

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

ANA ERUNDINA DE LUNA MORAES LEITE

**Pesquisa de *Staphylococcus* coagulase negativa em utensílios e queijos
mussarela fatiados comercializados em Garanhuns-PE e sua capacidade de
formar biofilme**

Recife – PE

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIA ANIMAL

ANA ERUNDINA DE LUNA MORAES LEITE

Pesquisa de *Staphylococcus* coagulase negativa em utensílios e queijos mussarela fatiados comercializados em Garanhuns-PE e sua capacidade de formar biofilme

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Biociência Animal.

Área de Concentração: Biotecnologia na Linha de Microbiologia Aplicada.

Orientadora: Dra. Elizabeth Sampaio de Medeiros - UFRPE

Co-orientador: Dr. Marcelo Mendonça - UFRPE/UAG

RECIFE – PE

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

L533p Leite, Ana Erundina de Luna Moraes
Pesquisa de *Staphylococcus* coagulase negativa em utensílios e queijos mussarela fatiados comercializados em Garanhuns-PE e sua capacidade de formar biofilme / Ana Erundina de Luna Moraes Leite. – 2019.

50 f. : il.

Orientadora: Elizabeth Sampaio de Medeiros.

Coorientador: Marcelo Mendonça.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal, Recife, BR-PE, 2019.

Inclui referências.

1. *Staphylococcus* 2. Intoxicação alimentar – Garanhuns (PE)
3. Derivados do leite 4. Alimentos - Contaminação 5. Queijo – Garanhuns (PE) I. Medeiros, Elizabeth Sampaio de, orient.
- II. Mendonça, Marcelo, coorient. III. Título

CDD 636.089

ANA ERUNDINA DE LUNA MORAES LEITE

Pesquisa de *Staphylococcus* coagulase negativa em utensílios e queijos mussarela fatiados comercializados em Garanhuns-PE e sua capacidade de formar biofilme

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Biociência Animal.
Área de Concentração: Biotecnologia na Linha de Microbiologia Aplicada.

APROVADA em 25 de fevereiro de 2019

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Elizabeth Sampaio de Medeiros
Departamento de Medicina Veterinária – UFRPE
(Orientadora)

Prof. Dr. Marcelo Mendonça
Curso de Medicina Veterinária
Unidade Acadêmica de Garanhuns – UAG/UFRPE
(Membro Titular)

Prof^a. Dr^a. Elizabete Rodrigues da Silva
Curso de Medicina Veterinária
Unidade Acadêmica de Garanhuns – UAG/UFRPE
(Membro Titular)

DEDICATÓRIA

Dedico todo o empenho e o fruto do meu mestrado à minha super mãe, Ana Lúcia de Luna Moraes, por ter plantado e constantemente regado a semente da educação em mim e em todos aqueles que a cercavam. Este é um sonho nosso!

“Se um arco-íris ou uma flor desabrochando fizessem som,
esse seria o som do riso dela”

(Autor Desconhecido)

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial e com todo o meu amor, ao meu Deus, que por várias vezes me fez forte, diante de toda minha fraqueza mortal. Ele é o meu alicerce.

Agradeço à minha mãe, Ana Lúcia de Luna Moraes, que esteve sempre presente comigo, nesses dois anos de caminhada. Ainda que longe, foram os momentos em que ela esteve mais perto. Agradeço aos meus irmãos Versiany Moraes e Hugo César Moraes, e as minhas sobrinhas Pietra Moraes e Ana Flor Moraes, pela família que fomos, somos e sempre seremos. Obrigada, amo vocês! Agradeço ao meu amor, Claudio Paiva, pelo companheirismo, carinho e incentivo, meu presente diário.

Agradeço à minha orientadora, Elizabeth Sampaio, por ter possibilitado que eu realizasse esse sonho. Agradeço aos meus professores, Marcelo Mendonça e Elizabete Rodrigues, pelos ensinamentos e paciência que dedicaram à mim. Vocês foram fundamentais para a conclusão desta etapa da minha vida, cada um de uma forma especial.

