células utilizando o reagente TRIzol (Ambion Inc.) de acordo com as instruções do fabricante, e o DNA residual foi removido utilizando DNase (Promega Corp.).

A avaliação por qPCR foi realizada em termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™), contendo 12,5 µL de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™), 2 µL do cDNA (diluído 5 vezes), 100 pMol.µL$^{-1}$ de primers forward e reverse, e água livre de nuclease em um volume total de 25 µL. As amostras foram colocadas, em duplicata, em placas com capacidade para 96 reações, e cobertas com adesivo óptico. Os parâmetros de temperatura para a qPCR foram: 50°C/2min; desnaturação inicial a 95ºC/10min, 40 ciclos de três etapas: desnaturação a 95ºC/15s; anelamento a 60ºC/1min e; extensão 72ºC/1min, a qual foi seguida pela curva padrão de dissociação, para verificar a especificidade dos

primers utilizados. A eficiência de cada par de primers foi calculada utilizando-se a curva padrão de diluição seriada, como descrito no protocolo da Applied Biosystems™. O nível de expressão gênica foi calculado baseado no *threshold cycle* (Ct), onde o gene *rpoB*foi utilizado como normalizador (padrão interno) e o gene*eea*, como calibrador. Calculou-se o ΔΔCT, o qual foi utilizado na equação de quantificação relativa para expressar os dados (YUAN et al., 2006):

QR=2-ΔΔCT, no qual QR (Quantificação Relativa) representa o nível de expressão gênica.

Os *primers* utilizados na qPCR estão descritos na tabela 3:

Tabela 3 – *Primers* e tamanho esperado dos produtos de amplificação utilizados para a quantificação da enterotoxina A por qPCR.

| *Primers* | Sequência 5'-3' | Produto de amplificação (pb) | Alvo | Referência |
|---|---|---|---|---|
| EEAR1<br>EEAR2 | AAAATACAGTACCTTTGGAAACGGTT<br>TTTCCTGTAAATAACGTCTTGCTTGA | 92 | *eea* | Klotz et al. (2003) |
| rpoB1<br>rpoB2 | GCGAACATGCAACGTCAAG<br>GACCTCTGTGCTTAGCTGTAATAGC | 121 | *rpoB* | Duquene et al. (2010) |

### 5.2.8 Análise estatística

As contagens bacterianas foram avaliadas estatisticamente através do programa Statistica 7.0, após a conversão dos resultados para unidades logarítimicas. O experimento foi conduzido em um delineamento inteiramente casualizado, utilizando análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5% ($p<0,05$). Diferenças significativas foram verificadas pelo Teste dos Mínimos Quadrados de Fisher – Teste LSD ($p<0,05$).

Na qPCR, a significância da adição de NaCl foi calculada utilizando análise de variância (ANOVA), seguido de um test t para a comparação das médias. Em ambos os testes, as diferenças foram consideradas significativas quando $p<0,05$.

## 5.3 Resultados

### 5.3.1 Confirmação fenotípica e molecular dos isolados

Todos os isolados foram resistentes à acriflavina e, portanto, fenotipicamente caracterizados como *S. aureus.*

Após os testes moleculares, todos os isolados foram confirmados como sendo *S. aureus*, já que houve a amplificação de um fragmento de 252 pb relacionado ao gene 16S rRNA, específico para o gênero *Staphylococcus*, e também de um fragmento de 458 pb produzido pelo par de *primers* nuc 1 e 2, referente à termonuclease, específica para *S. aureus*.

### 5.3.2 Detecção de genes de enterotoxinas clássicas

Os genes que codificam para as enterotoxinas A (*eea*) e B (*eeb*) foram encontrados em 77,7% (14/18) e 11,1% (2/18) dos isolados, respectivamente. O isolado SAPS-17 apresentou os genes para ambas as enterotoxinas (A e B). Nenhum dos isolados apresentou os genes das enterotoxinas C (*eec*), D (*eed*) e E (*eee*).

### 5.3.3 Detecção dos genes *icaA* e *icaD*

A presença dos genes *icaA* e *icaD* foi observada em 88,8% (16/18) dos isolados avaliados neste estudo. Apenas 11,1% (2/18) dos isolados não apresentaram os genes *icaA* e *icaD*, embora tenham sido capazes de produzir biofilme em aço inoxidável e em poliestireno.

### 5.3.4 Capacidade de produção de biofilme

Em poliestireno, quando os isolados foram cultivados em caldo TSB puro, seguidos de incubação a 37°C, 66,6% (12/18) foram classificados como fracos produtores de biofilme, enquanto 27,7% (5/18) e 5,5% (1/18), respectivamente, como moderados e fortes produtores de biofilme (Tabela 4). Já a 25°C, 50% (9/18) dos isolados foram classificados como moderados produtores de biofilme, e também 50% (9/18) como fracos produtores de biofilme (Tabela 4). Apesar das diferenças observadas, a temperatura não influenciou significativamente ($p>0,05$) a produção de biofilme em poliestireno quando os isolados foram submetidos às condições normais de crescimento (sem estresse salino). Também não verificou-se influência da temperatura quando os isolados foram cultivados em TSB puro e induzidos à produção de biofilme em diferentes concentrações salinas.

Quando o cultivo inicial dos isolados foi realizado em caldo TSB puro, seguido da indução à produção do biofilme em TSB puro e TSB acrescido de 10%, 20% e 30% de NaCl, a maior produção de biofilme foi verificada na presença de 10% de NaCl ($p<0,05$) (Tabela 4). Na concentração de 30% de NaCl, 100% dos isolados foram classificados como fracos formadores de biofilme em ambas as temperaturas testadas ($p>0,05$) (Tabela 4).

Apenas sete isolados (SASF 6, 7, 9, 11, 12, 16 e 18) foram testados a partir do cultivo em TSB acrescido de 10% de NaCl, pois foram os únicos que alcançaram a DO ideal para a realização do teste ($DO_{600}$ = 1,0). Em poliestireno, na condição de cultivo de TSB acrescido de 10% de NaCl, a temperatura de incubação influenciou significativamente ($p<0,05$) a produção de biofilme pelos isolados de *S. aureus*, sendo a maior produção observada a 37°C, após os isolados serem induzidos à produção de biofilme em caldo TSB puro e em caldo TSB acrescido de 10% de NaCl, condições onde a maioria dos isolados foram classificados como fortes produtores de biofilme (Tabela 4). Em ambas as temperaturas, quando a produção de biofilme foi induzida em concentrações de 20% e 30% de NaCl, observou-se uma fraca produção. Em 30% de NaCl, mais de 50% dos isolados não foram capazes de produzir biofilme (Tabela 4).

Tabela 4 – Capacidade de produção de biofilme em poliestireno por *S. aureus* isolados de pescado salgado em diferentes temperaturas e condições de cultivo.

| **Cultivo** | **Produção de biofilme** |
|---|---|

| inicial | 37°C | | | |
|---|---|---|---|---|
| | **TSB puro** | **TSB + 10% NaCl** | **TSB + 20% NaCl** | **TSB + 30% NaCl** |
| TSB puro | Fr = 66,6% (12/18) Mod = 27,7% (5/18) F = 5,5% (1/18) | Fr = 61,1% (11/18) Mod = 38,8% (7/18) | Fr = 94,4% (17/18) Mod = 5,5% (1/18) | Fr = 100% (18/18) |
| TSB + 10% NaCl | F = 100% (7/7) | F = 85,7% (6/7) Mod = 14,3% (1/7) | Fr = 85,7% (6/7) NP = 14,3% (1/7) | Fr = 42,9% (3/7) NP = 57,1% (4/7) |
| **Cultivo inicial** | **25°C** | | | |
| | **TSB puro** | **TSB + 10% NaCl** | **TSB + 20% NaCl** | **TSB + 30% NaCl** |
| TSB puro | Fr = 50% (9/18) Mod = 50% (9/18) | Fr = 44,4% (8/18) Mod = 50% (9/18) F = 5,5% (1/18) | Fr = 77,7% (14/18) Mod = 22,2% (4/18) | Fr = 100% (18/18) |
| TSB + 10% NaCl | Fr = 85,7% (6/7) Mod = 14,3% (1/7) | Fr = 100% (7/7) | Fr = 71,4% (5/7) NP = 28,6% (2/7) | Fr = 14,3% (1/7) NP = 85,7% (6/7) |

NP = Não produz; Fr = Fraca; Mod = Moderada; F = Forte.

Em aço inoxidável, observou-se que 100% dos isolados de *S. aureus* avaliados apresentaram capacidade de produção de biofilme quando cultivados em TSB puro. A produção de biofilme não diferiu estatisticamente ($p>0,05$) a 25°C e a 37°C, tendo sido encontradas, médias de contagem de 4,5 Log UFC.cm$^{-2}$ e 4,4 Log UFC.cm$^{-2}$, respectivamente.

Quando os isolados foram cultivados em caldo TSB acrescido de 10% de NaCl, observou-se uma maior produção de biofilme a 37°C (média de 3,4 Log UFC.cm$^{-2}$) em comparação a 25°C (média de 2,7 Log UFC.cm$^{-2}$). Apesar disso, esses valores não diferiram estatisticamente entre si ($p>0,05$).O isolado SASF 20 produziu biofilme a 25°C (3,2 Log UFC.cm$^{-2}$) e a 37°C (3,5 Log UFC.cm$^{-2}$), enquanto os isolados SASF 7 e 18 produziram apenas a 37°C (3,9 Log UFC,cm$^{-2}$ e 3,8 Log UFC.cm$^{-2}$, respectivamente).

### 5.3.5 Remoção de biofilmes por sanitizantes

Na concentração testada (200 ppm), os três sanitizantes reduziram significativamente ($p<0,05$) o número inicial de células de *S. aureus* aderidas em aço inoxidável. O ácido peracético mostrou-se mais eficaz ($p<0,05$), já que nenhum crescimento bacteriano foi observado após o tratamento dos corpos de prova com esse sanitizante, enquanto médias de contagem de 1 Log UFC.cm$^{-2}$ e 1,3 Log UFC.cm$^{-2}$ foram verificadas após o tratamento com quaternário de amônio e cloro orgânico, respectivamente.

### 5.3.6 Tolerância ao sal

Verificou-se diferença significativa ($p<0,05$) no crescimento de *S. aureus* em função da concentração salina, onde a maior média de contagem foi observada após o micro-organismo ter sido exposto a 10% de NaCl (5,9 Log UFC.mL$^{-1}$), não diferindo estatisticamente do cultivo inicial em condições ideais de crescimento (6,1 Log UFC.mL$^{-1}$). Além disso, a média de contagem de *S. aureus* foi significativamente inferior na concentração de 30% de NaCl (4,7 Log UFC. mL$^{-1}$), não diferindo da observada a 20% de NaCl (5,1 Log UFC. mL$^{-1}$).

### 5.3.7 Análises de transcrição

A QR da expressão do gene *eea* do isolado SASF-4 foi comparada com a da cepa padrão (FRI-S6) sob diferentes condições de multiplicação (ideais e a 10% de NaCl).

Sob condições ideais de multiplicação, a expressão do gene *eea* não diferiu estatisticamente ($p>0,05$) entre o isolado SASF-4 e a cepa-padrão.

A adição de 10% de NaCl resultou em alterações significativas ($p<0,05$) na expressão do gene*eea*pela cepa-padrão, reduzindo a expressão em 0,53 vezes quando comparado com as condições ideais, o que não foi observado no isolado SASF-4, que manteve o mesmo nível de expressão em ambas as condições testadas (Figura 1).

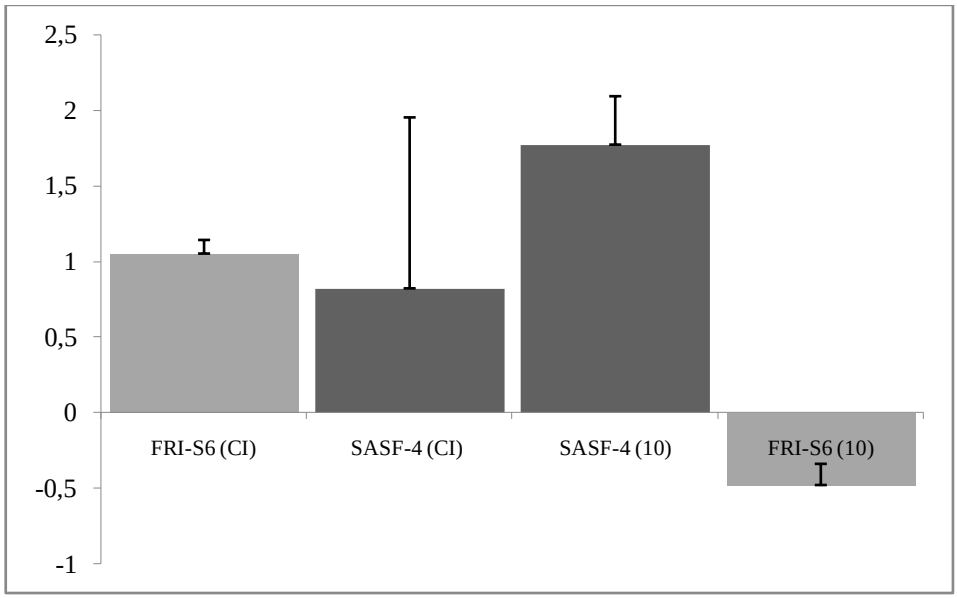


Figura 1 – Expressão relativa média do gene *sea* no isolado SASF-4 e na cepa-padrão (FRI-S6) após cultivo por 24h em condições ideais (CI) ou em 10% de NaCl.

## 5.4 Discussão

Entre os anos 2000 e 2017, *S. aureus* foi classificado como o terceiro maior agente causador de doenças de origem alimentar no Brasil (BRASIL, 2018). Apesar disso, a incidência real de intoxicações alimentares causadas por este micro-organismo é sabidamente muito maior do que o relatado, já que a maioria dos casos não são informados aos serviços de saúde, pois os sintomas tendem a cessar dentro de 24 a 48h (LAWRYNOWICZ-PACIOREK et al., 2007).Condições impróprias de manipulação, processamento e armazenamento, ou situações onde há abuso de temperatura, resultam em níveis elevados (>$10^5$ UFC/g) de *S. aureus* no alimento, permitindo a produção de enterotoxinas estafilocócicas (EEs) (PEDRO et al., 2004; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ et al., 2012). Como as EEs são resistentes à proteólise e ao calor, processos térmicos não são totalmente efetivos como uma medida de prevenção contra a produção de enterotoxinas por *S. aureus* em alimentos (OMOE et al., 2005).

Enterotoxinas estafilocócicas clássicas (EEA-EEE) têm sido relatadas como a causa de 95% das intoxicações alimentares causadas por *S. aureus*. Entre elas, EEA é a mais comum, provavelmente, devido à alta resistência a enzimas proteolíticas (LE-LOIR; BARON; GAUTIER, 2003; PINCHUK et al., 2010). No entanto, em alguns estudos, já foi verificado que o gene *eea,* que codifica para a

produção desta enterotoxina, não é o predominante em produtos de pesca (NORMANNO et al., 2005; SIMON & SANJEEV, 2007).

Neste estudo, a presença de genes que codificam para EEs clássicas foi verificada em 83,3% (15/18) dos isolados de *S. aureus* avaliados, sendo 77,7% (14/18) portadores do gene *eea*, enquanto 11,1% (2/18) dos isolados portavam apenas o gene *eeb*. Estes resultados vão ao encontro dos relatados por Vázquez-Sánchez et al. (2012), que verificaram a presença de genes de enterotoxinas em 91% (114/125) dos isolados de *S. aureus* obtidos a partir de diferentes produtos de pesca em Galicia (Espanha), sendo 98,2% (112/114) destes isolados portadores do gene *eea*. Além disso, os autores relataram a identificação de genes de enterotoxinas em 100% (8/8) dos isolados de *S. aureus* obtidos a partir de amostras de pescado salgado. De maneira similar, Obdait et al. (2015) observaram que isolados de *S. aureus* provenientes de pescados importados na Jordânia carreavam com maior incidência o gene *eea*. Puah, Chua e Tan (2016) verificaram uma baixa incidência de genes de enterotoxinas em isolados de *S. aureus* provenientes de amostras de sushi e sashimi comercializados em Klang Valley (Malásia), identificando a presença do gene *eea* apenas em 15% (3/20) das amostras de sashimi, e dos genes *eeb* e *eec* em 3,1% (1/32) e 9,3% (3/32) das amostras de sushi, respectivamente. Estes mesmos autores inferem que a contaminação nestes produtos pode ser resultado da manipulação durante o seu preparo, já que *S. aureus* não faz parte da microbiota normal de peixes marinhos.

*Staphylococcus aureus* é um micro-organismo facilmente adaptável que pode viver em uma ampla variedade de ambientes sob a forma de biofilme, um importante fator de virulência que o torna mais resistente ao stress ambiental (VASUDEVAN et al., 2003; RODE et al., 2007). Assim, superfícies de contato com alimentos podem atuar como reservatório de *S. aureus* em indústrias, desempenhando um importante papel como fonte de contaminação dos alimentos (VÁZQUEZ-SANCHÉZ et al., 2014).

Neste estudo, a produção de biofilme por *S. aureus* foi avaliada em dois tipos de superfície, aço inoxidável e poliestireno, sob diferentes temperaturas e condições de cultivo. Essas superfícies foram escolhidas por serem materiais amplamente utilizados na indústria de alimentos, onde o aço inoxidável é fundamental para a produção de equipamentos de processamento, devido à sua resistência mecânica, à corrosão e aos danos causados pelo processo de limpeza, enquanto o poliestireno

tem sido utilizado, principalmente, para a confecção de embalagens (PIMENTEL-FILHO et al., 2014).

Verificou-se que todos os isolados avaliados (n = 18) foram capazes de produzir biofilme em ambas as superfícies testadas quando cultivados em caldo TSB puro, independente da temperatura de incubação. No estudo de Vázquez-Sánchez et al. (2014), 100% (26/26) dos isolados de *S. aureus*, provenientes de diferentes produtos de pesca na Espanha, foram capazes de produzir biofilme em aço inoxidável. Além disso, estes autores observaram que 80% (8/10) das cepas com maior capacidade de formação de biofilme foram isoladas de produtos de pesca altamente processados (como pescados salgados), demonstrando uma pressão seletiva das condições de processamento sobre o comportamento de *S. aureus*.