Agradeço aos colegas de laboratório, mestrandos, estagiários e funcionários, Lúcia Macêdo, Aline Raaby, Kallyane Lira, Matheus Galindo, Amanda Lucas, Cíntia Luna, Lorena Galdino, Nataly Sayonara, Órion Silva, Enoana D'arc, Andriele Farias, Isabele Alencar, Sr. Cláudio Júlio da Silva, Sr. Jair Rodrigues e demais, pela companhia e auxílio diário, até mesmo em um bom dia gentil.

Agradeço à Vigilância Sanitária de Garanhuns e ao Instituto de Tecnologia de Pernambuco, pelo apoio dado à realização de toda a pesquisa desenvolvida ao longo do mestrado.

Agradeço a todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste momento.

Meu muito obrigada!

EPÍGRAFE

Tenha fé em si mesmo, porque Deus habita dentro de você.

Portanto, ter fé em si mesmo é ter fé em Deus.

Tenha confiança em suas capacidades, e caminhe sem temer os obstáculos.

Você vai vencer!

Você VAI VENCER!

Corresponda à confiança que Deus depositou em você, quando lhe entregou as capacidades de que dispõe, para que você as desenvolvesse e pusesse em prática.

(Minutos de Sabedoria)

RESUMO:

Staphylococcus coagulase negativa (SCN) são bactérias encontradas em produtos de origem animal como contaminantes, capazes de produzir biofilmes e também enterotoxinas. O objetivo deste estudo foi investigar a presença dos genes de enterotoxinas *sea*, *seb*, *sec* e *sed* e a capacidade de formar biofilmes por isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa em queijos Mussarela fatiados e fatiador de frios provenientes de panificadoras, mercados e minimercados da cidade de Garanhuns-PE. De um total de 85 isolados de SCN foram identificadas nove espécies bacterianas, sendo as mais frequentes: *Staphylococcus* (*S.*) *saprophyticus* 22 (25,9%), *S. xylosus* 14 (16,5%) e *S. cohnii* subsp. *urealyticum* 7 (8,2%). Não houve diferença significativa entre as espécies encontradas nas amostras de queijo Mussarela e nas superfícies dos fatiadores de frios. Desse total, 41 (48,2%) foram produtores de biofilme e 44 (51,8%) não produziram biofilme, com a maior frequência de detecção nas espécies *S. saprophyticus* e *S. cohnii* subsp. *urealyticum*. Os produtores de biofilme foram ainda, classificados como fraco produtores (61,0%), moderado produtores (22,0%) e forte produtores (17,0%). Quanto à presença de genes *sea*, *seb*, *sec* e *sed*, codificadores para enterotoxinas SEA, SEB, SEC e SED, respectivamente, em nenhum isolado foi detectada a presença destes genes. Mesmo com a ausência dos genes codificadores para enterotoxinas pesquisados nos isolados de SCN, estas espécies constituem importante fonte epidemiológica, pois além de apresentarem altas contagens nas amostras, o que indica uma má qualidade microbiológica, uma vez que são indicadores de contaminação, foram capazes de produzir biofilmes. Além disso, diferentes autores têm documentado a presença de genes para enterotoxinas nesse grupo de microrganismos. Assim pode-se concluir que os queijos Mussarela e os fatiadores de frios alvos deste estudo, estavam contaminados com SCN produtores de biofilme e que não possuem a presença dos genes de enterotoxinas clássicas estudadas. Entretanto ressalta-se a necessidade da aplicação de boas práticas de manipulação e higienização, uma vez que esse grupo bacteriano é um importante indicador da qualidade dos alimentos.

Palavras-chave: *Staphylococcus* spp., intoxicação alimentar, produto lácteo, persistência, contaminação.

ABSTRACT

Coagulase-negative *Staphylococci* (CNS) are bacteria found in animal products as contaminants, and also capable of producing biofilms. The objective of this study was to identify CNS species in sliced mozzarella cheeses and cold-cut slicers from bakeries, markets and mini-markets of the city of Garanhuns-PE. Moreover, investigate the ability to form biofilms and the presence of enterotoxin genes *sea*, *seb*, *sec* and *sed* in the isolated bacteria. Nine bacterial species were identified from a total of 85 CNS isolates, with the most frequent being *Staphylococcus* (*S.*) *saprophyticus* 22 (25.9%), *S. xylosus* 14 (16.5%) and *S. cohnii* subsp. *urealyticum* 7 (8.2%). There was no significant difference between the species found in the samples of Mozzarella cheese and on the surfaces of cold-cut slicers. Of these, 41 (48.2%) were biofilm producers and 44 (51.8%) did not produce biofilms, with the highest detection frequency in *S. saprophyticus* and *S. cohnii* subsp. *urealyticum*. The biofilm producers were also classified as weak producers (61.0%), moderate producers (22.0%) and strong producers (17.0%). Regarding of *sea*, *seb*, *sec* and *sed* genes, enterotoxin encoders of SEA, SEB, SEC and SED respectively, the presence of these genes was not detected in the isolates. Even with the absence of enterotoxin encoding genes in CNS isolates, these species constitute an important epidemiological source, as they had high counts in the samples, indicating a poor microbiological quality, once they are considered indicators of contamination, it were able to produce biofilms. In addition, several authors have documented the presence of enterotoxin genes in this group of microorganisms. Thus, it can be concluded that the Mozzarella cheeses and the cold-cut slicers of this study were contaminated with CNS producing biofilms and did not carry the classical enterotoxin genes studied. However, the needed to apply good handling and hygiene practices is emphasized, since this bacterial group is an important indicator of the food quality.

Key-words: *Staphylococcus* spp., food poisoning, dairy product, persistence, contamination.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Características dos queijos em geral	14
2.2 Características do queijo Mussarela	15
2.3 Caracterização de <i>Staphylococcus</i> spp.	16
2.4 Importância dos <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa na contaminação de alimentos	18
2.5 Intoxicação alimentar estafilocócica	21
2.6 Enterotoxinas estafilocócicas	21
2.7 Formação de biofilmes	24
2.8 Biofilmes de <i>Staphylococcus</i> spp. na indústria de alimentos	27
3. OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo geral	29
3.2 Objetivos específicos	29
4. REFERÊNCIAS	30
5. ARTIGO CIENTÍFICO	33
Resumo	34
Introdução	35
Material e Método	36
Resultados e Discussão	40
Conclusão	46
Referências	47
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	50

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO CIENTÍFICO

Figura 1. Amplificação dos genes 16S (1), sea (2), seb (3), sec (4), sed (5) e o controle negativo (6)	43
Figura 2. Amostras de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa produtoras e não produtoras de biofilme, isoladas de queijo mussarela e superfície de fatiadores	44
Figura 3. Classificação de amostras de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa quanto a produção de biofilme	44
Figura 4. Método de microtitulação em placas de poliestireno mostrando isolados não produtores, fraco, moderado e fortes produtores de biofilme diferenciados pela coloração com cristal violeta 0,5%	45

LISTA DE TABELAS

ARTIGO CIENTÍFICO

Tabela 1. Primers utilizados na identificação de genes codificadores para enterotoxinas estafilocócicas (SE) e para identificação do gênero <i>Staphylococcus</i>	40
Tabela 2. Frequência absoluta e relativa de espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa isoladas de amostras de queijo Mussarela e da superfície de fatiadores	42
Tabela 3. Presença de biofilme de acordo com as espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativa	45

1. INTRODUÇÃO

O queijo, principal derivado do leite, é produzido a partir de leite fermentado e possui uma variedade de formas e sabores a depender da espécie produtora do leite e forma de fabricação (LAMICHHANE; KELLY e SHEEHAN, 2018). O queijo Mussarela é um dos mais produzidos e consumidos em todo o mundo, inclusive no Brasil, fazendo parte de diversos alimentos prontos para o consumo (do inglês *ready-to-eat*) (KOÇAK KIZANLIK e GÖKSOY, 2018). Inicialmente, o queijo Mussarela foi produzido apenas com leite de búfala, mas atualmente, ele é fabricado popularmente a partir de leite de vaca (JANA e MANDAL, 2011). Sua inocuidade é de grande importância para a saúde pública, já que é um produto implicado na contaminação por diferentes bactérias, inclusive as do gênero *Staphylococcus* (FRIEDRICZEWSKI et al., 2018).