Di Ciccio et al. (2015) encontraram diferenças na capacidade de produção de biofilme por *S. aureus* em diferentes superfícies e temperaturas, onde 63,1% (24/38) e 65,7% (25/38) das cepas estudadas foram capazes de produzir biofilme, respectivamente, em aço inoxidável e poliestireno a 37°C, enquanto apenas 2,6% (1/38) das cepas produziram biofilme em ambas as superfícies a 12°C.

Marques et al. (2007) observaram uma alta intensidade de aderência das células de *S. aureus* em aço inoxidável, na ordem de 7 Log UFC.cm$^{-2}$, indicando uma formação bastante espessa de biofilme. Apesar disso, os autores ressaltam que esse número de células viáveis pode ter sido influenciado pelo longo tempo de contato da cultura com os corpos de prova (360h), diferindo do método utilizado no presente estudo, onde a indução à formação de biofilme foi realizada em 24h. Assim, é possível inferir que, neste estudo, o número de células viáveis de *S. aureus* na superfície de aço inoxidável provavelmente aumentaria caso o tempo de contato entre o inóculo e a superfície aumentasse também, o que já foi relatado por Gândara e Oliveira (2000).

A temperatura comumente utilizada em experimentos de biofilme com bactérias do gênero *Staphylococcus* é 37°C devido à sua relevância em doenças infecciosas. Apesar disso, tanto em ambientes hospitalares como de produção de alimentos, temperaturas abaixo e acima de 37°C também são relevantes (RODE et al., 2007). Segundo Morton et al. (1998), independentemente da espécie bacteriana ou superfície testada, o processo de adesão celular ocorre em intensidade máxima quando os micro-organismos podem crescer na sua temperatura ótima. Como *S. aureus* é um micro-organismo bastante versátil, capaz de crescer em uma ampla

faixa de temperaturas (BERGDOLL, 1989; SCHMITT et al., 1990; LE LOIR; BARON; GAUTIER, 2003), a produção de biofilme em aço inoxidável e poliestireno não diferiu a 25°C e 37°C quando os isolados foram cultivados em caldo TSB puro.

De acordo com Rode et al. (2007), a presença de sal exerce influência sobre a capacidade de produção de biofilme por *S. aureus*, o que também foi observado neste estudo, já que a maior produção de biofilme em poliestireno foi verificada quando os isolados foram cultivados em caldo TSB puro e induzidos à formação de biofilme em 10% de NaCl. Além disso, ao serem cultivados em caldo TSB acrescido de 10% de NaCl e na temperatura ótima de crescimento (37°C), a maioria dos isolados apresentou uma forte produção de biofilme mesmo quando a indução à produção ocorreu em 10% de NaCl.

Segundo Moretro et al. (2003), a presença de NaCl pode influenciar a formação de biofilme por *S. aureus* ao induzir o operon *icaADBC*, cuja expressão tem sido associada à produção de biofilme por *S. aureus.* Neste estudo, 11,1% (2/18) dos isolados não apresentaram os genes *icaA* e *icaD*, sugerindo que outros mecanismos *ica*-independentes possam ter sido utilizados para a produção de biofilme, o que já foi relatado por Fitzpatrick et al. (2005).

Embora muitos tipos de sanitizantes sejam utilizados para eliminar micro-organismos nas indústrias de alimentos, as bactérias na forma de biofilme são capazes de tolerar com facilidade a ação destes compostos, ao contrário de suas células planctônicas (DONLAN; COSTERTON, 2002). Essa resistência dos biofilmes aos biocidas pode facilitar a persistência de patógenos bacterianos no ambiente de produção de alimentos (VAN-HOUDT; MICHIELS, 2010).

De acordo com a *American Public Health Association* (APHA, 2001), os agentes sanitizantes devem eliminar as bactérias patogênicas e reduzir o número de micro-organismos deteriorantes a níveis aceitáveis (máximo 2 $UFC.cm^{-2}$) em superfícies de processamento de alimentos ao final do processo de higienização. Neste estudo, cloro orgânico, ácido peracético e quaternário de amônio foram avaliados quanto à eficiência na remoção de biofilmes de *S. aureus* em aço inoxidável. Embora os três sanitizantes tenham sido efetivos na remoção do biofilme, observou-se uma maior eficácia do ácido peracético em relação aos demais, já que não foi observado crescimento bacteriano nos corpos de prova após o tratamento com esse sanitizante, enquanto que o quaternário de amônio e o cloro orgânico

reduziram o número de células a 1 Log UFC.cm$^{-2}$ e 1,3 Log UFC.cm$^{-2}$, respectivamente.

Os resultados encontrados no presente estudo assemelham-se aos obtidos por Marques et al. (2007), que avaliaram a eficiência dos sanitizantes dicloroisocianurato de sódio, peróxido de hidrogênio e ácido peracético na destruição de células de *S. aureus*na matriz de biofilme em superfície de aço inoxidável, identificando o ácido peracético como o mais eficaz na remoção do biofilme formado pelo patógeno. Segundo os autores, a eficiência do ácido peracético pode ser explicada em função de sua alta capacidade de oxidar moléculas celulares.

No estudo realizado por Bae, Baek e Lee (2012), um desinfetante à base de cloro reduziu a população de *S. aureus* em superfícies de aço inoxidável de 7,8 Log UFC.cm$^{-2}$ para 2,8 Log UFC.cm$^{-2}$, enquanto outro desinfente à base de álcool reduziu a população a níveis abaixo do limite de deteção da técnica utilizada (<1,48 Log UFC.cm$^{-2}$), demonstrando que o primeiro foi menos efetivo na redução de *S. aureus* em aço inoxidável. Luppens et al. (2002) também identificaram uma alta resistência à sanitizantes contendo cloro por células de *S. aureus* em biofilmes. Ueda e Kuwabara (2007) não observaram crescimento de *S. aureus* em aço inoxidável após tratamento com cloreto de benzalcônio, um composto quaternário de amônio, a uma concentração variando de 0,05% a 1%.

Com relação à tolerância ao sal, nosso estudo demonstrou que *S. aureus* é capaz de tolerar e mutiplicar-se em altas concentrações salinas (30% de NaCl), indo de encontro a estudos anteriores que relatavam uma tolerância de até 15% de NaCl (CLEMENDS; FOSTER, 1999; KURODA et al., 2008; BUNNIA, 2008). Além disso, poucos estudos avaliaram a influência de altas concentrações de sal sobre a produção de biofilmes e sobre a expressão de enterotoxinas.

Segundo Amin, Lash e Wilkinson (1995), alguns osmoprotetores, como colina, glicina betaína e prolina, acumulam-se nas células de *S. aureus* em resposta ao estresse osmótico causado pela presença de sal. No estudo de Tsai et al. (2011), avaliando a composição fosfolipídica de *S. aureus,* observou-se que o nível de cardiolipina, um fosfolipídio contendo quatro grupos acila, é fundamental para a aptidão estafilocócica a longo prazo em condições de alta salinidade. Além disso, *S. aureus* possui várias outras características envolvidas na tolerância ao sal, como a presença do gene *brnQ*, que codifica um transportador de aminoácidos de cadeia

ramificada (VIJARANAKUL et al., 1998), e do gene *ars*R, regulador do operon arsênico (SCYBERT et al., 2003). A presença da proteína de parede celular Ebh também está envolvida na tolerância à pressão hiperosmótica (KURODA et al., 2008).

Neste estudo, embora a adição de 10% de NaCl ao meio de cultivo tenha reduzido a expressão do gene *eea* pela cepa-padrão FRI-S6, nenhuma mudança na expressão deste gene foi observada com relação ao isolado SASF-4. Esse dado sugere que o isolado SASF-4 está bem adaptado a essa concentração de sal, visto que manteve o mesmo nível de expressão em ambas as condições de cultivo testadas.

## 5.5 Conclusões

Os isolados de *S. aureus* avaliados demonstraram uma forte adaptação a 10% de NaCl, concentração na qual a produção de biofilme foi melhor induzida e houve a expressão da enterotoxina A, a mais comumente envolvida em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica.

## Referências

AMIN, U. S.; LASH, T. D.; WILKINSON, B. J. Proline betaine is a highly effective osmoprotectant for Staphylococcus aureus. **Archives of Microbiology**, v. 163, n. 2, p. 138-142, 1995.

APHA (American Public Health Association). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington: American Public Health Association, 2001.

BAE, Y.-M.; BAEK, S.-Y.; LEE, S.-Y.Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers.**International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 465-473, 2012.

BALTAZAR, C.; SANCHES, S. A.; TELLES, E. O.; MERUSSE, J. L. B.; BALIAN, S. de C.Qualidade do bacalhau salgado seco comercializado em temperatura ambiente e refrigerado. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, n. 3, p. 236-242, 2013.

BARON, F.; COCHET, M.-F.; PELLERIN, J.; BEN ZAKOUR, N.; LEBON, A.; NAVARRO, A.; PROUDY, I.; LE LOIR, Y.; GAUTIER, M. Development of a PCR test to differentiate between Staphylococcus aureus and Staphylococcus intermedius. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 2302-2305, 2004.

BERGDOLL, M. S. Staphylococcus aureus. In: Doyle, M.P. (Ed.), **Foodborne Bacterial Pathogens**. Marcel Dekker, New York, p. 464–523, 1989.

BORE, E.; LANGSRUD, S.; LANGSRUD, Ø.; RODE, T. M.; HOLCK, A. Acid-shock responses in Staphylococcus aureus investigated by global expression analysis. **Microbiology**, v. 153, p. 2289-2303, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária.Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal.**Portaria n° 52, de 29 de dezembro de 2000**.Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Salgado e Peixe Salgado Seco.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde.Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis.CoordenaçãoGeral de Doenças Transmissíveis. **Surtos de Doenças TransmitidasporAlimentos no Brasil**. Junho de 2018. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/julho/02/Apresentacao-Surtos-DTA-Junho-2018.pdf>. Acesso em: 1 set. 2018.

BHUNIA, A. K. Staphylococcus aureus. In: BHUNIA, A. K. (ed.) **Foodborne Microbial Pathogens**. Springer, NY, p. 125-134, 2008.

CLEMENDS, M. O.; FOSTER, S. J. Stress resistance in Staphylococcus aureus.**Trends in Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 458-462, 1999.

DAVIES, A. R.; CPELL, C.; JEHANNO, D.; NYCHAS, G. J. E.; KIRBY, R. M. Incidence of food borne pathogens on European fish. **Food Control**, v. 12, p. 67-71, 2001.

DEVRIESE, L. A. Baird-Parker medium supplemented with acriflavine, polymyxins and sulphonamide for the selective isolation of Staphylococcus aureus from heavily contaminated materials.**Journal of Applied Bacteriology**, v. 50, p. 351-357, 1981.

DI CICCIO, P.; VERGARA, A.; FESTINO, A. R.; PALUDI, D.; ZANARDI, E.; GHIDINI, S.; IANIERI, A. Biofilm formation by Staphylococcus aureus on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hidrophobicity. **Food Control**, v. 50, p. 930-936, 2015.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DUQUENE, M.; FLEUROT, I.; AIGLE, M.; DARRIGO, C.; BOREZÉE—DURANT, E.; DERZELLE, S.; BOUIX, M.; DEPERROIS-LAFARGE, V.; DELACROIX-BUCHET, A. Tool for quantification of Staphylococcal enterotoxin gene expression in cheese.**Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 5, p. 1367-1374, 2010.

FITZPATRICK, F.; HUMPHREYS, H.; O'GARA, J. P. The genetics of staphylococcal biofilm formation-will a greater understanding of pathogenesis lead to better

management of device-related infection? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, p. 967–973, 2005.

GÂNDARA, A. L. N.; OLIVEIRA, J. S. Adesão de linhagem selvagem de Streptococcus thermophilus em superfície de aço inoxidável e efeitos da higienização na sua remoção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 1, p. 1-7, 2000.

GERKE, C.; KRAFT, A.; SÜSSMUTH, R.; SCHWEITZER, O.; GÖTZ, F. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the Staphylococcus epidermidis polysaccharide intercellular adhesin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 29, p. 18586-18593, 1998.

GHANBARI, M.; JAMI, M.; DOMIG, K. J.; KNEIFEL, W. Seafood biopreservation by lactic acid bacteria – a review.**LWT – Food Science and Technology**, v. 54, p. 315-324, 2013.

HEILMANN, C.; SCHWEITZER, O.; GERKE, C.; VANITTANAKOM, N.; MACK, D.; GÖTZ, F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming Staphylococcus epidermidis. **Molecular Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 1083-1091, 1996.

HENNEKINNE, J.-A.; DE BUYSER, M.-L.; DRAGACCI, S. Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 36, n. 4, p. 815-836, 2012.

HERRERO, M. H.; SAQUS, M.; GEREZ, H.; VENTURA, P. Halotolerant and halophilic bacteria isolated during the ripening of salted products. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 318-323, 2003.

HUSS, H. H. Control of indigenous pathogenic bacteria in seafood. **Food Control**, v. 8, n. 2, p. 91-98, 1997.

KÖSE, S. Evaluation of seafood safety health hazards for traditional fish products: preventive measures and monitoring issues. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 10, p. 139-160, 2010.

KURODA, M.; TANAKA, Y.; AOKI, R.; SHU, D.; TSUMOTO, K.; OHTA, T. Staphylococcus aureus giant protein Ebh is involved in tolerance to transient hyperosmotic pressure. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 374, n. 2, p. 237-241, 2008.

LAWRYNOWICZ-PACIOREK, M.; KOCHMAN, M.; PIEKARSKA, K.; GROCHOWSKA, A.; WINDYGA, B. The distribution of enterotoxin and enterotoxin-like genes in Staphylococcus aureus strains isolated from nasal carriers and food samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 319-323, 2007.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. Staphylococcus aureus and food poisoning (Review). **Genetic and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.

LUPPENS, S. B. I.; REJI, M. W.; VAN DER HEIJDEEN, R. W. L.; ROMBOUTS, F. M.; ABEE, T. Development of standard test to asses the resistance of Staphylococcus aureus biofilm cells to disinfectants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4194-4200, 2002.

MARQUES, S. C.; REZENDE, J. das G. O. S.; ALVES, L. A. de F.; SILVA, B. C.; ALVES, E.; ABREU, L. R. de; PICCOLI, R. H. Formation of biofilms by Staphylococcus aureus on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 538-543, 2007.

MATTEWS, K. R.; ROBERSON, J.; GILLESPIE, B. E.; LUTHER, D. A.; OLIVER, S.P., MATTEWS, K. R. R. J. Identification and Differentiation of Coagulase-Negative Staphylococcus aureus by Polymerase Chain Reaction. **Journal of Food Protection**, v. 60, p. 686-688, 1997.

MORETRO, T.; HERMANSEN, L.; HOLCK, A. L.; SIDHU, M. S.; RUDI, K.; LANGSRUD, S. Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus ica among Staphylococci from food and food processing environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5648-5655, 2003.

MORTON, L. H. G.; GREENWAY, D. L. A.; GAYLARDE, C. C.; SURMAN, S. B. Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 41, n. 3/4, p. 247-259, 1998.

NAKIPOGLU, Y.; IGNAK, S.; GÜRLER, N.; GÜRLER, B. The prevalence of antiseptic resistance genes (qaca/b and smr) and antibiotic resistance in clinical Staphylococcus aureus strains. **Mikrobiyoloji bülteni**, v. 46, n. 2, p. 180-189, 2012.

NORMANNO, G.; SALANDRA, G. La; DAMBROSIO, A.; QUAGLIA, N. C.; CORRENTE, M.; PARISI, A.; SANTAGADA, G.; FIRINU, A.; CRISETTI, E.; CELANO, G. V. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic Staphylococcus aureus isolated from meat and dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 290-296, 2007.

OBDAIT, M. M.; SALMAN, A. E. B.; LAFI, S. Q.; Prevalence of Staphylococcus aureus in imported fish and correlations between antibiotic resistance and enterotoxigenicity. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 11, p.1999-2005, 2015.

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

OTTO, M. Staphylococcal biofilms.**Current Topics in Microbiology and Imunnology**, v. 322, p. 207-228, 2008.

PANG, Y.; BOSCH, T.; ROBERTS, M. C. Single polimerase chain reaction for the detection of tetracycline-resistant determinants Tet K and Tet L. **Molecular and Cellular Probes**, v. 8, p. 417-422, 1994.

PEDRO, S.; ALBUQUERQUE, M. M.; NUNES, M. L.; BERNARDO, M. Pathogenic bacteria and indicators in salted cod (Gadus morhua) and desalted products at low and high temperatures. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 13, n. 3, p. 39-48, 2004.

PESAVENTO, G.; DUCCI, B.; COMODO, N.; LO NOSTRO, A. Antimicrobial resistance profile of Staphylococcus aureus isolated from raw meat: A research of methicillin resistant S. aureus (MRSA). **Food Control**, v. 18, p. 196-200, 2007.

PIMENTEL-FILHO, N. de J.; MARTINS, M. C. de F.; NOGUEIRA, G. B.; MANTOVANI, H. C.; VANETTI, M. C. D. Bovicin HC5 and nisin reduce Staphylococcu aureus adhesion to polydtyrene and change the hydrophobicity profile and Gibbs free Energy of adhesion. **International Journal of Food Microbiology**, v. 190, p. 1-8. 2014.

PINCHUK, I. V.; BESWICK, E. J.; REYES, V. E. Staphylococcal enterotoxins. **Toxins(Basel)**, v. 2, 2177-2197, 2010.

PUAH, S. M.; CHUA, K. H.; TAN, J. A.. M. A. Virulence factors and antibiotic susceptibility of Staphylococcus aureus isolates in ready-to-eat foods: Detection of S. aureus contamination and a high prevalence of virulence genes. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, p. 199, 2016.

RODE, T. M; LANGSRUD, S.; HOLCK, A.; MORETRO, T. Different patterns of biofilm formation in Staphylococcus aureus under food-related stress conditions.**International Journal of Food Microbiology**, v. 116, p. 372-383, 2007.

ROSSONI, E. M. M.; GAYLARDE, C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 81-85, 2000.