Staphylococcus spp. são cocos Gram-positivos em forma de cachos, mesófilos, imóveis, catalase positiva, anaeróbicos facultativos e não formadores de endósporos (MORENTE; RUIZ e PULIDO, 2016). Vivem como comensais na pele e mucosas de animais, inclusive humanos; também podem ser isolados de alimentos e de equipamentos e utensílios utilizados na produção de alimentos (LEROY; VERMASSEN e TALON, 2016). São classificados em *Staphylococcus* coagulase positiva - SCP, onde o principal representante é *S. aureus*, já bem consolidado como um dos principais causadores de intoxicação alimentar; e *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) (PODKOWIK et al., 2013).

Esse gênero bacteriano possui a capacidade de formar biofilmes, facilitando a aderência e colonização das suas células às superfícies de manipulação de alimentos (DARWISH e ASFOUR, 2013; LIRA et al. 2016; FRIEDRICZEWSKI et al. 2018), além disso muitas espécies podem produzir potentes enterotoxinas que causam intoxicação alimentar, tornando os *Staphylococcus* enterotoxigênicos um grande perigo para a saúde pública (NUNES; AGUILA e PASCHOALIN, 2015).

Os SCN já são conhecidos pelo seu impacto positivo, como microrganismos promotores dos processos de fermentação e características sensoriais dos alimentos, principalmente nos fermentados, como os queijos (CHAJECKA-WIERZCHOWSKA et al., 2015), no entanto, por anos seu potencial patogênico nas infecções alimentares foi negligenciado, como fonte de enterotoxinas estafilocócicas

(SE) (KUREKCI, 2016), isso devido ao fato de que por muito tempo *S. aureus* ter sido considerado o único representante do gênero *Staphylococcus* capaz de produzir enterotoxinas (PODKOWIK et al., 2013).

O envolvimento de SE derivadas de SCN em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica ainda não está bem definido, porém há diversos estudos que apontam esta possibilidade, ao detectarem genes de enterotoxinas em espécies de SCN, mostrando seu potencial enterotoxigênico (CUNHA et al., 2006; VERAS et al., 2008; RALL et al., 2010; CHAJECKA-WIERZCHOWSKA et al., 2015; NUNES; AGUILA e PASCHOALIN, 2015; KUREKCI, 2016).

Diante da grande possibilidade de *Staphylococcus* coagulase negativa contaminar os alimentos de origem animal, principalmente aqueles sujeitos à manipulação em seu processo de fabricação e venda, justifica-se a pesquisa das formas de sobrevivência desse grupo bacteriano no ambiente de manipulação de queijos Mussarela, principalmente pela capacidade de *Staphylococcus* spp. em formar biofilmes, o que gera preocupação às autoridades competentes de fiscalização, devido à dificuldade em eliminar esta comunidade bem estruturada e resistente do ambiente. Além disso, há a possibilidade destas bactérias produzir potentes enterotoxinas, as quais podem levar a sérios prejuízos à saúde pública.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características dos queijos em geral

O queijo é o principal derivado do leite, sendo o nome genérico para um grupo de produtos alimentícios à base de leite fermentado, produzido em uma vasta gama de formas e sabores. As diversas características do queijo derivam das diferenças nas composições e tipos de leites, processos aplicados e microrganismos utilizados na fermentação (LAMICHHANE; KELLY e SHEEHAN, 2018). Há centenas de variedades de queijo produzidas, muitas delas sendo características de uma determinada região do mundo, onde este produto pode ser encontrado com as texturas macia, semi-dura e dura (FAO, 2018).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), queijo é o produto lácteo fresco ou maturado que se obtém por meio da separação parcial do soro em relação ao leite (ou leite reconstituído - integral, parcial ou totalmente desnatado) ou de soros lácteos, coagulados pela ação do coalho, de enzimas específicas produzidas por microrganismos específicos, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, todos de qualidade apta para uso alimentar, com ou sem adição de substâncias alimentícias, especiarias, condimentos ou aditivos (BRASIL, 2017).