SCHMITT, M.; SCHULER-SCHMID, U.; SCMIDT-LORENZ, W. Temperature limits of growth, TNase, and enterotoxin production of Staphylococcus aureus strains isolated from food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 11, p. 1-19, 1990.

SCYBERT, S.; PECHOUS, R.; SITTHISAK, S.; NADAKAVUKAREN, M. J.; WILKINSON, B. J.; JAYASWAL, R. K. NaCl-sensitive mutant of Staphylococcus aureus has a Tn917-lacZ insertion in its ars operon. **FEMS Microbiology Letters**, v. 222, n. 2, p. 171-176, 2003.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. de A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. São Paulo: Livraria Varela, 2010. 4ed.

SIMON, S. S.; SANJEEV, S. Prevalence of enterotoxigenic Staphylococcus aureus in fishery products and fish processing factory workers. **Food Control**, v. 18, p. 1565-1568, 2007.

STEENACKERS, H. P. L.; ERMOLATEV, D. S.; SAVALIYA, B.; WEERDT, A.; DE COSTER, D.; SHAH, A.; VAN DER EYCKEN, E. V.; DE VOS, D. E.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. J. Structure–activity relationship of 2-hydroxy-2-aryl-2,3-dihydroimidazo [1,2-a]pyrimidinium salts and 2N-substituted 4(5)-aryl-2-amino-1H-imidazoles as inhibitors of biofilm formation by Salmonella Typhimurium and Pseudomonas aeruginosa. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 3462-3473, 2011.

STEPANOVIC, S.; VUCOVIC, D.; HOLA, V.; DI BONAVENTURA, G.; DJUKIC, S.; ĆIRKOVIC, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Journal Compilation**, v. 115, p. 891-899, 2007.

TSAI, M.; OHNIWA, R. L.; KATO, Y.; TAKESHITA, S. L.; OHTA, T.; SAITO, S.; HAYASHI, H.; MORIKAWA, K. Staphylococcus aureus requires cardiolipin for survival under conditions of high salinity. **BioMedCentral Microbiology**, v. 11, n. 13, p. 1-12, 2011.

THORARINSDOTTIR, K. A.; ARASON, S.; BOGASON, S. G.; KRISTBERGSSON, K. The effects of various salt concentrations during brine curing of cod (Gadus morhua). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, p. 79-89, 2004.

UEDA, S.; KUWABARA, Y. Susceptibility of biofilm Escherichia coli, Salmonella Enteritidis and Staphylococcus aureus to detergents and sanitizers.**Biocontrol Science**, v. 12, n. 4, p. 149-153, 2007.

VALLE, J.; TOLEDO-ARANA, A.; BERASAIN, C. M.; AMORENA, B.; PENADÉS, J. R.; LASA, I. SarA and not sigmaB is essential for biofilm development by Staphylococcus aureus. **Molecular Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1075-1087, 2003.

VAN-HOUDT, R.; MICHIELS, C. W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface.**Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 4, p. 1117-1131, 2010.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; LÓPEZ-CABO, M.; SAÁ-IBUSQUIZA, P.; RODRÍGUEZ-HERRERA, J. J. Incidence and characterization of Staphylococcus aureus in fishery products marketed in Galicia (Northwest Spain). **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, p. 286-296, 2012.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; CABO, M. L.; IBUSQUIZA, P. S.; RODRÍGUEZ-HERRERA, J. J. Biofilm-forming ability and resistance to industrial disinfectants of Staphylococcus aureus isolated from fishery products. **Food Control**, v. 39, p. 8-16, 2014.

VASUDEVAN, P.; NAIR, M. K.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K. S. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of Staphylococcus aureus for biofilm formation.**Veterinary Microbiology**, v. 92, p. 179-185, 2003.

VICTORIA, E. J.; LIMA, M. O.; SANT'ANA, L. S. Determinação de atividade de água, umidade e sal em peixes salgados e secos importados. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 14, n. 2, p. 125-129, abr./jun. 2011.

VIJARANAKUL, U.; XIONG, A.; LOCKWOOD, K.; JAYASWAL, R. K. Cloning and nucleotide sequencing of a Staphylococcus aureus gene encoding a branched-chain-amino-acid transporter. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 763-767, 1998.

VISHWANATH, W.; LILABATI, H.; BIJEN, M. Biochemical, nutritional and microbiological quality of fresh and smoked mud eel fish Monopterus albus – a comparative study. **Food Chemistry**, v. 61, n. 1/2, p. 153-156, 1998.

WIRTANEM, G.; HUSMARK, U.; MATTILA-SANDHOLM, T. Microbial evaluation of the biotransfer potencial from surfaces with Bacillus biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food processing systems. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 7, p. 727-733, 1996.

YUAN, J. S.; ANN REED, A.; CHEN, F; STEWART C. N. Statistical analysis of real-time PCR data. **BMC Bioinformatics**, p. 1 – 12, 2006.

## 6 Considerações finais

A presença de isolados de *S. aureus* tolerantes a altas concentrações de sal, potencialmente enterotoxigênicos, capazes de produzir biofilmes e resistentes à ação de sanitizantes e antimicrobianos, em diferentes etapas da produção de pescado salgado, ressalta a importância da adoção de corretas práticas higiênico-sanitárias durante o processamento e manipulação deste produto, evitando a persistência e disseminação do patógeno no ambiente e diminuindo os riscos à saúde da população.

**Referências**


AARESTRUP, F. M.; HASMAN, H. Susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substances used for disinfection. **Veterinary Microbiology**, v. 100, p. 83-89, 2004.

ALBUQUERQUE, W. F.; MACRAE, A.; SOUSA, O. V.; VIEIRA, G. H. F.; VIEIRA, R. H. S. F. Multidrug resistant Staphylococcus aureus strains isolated from a fish market and from fish handlers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p.131-134, 2007.

AMIN, U. S.; LASH, T. D.; WILKINSON, B. J. Proline betaine is a highly effective osmoprotectant for Staphylococcus aureus. **Archives of Microbiology**, v. 163, n. 2, p. 138-142, 1995.

APHA (American Public Health Association). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington: American Public Health Association, 2001.



APHA (American Public Health Association). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. Washington: American Public Health Association, 2001.



BAE, Y.-M.; BAEK, S.-Y.; LEE, S.-Y.Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers.**International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 465-473, 2012.

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

BALTAZAR, C.; SANCHES, S. A.; TELLES, E. O.; MERUSSE, J. L. B.; BALIAN, S. de C. Qualidade do bacalhau salgado seco comercializado em temperature ambiente e refrigerado. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 16, n. 3, p. 236-242, jul./set. 2013.

BARON, F.; COCHET, M.-F.; PELLERIN, J.; BEN ZAKOUR, N.; LEBON, A.; NAVARRO, A.; PROUDY, I.; LE LOIR, Y.; GAUTIER, M. Development of a PCR test to differentiate between Staphylococcus aureus and Staphylococcus intermedius. **Journal of Food Protection**, v. 67, p. 2302-2305, 2004.

BASTI, A. A.; MISAGHI, A.; SALEHI, T. Z.; KAMKAR, A. Bacterial pathogens in fresh, smoked and salted Iranian fish. **Food Control**, v. 17, p. 183-188, 2006.

BATHIA, A.; ZAHOOR, S. Staphylococcus aureus enterotoxins: a review. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 1, n. 2, p.188–197, 2007.

BATRA, R.; COOPER, B. S.; WHITELY, C.; PATEL, A. K.; WYNCOLL, D.; EDGEWORTH, J. D. Efficacy and limitation of a chlorhexidine-based decolonization strategy in preventing transmission of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in an intensive care unit. **Clinical Infection Diseases**, v. 50, p. 210–217, 2010.

BERGDOLL, M. S. Staphylococcus aureus. In: Doyle, M.P. (Ed.), **Foodborne Bacterial Pathogens**. Marcel Dekker, New York, p. 464–523, 1989.

BERTSCH, D.; URUTY, A.; ANDEREGG, J.; LACROIX, C.; PERRETEN, V.; MEILE, L. Tn6198, a novel transposon containing the trimethoprim resistance gene dfrG embedded into a Tn916 element in Listeria monocytogenes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, p. 986-991, 2013.

BORE, E.; LANGSRUD, S.; LANGSRUD, Ø.; RODE, T. M.; HOLCK, A. Acid-shock responses in Staphylococcus aureus investigated by global expression analysis. **Microbiology**, v. 153, p. 2289-2303, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária.Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal.**Portaria n° 52, de 29 de dezembro de 2000**.Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Peixe Salgado e Peixe Salgado Seco.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução n° 12, de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b> Acesso em: 10 abr. 2017.

BRASIL. Governo do Brasil. **Produção de peixes no Brasil cresce com o apoio de pesquisas da Embrapa**. 2017.Disponível em:<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2017/01/producao-de-peixes-no-brasil-cresce-com-apoio-de-pesquisas-da-embrapa> Acesso em: 10 set. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde.Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis.CoordenaçãoGeral de Doenças Transmissíveis. **Surtos de Doenças TransmitidasporAlimentos no Brasil**. Junho de 2018. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/julho/02/Apresentacao-Surtos-DTA-Junho-2018.pdf>. Acesso em: 1 set. 2018.