Os queijos possuem diversos nutrientes, dentre eles lipídios (interferem no sabor e consistência do queijo), proteínas, minerais (como cálcio e fósforo) e vitaminas (principalmente as do complexo B, sobretudo B12 e B2), importantes para manutenção da saúde dos consumidores (EMATER, 2012). Os diferentes tipos de caseína, principais proteínas do leite, constituem o principal componente estrutural do queijo e estão presentes na forma de uma rede na matriz deste produto, na qual glóbulos de gordura, água, minerais e solutos dissolvidos, tais como: lactose, ácido láctico, sais solúveis e peptídeos, estão intercalados (LAMICHHANE; KELLY e SHEEHAN, 2018).

Como a maioria dos produtos de origem animal (POA), o queijo é altamente nutritivo e uma rica fonte para o desenvolvimento de microrganismos contaminantes, deteriorantes ou patogênicos, que causam danos econômicos e prejuízos à saúde do consumidor, no caso das infecções, intoxicações e toxinfecções (MARINHEIRO

et al., 2015; FRIEDRICZEWSKI et al., 2018). O consumo de queijo contaminado por microrganismos patogênicos pode levar a sérios problemas de saúde que podem ocasionalmente ser fatais para os consumidores. Por esta razão, é importante assegurar boas práticas na fabricação e comercialização deste produto (KOÇAK KIZANLIK e GÖKSOY, 2018).

2.2 Características do queijo Mussarela

O queijo Mussarela é uma variedade de queijo macio e não curado da família *Pasta-filata*, que teve sua origem na região de Battipaglia, na Itália. Convencionalmente, o queijo Mussarela foi feito a partir de leite de búfala, no entanto, atualmente, mesmo na Itália e em outros países europeus, e também no Brasil, está sendo fabricado a partir de leite de vaca (JANA e MANDAL, 2011). É um dos queijos mais fabricados e comercializados em todo o mundo, inclusive no Brasil e amplamente utilizado na culinária, no preparo de pratos quentes e sanduíches, devido as suas propriedades de fatiamento e facilidade de derretimento (COELHO et al., 2012; LAMICHHANE; KELLY e SHEEHAN, 2018).

Este tipo de queijo é obtido por filagem de uma massa acidificada, por meio de coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, completada ou não pela ação de bactérias lácticas específicas. Tem consistência semi-suave a suave, segundo o conteúdo de umidade, matéria gorda e grau de maturação; sua textura varia de fibrosa, elástica e fechada, com coloração branca a amarelada, uniforme; o sabor láctico, ligeiramente picante. Não possui crosta nem olhaduras, eventualmente poderá apresentar aberturas irregulares devido o processo de enformagem ainda com temperatura elevada (BRASIL, 1997; FAO, 2018).

Por ser um queijo altamente utilizado na fabricação de pizza e de diferentes alimentos prontos para o consumo (*ready-to-eat*), que não são submetidos a nenhum outro tratamento para garantir sua segurança antes do consumo (KOÇAK KIZANLIK e GÖKSOY, 2018), a inocuidade na fabricação e comercialização do queijo Mussarela torna-se de grande interesse à saúde pública, sendo então necessário que este se encontre dentro dos padrões microbiológicos estabelecidos

pela legislação vigente (BRASIL, 1997; 2001), a fim de evitar surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs).