BRIDIER, A.; BRIANDET, R.; THOMAS, V.; DUBOIS-BRISSONNET, F. Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. **Biofouling**, v. 27, n. 9, p. 1017-1032, 2011.

BUFFET-BATAILLON, S.; TATTEVIN, P.; BONNAURE-MALLET, M.; JOLIVET-GOUGEON, A. Emergence of resistance to antibacterial agents: the role of quaternary ammonium compounds – a critical review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 39, p. 381-389, 2012.

BHUNIA, A. K. Staphylococcus aureus. In:BHUNIA, A. K. (ed.)**Foodborne Microbial Pathogens**. Springer, NY, p. 125-134, 2008.

CARPENTIER, B.; CERF, O. Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry.**Journal of Applied Microbiology**, v. 75, n. 6, p. 499-511, 1993.

CLEMENDS, M. O.; FOSTER, S. J. Stress resistance in Staphylococcus aureus.**Trends in Microbiology**, v. 17, n. 11, p. 458-462, 1999.

CLSI. Clinical Laboratory Standards Institute. M100-S25. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twentieth informational supplement**. 2015. Disponível em: <http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/m100S25_sample.pdf.> Acesso em: 6 set. 2018.

COSTERTON, J. W.; CHENG, K. -J.; GEESEY, G. G.; LADD, T. I.; NICHEL, J. C.; DASGUPTA, M.; MARRIE, T. J. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, p. 435-464, 1987.

CRAMTON, S. E.; GERKE, C.; SCHNELL, N. F.; NICHOLS, W. W.; GÖTZ, F. The intercellular adhesion (ica) locus is present in Staphylococcus aureus and is required for biofilm formation. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 5427–5433, 1999.

CRAMTON, S. E.; ULRICH, M.; GOZ, F.; DORING, G. Anaerobic conditions induce expression of polysaccharide intercellular adhesin in Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 4079–4085, 2001.

DALGAARD, P.; MADSEN, H. L.; SAMIEIAN, N.; EMBORG, J. Biogenic amine formation and microbial spoilage in chilled garfish (Belone belone belone) – effect of modified atmosphere packaging and previous frozen storage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, p. 80-95, 2006.

DAVIES, A. R.; CPELL, C.; JEHANNO, D.; NYCHAS, G. J. E.; KIRBY, R. M. Incidence of food borne pathogens on European fish. **Food Control**, v. 12, p. 67-71, 2001.

DEVRIESE, L. A. Baird-Parker medium supplemented with acriflavine, polymyxins and sulphonamide for the selective isolation of Staphylococcus aureus from heavily contaminated materials.**Journal of Applied Bacteriology**, v. 50, p. 351-357, 1981.

DI CICCIO, P.; VERGARA, A.; FESTINO, A. R.; PALUDI, D.; ZANARDI, E.; GHIDINI, S.; IANIERI, A. Biofilm formation by Staphylococcus aureus on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hidrophobicity. **Food Control**, v. 50, p. 930-936, 2015.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167-193, 2002.

DUQUENE, M.; FLEUROT, I.; AIGLE, M.; DARRIGO, C.; BOREZÉE—DURANT, E.; DERZELLE, S.; BOUIX, M.; DEPERROIS-LAFARGE, V.; DELACROIX-BUCHET, A. Tool for quantification of Staphylococcal enterotoxin gene expression in cheese.**Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 5, p. 1367-1374, 2010.

EMBORG, J.; LAURSEN, B. G.; RATHJEN, T.; DALGAARD, P. Microbial spoilage and formation of biogenic amines in fresh and thawed modified atmosphere-packed salmon (Salmo salar) at 2°C. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 790-799, 2002.

ENRIGHT, M. C. The evolution of resistant pathogen – the case of MRSA.**Current Opinion in Pharmacology**, v. 3, p. 474–479, 2003.
FELDHUSEN, F. The role of seafood in bacterial foodborne diseases.**Microbes and Infection**, v. 2, p. 1651-1660, 2000.

FITZPATRICK, F.; HUMPHREYS, H.; O'GARA, J. P. The genetics of staphylococcal biofilm formation-will a greater understanding of pathogenesis lead to better management of device-related infection? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11, p. 967–973, 2005.

FRECH, G.; SCHWARTZ, S. Molecular analysis of tetracycline resistance in Salmonella enterica subsp. enterica serovars Typhimurium, Enteritidis, Dublin, Choleraesuis, Hadar and Saintpaul: Construction and application of specific gene probes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 633-641, 2000.

FURI, l.; CIUSA, M. L.; KNIGHT, D.; DI LORENZO, V.; TOCCI, N.; CIRASOLA, D., et al. Evaluation of reduced susceptibility to quaternary ammonium compounds and bisbiguanides in clinical isolates and laboratory-generated mutants of Staphylococcus aureus.**Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 8, p. 3488-3497, 2013.

GÂNDARA, A. L. N.; OLIVEIRA, J. S. Adesão de linhagem selvagem de Streptococcus thermophilus em superfície de aço inoxidável e efeitos da higienização na sua remoção. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 1, p. 1-7, 2000.

GERKE, C.; KRAFT, A.; SÜSSMUTH, R.; SCHWEITZER, O.; GÖTZ, F. Characterization of the N-acetylglucosaminyltransferase activity involved in the biosynthesis of the Staphylococcus epidermidis polysaccharide intercellular adhesin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 29, p. 18586-18593, 1998.

GHANBARI, M.; JAMI, M.; DOMIG, K. J.; KNEIFEL, W. Seafood biopreservation by lactic acid bacteria – a review.**LWT – Food Science and Technology**, v. 54, p. 315-324, 2013.

GRAPE, M.; SUNDSTRÖM, L.; KRONVALL, G. Sulphonamide resistance gene sul3 found in Escherichia coli isolates from human sources. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 1022-1024, 2003.

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

HASSANZADEH, S.; MASHHADI, R.; YOUSEFI, M.; ASKARI, E.; SANIEI, M.; POURMAND, M.R. Frequency of efflux pump genes mediating ciprofloxacin and antiseptic resistance in methicillin-resistant Staphylococcus aureus isolates. **Microbial Pathogenesis**, v. 111, p. 71-74, 2017.

HAUBERT, L.; MENDONÇA, M.; LOPES, G. V.; CARDOSO, M. R. de; SILVA, W. P. da. Listeria monocytogenes isolates from food and food environment harbouring tetM and ermB resistance genes. **Letters in Applied Microbiology**, v. 62, p. 23-29, 2015.

HEILMANN, C.; SCHWEITZER, O.; GERKE, C.; VANITTANAKOM, N.; MACK, D.; GÖTZ, F. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming Staphylococcus epidermidis. **Molecular Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 1083-1091, 1996.

HENNEKINNE, J.-A.; DE BUYSER, M.-L.; DRAGACCI, S. Staphylococcus aureus and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 36, n. 4, p. 815-836, 2012.

HERRERO, M. H.; SAQUS, M.; GEREZ, H.; VENTURA, P. Halotolerant and halophilic bacteria isolated during the ripening of salted products. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 318-323, 2003.

HO, C.-M.; LI, C.-Y.; HO, M.-H.; LIN, C.-Y.; LIU, S.-H.; LU, J.-J. High rate of qacA- and qacB positive methicilinn-resistant Staphylococcus aureus isolates from chlorhexidine-impregnated catheter-related bloodstream infections. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v. 56, n. 1, p. 5693-5697, 2012.

HUSS, H. H. Control of indigenous pathogenic bacteria in seafood. **Food Control**, v. 8, n. 2, p. 91-98, 1997.

JENSEN, L. B.; FRIMODT-MÖLLER, N.; AARESTRUP, F. M. Presence of erm gene classes in Gram-positive bacteria of animal and human origin in Denmark. **FEMS Microbiology Letters**, v. 31, p. 60-158, 1999.

KAATZ, G. W.; FIONNUALA, M. A.; SUSAN, M. S. Multidrug Resistance in Staphylococcus aureus Due to Overexpression of a Novel Multidrug and Toxin - Extrusion (MATE) Transport Protein. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 5, p. 1857-1864, 2005.

KEROUANTON, A.; HENNEKINNE, J. A.; LETERTRE, C.; PETIT, L.; CHESNEAU, O.; BRISABOIS, A.; DE BUYSER, M. L. Characterization of Staphylococcus aureus strains associated with food poisoning outbreaks in France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, v. 369-375, 2007.

KERRN, M. B.; KLEMMENSEN, T.; ESPERSEN, F. Susceptibility of Danish Escherichia coli strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia , and

distribution of sul genes conferring sulphonamide resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 513-516, 2002.

KOGAN, G.; SADOVSKAYA, I.; CHAIGNON, P.; CHOKR, A.; JABBOURI, S. Biofilms of clinical strains of Staphylococcus that do not contain polysaccharide intercellular adhesin. FEMS Microbiology Letters, v. 255, n. 1, p. 11–16, 2006.

KÖSE, S. Evaluation of seafood safety health hazards for traditional fish products: preventive measures and monitoring issues. **Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 10, p. 139-160, 2010.

KUMAR, C. G.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, p. 9-27, 1998.

KURODA, M.; TANAKA, Y.; AOKI, R.; SHU, D.; TSUMOTO, K.; OHTA, T. Staphylococcus aureus giant protein Ebh is involved in tolerance to transient hyperosmotic pressure. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 374, n. 2, p. 237-241, 2008.