Tendo em vista as características distintas do processo de elaboração do queijo Mussarela e sua classificação quanto ao teor de umidade e gordura variando entre um queijo de média, alta ou muito alta umidade e extragordo, gordo a semigordo, o mesmo deverá apresentar requisitos microbiológicos que se estabelecem na Portaria nº 364/1997, para coliformes a 30°C (máx. 5×10^3 UFC/g), *Staphylococcus* coagulase positiva (máx. 1×10^3 UFC/g) e para *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* ausência em 25g do produto; e na RDC 12/2001 para coliformes a 45°C (máx. 1×10^3 UFC/g - e máx. 5×10^2 UFC/g para queijos de muito alta umidade), *Staphylococcus* coagulase positiva (máx. 1×10^3 UFC/g g - e máx. 5×10^2 UFC/g para queijos de muito alta umidade), e *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* ausência em 25g do produto (BRASIL, 1997; 2001).

Staphylococcus spp. e coliformes fecais em queijo são frequentemente usados como indicadores de qualidade higiênica e mostram falta de segurança microbiológica (REGES et al., 2017).

A contaminação por bactérias deteriorantes e patogênicas neste derivado pode ocorrer devido à obtenção de uma matéria-prima de baixa qualidade microbiológica, deficiências na higiene de ordenha, refrigeração ineficiente e demora no tempo de entrega da matéria-prima à indústria (FAGNANI et al., 2013). Assim como, durante as várias fases do processo de beneficiamento e fabricação do produto, onde as superfícies dos equipamentos, utensílios e mãos dos trabalhadores podem estar mal higienizadas ao entrarem em contato com este produto (REGES et al., 2017). Além do pós-processamento, onde há o desafio no momento da comercialização devido ao transporte do produto sem refrigeração e venda de peças fatiadas ou fracionadas (KOÇAK KIZANLIK e GÖKSOY, 2018).

2.3 Caracterização de *Staphylococcus* spp.

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Staphylococcaceae* (SILVA et al., 2017). São cocos Gram-positivos, medindo de 0,5 a 1,0 μm , que formam arranjos em cachos; imóveis, catalase positiva, oxidase usualmente negativa, anaeróbicos

facultativos e não formadores de endósporos (MORENTE; RUIZ e PULIDO, 2016; KUREKCI, 2016). São bactérias mesófilas com temperatura de crescimento entre 7 e 47,8°C (ótimo - 30 a 37°C); pH variando de 4,2 e 9,3 (ideal de 7 a 7,5) e multiplicação em atividade de água (Aw) de 0,83 (ótimo >0,99). Este grupo de microrganismos ainda possui a capacidade de produzir enterotoxinas em concentrações de sal de até 10%, o que faz com que os alimentos curados também sejam veículos potenciais dessas bactérias (SANTANA et al., 2010; LAMPEL et al., 2012).

Staphylococcus são microrganismos ubíquos e amplamente distribuídos na natureza. Algumas espécies vivem como comensais na pele e nas membranas mucosas de animais de sangue quente e humanos, mas também podem ser isolados de fontes ambientais e de uma grande variedade de alimentos, como carne, queijo e leite, e de superfícies de utensílios, móveis e roupas (UDO et al., 1999; LEROY; VERMASSEN e TALON, 2016). Algumas espécies de *Staphylococcus* produzem potentes enterotoxinas, as quais são as principais causadoras de intoxicações alimentares em humanos (MORENTE; RUIZ e PULIDO, 2016).

De acordo com sua capacidade de coagular plasma de coelho, este gênero é classificado em dois grupos: *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) e *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) (PODKOWIK et al., 2013; KUREKCI, 2016). A coagulase é uma enzima que converte fibrinogênio em fibrina, formando um coágulo visível. A enzima pode ser encontrada em duas formas: a coagulase ligada ou “clumping factor” e a coagulase livre ou “clotting factor” (SILVA et al., 2017).

O principal SCP é *Staphylococcus aureus* (DUQUENNE et al., 2016; NUNES e CALDAS, 2017; SILVA et al., 2017). Outros SCP são *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus delphini*, *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* e *Staphylococcus hyicus*, espécies consideradas patógenos importantes devido à sua capacidade de produzir enterotoxinas, estando também associadas a surtos de intoxicação alimentar (MORENTE; RUIZ e PULIDO, 2016; FONTANA e FAVARO, 2018) e, por essa razão, a produção de coagulase é considerada uma indicação de patogenicidade entre as espécies de *Staphylococcus* (SILVA et al., 2017). As enterotoxinas produzidas por estes microrganismos são as causas mais frequentes

de intoxicação alimentar, com surtos causados pelo manuseio inadequado dos alimentos após o tratamento térmico (CUNHA et al., 2006; PODKOWIK et al., 2013).