LAKSHMANAN, R.; SHAKILA, R. J.; JEYASEKARAM, G. Changes in the halophilic amine forming bacterial flora during salt-drying of sardines (Sardinella gibbosa). **Food Research International**, v. 35, p. 541-546, 2002.

LAWRYNOWICZ-PACIOREK, M.; KOCHMAN, M.; PIEKARSKA, K.; GROCHOWSKA, A.; WINDYGA, B. The distribution of enterotoxin and enterotoxin-like genes in Staphylococcus aureus strains isolated from nasal carriers and food samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 117, p. 319-323, 2007.

LE LOIR, Y.; BARON, F.; GAUTIER, M. Staphylococcus aureus and food poisoning (Review). **Genetic and Molecular Research**, v. 2, n. 1, p. 63-76, 2003.

LEELAPORN, A.; PAULSEN, I. T.; TENNENT, J. M.; LITTLEJOHN, T. G.; SKURRAY, R. A. Multidrug resistance to antiseptics and disinfectants in coagulase-negative staphylococci. **Journal of Medical Microbiology**, v. 40, p. 214–220, 1994.

LI, Q.; SHERWOOD, J. S.; LOGUE, C. M. Antimicrobial resistance of Listeria spp. recovered from processed bison. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p. 86-91, 2007.

LINA, G.; BOHACH, G. A.; NAIR, S.P.; HIRAMATSU, K., JOUVIN-MARCHE, R.; MARIUZZA, R. Standard nomenclature for the superantigens expressed by Staphylococcus. **Journal of Infection Diseases**, v. 189, p. 2334–2336, 2004.

LIU, Q.; ZHAO, H.; HAN, L.; SHU, W.; WU, Q.; NI, Y. Frequency of biocide-resistant genes and susceptibility to chlorhexidine in high-level mupirocin-resistant, methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MuH MRSA). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 82, n. 4, p. 278–283, 2015.

LUPPENS, S. B. I.; REJI, M. W.; VAN DER HEIJDEEN, R. W. L.; ROMBOUTS, F. M.; ABEE, T. Development of standard test to asses the resistance of

Staphylococcus aureus biofilm cells to disinfectants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 4194-4200, 2002.

MACK, D.; FISHER, W.; KROKOTSCH, A.; LEOPOLD, K.; HARTMANN, R.; EGGE, H.; LAUFS, R. The intercellular adhesin involved in biofilm accumulation of Staphylococcus epidermidis is a linear beta-1,6-linked glucosaminoglycan: purification and structural analyses. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 1, p. 175-183, 1996.

MAIRA-LITRÁN, T.; KROPEC, A.; ABEYGUNAWARDANA, C.; JOYCE, J.; MARK, G.; GOLDMANN, D. A.; PIER, G. B. Immunochemical properties of the staphylococcal poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p. 4433-4440, 2002.

MARQUES, S. C.; REZENDE, J. das G. O. S.; ALVES, L. A. de F.; SILVA, B. C.; ALVES, E.; ALVES, L. R. de; PICCOLI, R. H. Formation of biofilms by Staphylococcus aureus on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 538-543, 2007.

MARTINEAU, F.; PICARD, F. J.; GRENIER, L.; ROY, P. H.; OUELLETTE, M.; TRIAL, E.; BERGERON, M. G. Multiplex PCR assays for the detection of clinically relevant antibiotic resistance genes in staphylococci isolated from patients infected after cardiac surgery. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, p. 527-533, 2000.

MATTEWS, K. R.; ROBERSON, J.; GILLESPIE, B. E.; LUTHER, D. A.; OLIVER, S.P., MATTEWS, K. R. R. J. Identification and Differentiation of Coagulase-Negative Staphylococcus aureus by Polymerase Chain Reaction. **Journal of Food Protection**, v. 60, p. 686-688, 1997.

McDANEL, J. S.; COURTNEY, R. M.; DIEKEMA, D. J.; QUAN, V.; KIM, D. S.; PETERSON, E. M.; EVANS, K. D.; TAN, G. L.; HAYDEN, M. K.; HUANG, S. S. Chlorhexidine and Mupirocin Susceptibilities of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus from Colonized Nursing Home Residents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 552-558,2013.

McDONNELL, G.; RUSSEL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 147-179, 1999.

MEJLHOLM, O.; KJELDGAARD, J.; MODBERG, A.; VEST, M. B.; BOKNAES, N.; KOORT, J.; BJÖRKROTH, J.; DALGAARD, P. Microbial changes and growth of Listeria monocytogenes during chilled storage of brined shrimp (Pandalus borealis). **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, p. 250-259, 2008.

MEREGHETTI, L.; QUENTIN, R.; MEE, N. M.; DER AUDURIER, A. Low Sensitivity of Listeria monocytogenes to Quaternary Ammonium Compounds. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 5083–5086, 2000.

MEYER, B.; COOKSON, B. Does microbial resistance or adaptation to biocides create a hazard in infection prevention and control? **Journal of Hospital Infection**, v. 76, p. 200-205, 2010.

MILSTONE, A. M.; PASSARETTI, C. L.; PERL, T. M. Chlorhexidine: expanding the armamentarium for infection control and prevention. **Clinical Infection Disease**, v. 46, p. 274–281, 2008.

MITCHELL, B. A.; BROWN, M. H.; SKURRAY, R. A. QacA multidrug efflux pump from Staphylococcus aureus: comparative analysis of resistance to diamidines, biguanidines, and guanylhydrazones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 475-477, 1998.

MORETRO, T.; HERMANSEN, L.; HOLCK, A. L.; SIDHU, M. S.; RUDI, K.; LANGSRUD, S. Biofilm formation and the presence of the intercellular adhesion locus ica among Staphylococci from food and food processing environments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5648-5655, 2003.

MORTON, L. H. G.; GREENWAY, D. L. A.; GAYLARDE, C. C.; SURMAN, S. B. Consideration of some implications of the resistance of biofilms to biocides. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 41, n. 3/4, p. 247-259, 1998.

NAKIPOGLU, Y.; IGNAK, S.; GÜRLER, N.; GÜRLER, B. The prevalence of antiseptic resistance genes (qaca/b and smr) and antibiotic resistance in clinical Staphylococcus aureus strains. **Mikrobiyoloji bülteni**, v. 46, n. 2, p. 180-189, 2012.

NORMANNO, G.; SALANDRA, G. La; DAMBROSIO, A.; QUAGLIA, N. C.; CORRENTE, M.; PARISI, A.; SANTAGADA, G.; FIRINU, A.; CRISETTI, E.; CELANO, G. V. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic Staphylococcus aureus isolated from meat and dairy products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, p. 290-296, 2007.

OBDAIT, M. M.; SALMAN, A. E. B.; LAFI, S. Q.; Prevalence of Staphylococcus aureus in imported fish and correlations between antibiotic resistance and enterotoxigenicity. **Journal of Food Protection**, v. 78, n. 11, p.1999-2005, 2015.

OMOE, K.; HU, D. -L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 6088‑6094, 2003.

OMOE, K.; HU, D. -L.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; SHINAGAWA, K. Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in Staphylococcus aureus isolates. **FEMS Microbiology Letters**, v. 246, p. 191-198, 2005.

ORTEGA, E.; ABRIOUEL, H.; LUCAS, R.; GÁLVEZ, A. Multiple roles os Staphylococcus aureus enterotoxins: pathogeniciy, superantigenic activity, and correlation to antibiotic resistance. **Toxins (Basel)**, v. 2, n. 8, p. 2117-2131, 2010.

OTTO, M. Staphylococcal biofilms.**Current Topics in Microbiology and Imunnology**, v. 322, p. 207-228, 2008.

PANG, Y.; BOSCH, T.; ROBERTS, M. C. Single polimerase chain reaction for the detection of tetracycline-resistant determinants Tet K and Tet L. **Molecular and Cellular Probes**, v. 8, p. 417-422, 1994.

PEDRO, S.; ALBUQUERQUE, M. M.; NUNES, M. L.; BERNARDO, M. Pathogenic bacteria and indicators in salted cod (Gadus morhua) and desalted products at low and high temperatures. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 13, n. 3, p. 39-48, 2004.

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

PESAVENTO, G.; DUCCI, B.; COMODO, N.; LO NOSTRO, A. Antimicrobial resistance profile of Staphylococcus aureus isolated from raw meat: A research of methicillin resistant S. aureus (MRSA). **Food Control**, v. 18, p. 196-200, 2007.

PIMENTEL-FILHO, N. de J.; MARTINS, M. C. de F.; NOGUEIRA, G. B.; MANTOVANI, H. C.; VANETTI, M. C. D. Bovicin HC5 and nisin reduce Staphylococcu aureus adhesion to polydtyrene and change the hydrophobicity profile and Gibbs free Energy of adhesion. **International Journal of Food Microbiology**, v. 190, p. 1-8. 2014.

PINCHUK, I. V.; BESWICK, E. J.; REYES, V. E. Staphylococcal enterotoxins. **Toxins(Basel)**, v. 2, 2177-2197, 2010.

PUAH, S. M.; CHUA, K. H.; TAN, J. A.. M. A. Virulence factors and antibiotic susceptibility of Staphylococcus aureus isolates in ready-to-eat foods: Detection of S. aureus contamination and a high prevalence of virulence genes. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, p. 199, 2016.

RODE, T. M; LANGSRUD, S.; HOLCK, A.; MORETRO, T. Different patterns of biofilm formation in Staphylococcus aureus under food-related stress conditions.**International Journal of Food Microbiology**, v. 116, p. 372-383, 2007.

ROSSONI, E. M. M.; GAYLARDE, C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 81-85, 2000.

SCHMITT, M.; SCHULER-SCHMID, U.; SCMIDT-LORENZ, W. Temperature limits of growth, TNase, and enterotoxin production of Staphylococcus aureus strains isolated from food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 11, p. 1-19, 1990.

SCHWABE, M.; NOTERMANS, S.; BOOT, R.; TATINI, S. R.; KRÄMER, J. Inactivation od staphylococcal enterotoxins by heat and reactivation by high pH treatment. **International Journal of Food Microbiology**, v. 10, p. 33-42, 1990.

SCYBERT, S.; PECHOUS, R.; SITTHISAK, S.; NADAKAVUKAREN, M. J.; WILKINSON, B. J.; JAYASWAL, R. K. NaCl-sensitive mutant of Staphylococcus aureus has a Tn917-lacZ insertion in its ars operon. **FEMS Microbiology Letters**, v. 222, n. 2, p. 171-176, 2003.

SHAMSUDIN, M. N.; ALRESHIDI, M. A.; HAMAT, R. A.; ALSHARI, A. S.; ATSHAN, S. S.; NEELA, V. High prevalence of qaca/b carriage among clinical isolates of meticillin-resistant Staphylococcus aureus in malaysia. **Journal of Hospital Infection**, v. 81, n. 3, p. 206-208, 2012.

SHELDON JR, A. T. Antiseptic “resistance”: real or perceived threat? **Clinical Infection Disease**, v. 40, p. 1650-1656, 2005.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. de A.; TANIWAKI, M. H.; GOMES, R. A. R.; OKAZAKI, M. M. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. São Paulo: Livraria Varela, 2010. 4ed.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.; VIEIRA, M. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, p. 573-583, 2010.

SIMON, S. S.; SANJEEV, S.Prevalence of enterotoxigenic Staphylococcus aureus in fishery products and fish processing factory workers.**Food Control**, v. 18, p. 1565-1568, 2007.

STEENACKERS, H. P. L.; ERMOLATEV, D. S.; SAVALIYA, B.; WEERDT, A.; DE COSTER, D.; SHAH, A.; VAN DER EYCKEN, E. V.; DE VOS, D. E.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S. C. J. Structure–activity relationship of 2-hydroxy-2-aryl-2,3-dihydroimidazo [1,2-a]pyrimidinium salts and 2N-substituted 4(5)-aryl-2-amino-1H-imidazoles as inhibitors of biofilm formation by Salmonella Typhimurium and Pseudomonas aeruginosa. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 3462-3473, 2011.

STEPANOVIC, S.; VUCOVIC, D.; HOLA, V.; DI BONAVENTURA, G.; DJUKIC, S.; ĆIRKOVIC, I.; RUZICKA, F. Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Journal Compilation**, v. 115, p. 891-899, 2007.

STROMMENGER, B.; KETTLITZ, C.; WERNER, G. Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in Staphylococcus aureus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 4089-4094, 2003.

SUTCLIFFE, J.; GREBE, T.; TAIT-KAMRADT, A.; WONDRACK, L. Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 40, p. 2562-2566, 1996.

TAHERI, N.; ARDEBILI, A.; AMOUZANDEH-NOBAVEH, A.; GHAZNAVI-RAD, E. Frequency of antiseptic resistance among Staphylococcus aureus and coagulase-negative Staphylococcu isolated from a University Hospital in Central Iran. **Oman Medical Journal**, v. 31, n. 6, p. 426-432, 2016.

THORARINSDOTTIR, K. A.; ARASON, S.; BOGASON, S. G.; KRISTBERGSSON, K. The effects of various salt concentrations during brine curing of cod (Gadus morhua). **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, p. 79-89, 2004.

TIMSIT, J. F.; SCHWEBEL, C.; BOUADMA, L.; GEFFROY, A.; GARROUSTE-ORGEAS, M.; PEASE, S.; HERAULT, M. C.; HAOUACHE, H.; CALVINO-GUNTHER, S.; GESTIN, B.; ARMAND-LEFEVRE, L.; LEFLON, V.; CHAPLAIN, C.; BENALI, A.; FRANCAIS, A.; ADRIE, C.; ZAHAR, J. R.; THUONG, M.; ARRAULT, X.; CROIZE, J.; LUCET, J. C. Chlorhexidine impregnated sponges and less frequent dressing changes for prevention of catheter-related infections in criticallyill patients: a randomized controlled trial. **Journal of American Medical Associaton**, v. 301, p. 1231-1241, 2009.

TODD, E. C.; GREIG, J. D.; BARTLESON, C. A.; MICHAELS, B. S. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 3.Factors contributing to outbreaks and description of outbreak categories.**Journal of Food Protection**, v. 70, p. 2199–2217, 2007.

TSAI, M.; OHNIWA, R. L.; KATO, Y.; TAKESHITA, S. L.; OHTA, T.; SAITO, S.; HAYASHI, H.; MORIKAWA, K. Staphylococcus aureus requires cardiolipin for survival under conditions of high salinity. **BioMedCentral Microbiology**, v. 11, n. 13, p. 1-12, 2011.

UEDA, S.; KUWABARA, Y. Susceptibility of biofilm Escherichia coli, Salmonella Enteritidis and Staphylococcus aureus to detergents and sanitizers.**Biocontrol Science**, v. 12, n. 4, p. 149-153, 2007.

VALLE, J.; TOLEDO-ARANA, A.; BERASAIN, C. M.; AMORENA, B.; PENADÉS, J. R.; LASA, I. SarA and not sigmaB is essential for biofilm development by Staphylococcus aureus. **Molecular Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1075-1087, 2003.

VAN-HOUDT, R.; MICHIELS, C. W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface.**Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 4, p. 1117-1131, 2010.

VASUDEVAN, P.; NAIR, M. K. M.; ANNAMALAI, T.; VENKITANARAYANAN, K. S. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of Staphylococcus aureus for biofilm formation.**Veterinary Microbiology**, v. 92, p. 179-185, 2003.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; LÓPEZ-CABO, M.; SAÁ-IBUSQUIZA, P.; RODRÍGUEZ-HERRERA, J. J. Incidence and characterization of Staphylococcus aureus in fishery products marketed in Galicia (Northwest Spain). **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, p. 286-296, 2012.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; HABIMANA, O.; HOLCK, A. Impact of food-related environmental factors on the adherence and biofilm formation of natural Staphylococcus aureus isolates.**Current Microbiology**, v. 66, p. 110-121, 2013.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; CABO, M. L.; IBUSQUIZA, P. S.; RODRÍGUEZ-HERRERA, J. J. Biofilm-forming ability and resistance to industrial disinfectants of Staphylococcus aureus isolated from fishery products. **Food Control**, v. 39, p. 8-16, 2014.

VICTORIA, E. J.; LIMA, M. O.; SANT'ANA, L. S. Determinação de atividade de água, umidade e sal em peixes salgados e secos importados. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 14, n. 2, p. 125-129, abr./jun. 2011.

VIJARANAKUL, U.; XIONG, A.; LOCKWOOD, K.; JAYASWAL, R. K. Cloning and nucleotide sequencing of a Staphylococcus aureus gene encoding a branchedchain-amino-acid transporter. **Applied Environmental Microbiology**, v. 64, n. 2, p. 763-767, 1998.

VISHWANATH, W.; LILABATI, H.; BIJEN, M. Biochemical, nutritional and microbiological quality of fresh and smoked mud eel fish Monopterus albus – a comparative study. **Food Chemistry**, v. 61, n. 1/2, p. 153-156, 1998.

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 Disease**, v. 52, n. 10, p. 1227-1230, 2011.

WIRTANEM, G.; HUSMARK, U.; MATTILA-SANDHOLM, T. Microbial evaluation of the biotransfer potencial from surfaces with Bacillus biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food processing systems. **Journal of Food Protection**, v. 59, n. 7, p. 727-733, 1996.

YARWOOD, J. M.; McCORMICK, J. K.; PAUSTIAN, M. L.; ORWIN, P. M.; KAPUR, V.; SCHLIEVERT, P. M. Characterization and expression analysis of Staphylococcus aureus pathogenicity island 3.Implications for the evolution of staphylococcal pathogenicity islands.**The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 13138–13147, 2002.

YE, J. Z.; YU, X.; LI, X. S.; SUN, Y.; LI, M. M.; ZHANG, W. et al. Antimicrobial resistance characteristics of and disinfectant resistant gene distribution in Staphylococcus aureus isolates from male urogenital tract infection. **Zhonghua nan Ke Xue**, v. 20, n. 7, p. 630-636, 2014.

YUAN, J. S.; ANN REED, A.; CHEN, F; STEWART C. N. Statistical analysis of real-time PCR data. **BMC Bioinformatics**, p. 1 – 12, 2006.