Alguns SCN possuem um impacto positivo já conhecido sobre processos de fermentação e características sensoriais dos alimentos, especialmente em alimentos fermentados, como queijo e salsicha fermentada, dentre eles *S. xylosus*, *S. carnosus* e *S. equorum*, que contribuem também para o controle de bactérias deteriorantes e patogênicas (CHAJECKA-WIERZCHOWSKA et al., 2015; LEROY; VERMASSEN e TALON, 2016). Por muitos anos, *S. aureus* foi considerado o único representante do gênero *Staphylococcus* capaz de produzir enterotoxinas, por isso SCN eram considerados não patogênicos (PODKOWIK et al., 2013), e em testes laboratoriais de rotina, eles são muitas vezes identificados apenas no nível de gênero, enquanto as cepas positivas para coagulase são selecionadas para análises posteriores (CHAJECKA-WIERZCHOWSKA et al., 2015).

As espécies de ambos os grupos de SCP e SCN, podem produzir uma variedade de infecções em humanos e em animais de companhia e de fazenda e uma característica fenotípica relevante de algumas cepas é a capacidade de formar biofilmes, tornando-as mais resistentes frente a meios hostis e favorecendo sua multiplicação (MORENTE; RUIZ e PULIDO, 2016).

2.4 Importância dos *Staphylococcus* coagulase negativa na contaminação de alimentos

A contaminação de alimentos por *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) costumava ser consideravelmente menos importantes devido às suas características não patogênicas quando comparados com *S. aureus* e, por muito tempo, foram negligenciados quanto a ser fonte de enterotoxinas (SEs) destacadas em intoxicações alimentares (KUREKCI, 2016; MORENTE; RUIZ e PULIDO, 2016).

Pouco se sabe sobre o envolvimento de SEs derivadas de SCN em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica. Porém, estudos realizados demonstram a importância desse grupo para a saúde pública, sendo comumente encontrados em alimentos de origem animal. Diferentes espécies desses microrganismos foram relatados, como por exemplo *Staphylococcus saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S.*

capitis subsp. *urealyticus*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. carnosus*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. equorum*, *S. lentus*, *S. gallinarum*, *S. piscifermentans*, *S. simulans* e *S. xylosus* (UDO et al., 1999; CUNHA et al., 2006; VERAS et al., 2008; RALL et al., 2010; CHAJECKA-WIERZCHOWSKA et al., 2015; NUNES; AGUILA e PASCHOALIN, 2015; KUREKCI, 2016).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) reconhecem os *Staphylococcus* coagulase positivos, especialmente *S. aureus*, como os únicos produtores de enterotoxinas estafilocócicas, tendo descrito limite máximo de bactérias em alimentos apenas para este grupo de *Staphylococcus* (BRASIL, 1997; 2001). No entanto, a presença de genes codificadores de enterotoxinas em espécies de SCN foi descrita por diversos autores.

Cunha et al. (2006) encontraram SCN em alimentos adquiridos em mercados locais e *delicatessens* na cidade de Botucatu, SP (Brasil). A espécie predominante foi *S. epidermidis*, mas também verificaram a presença de *S. xylosus*, *S. warneri*, *S. saccharolyticus* e *S. hominis*. A presença de genes *sea* e *sec-1*, codificadores para enterotoxinas foi determinada em quatro isolados (um *S. epidermidis*, dois *S. xylosus* e um *S. hominis*).

Em estudo realizado por Veras et al. (2008), foram obtidos 152 isolados de *Staphylococcus* spp. de laticínios, em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica em Minas Gerais, Brasil, entre os anos de 1998 a 2002. Desses, foram selecionados 15 isolados de SCP e 15 de SCN, os quais foram submetidos a PCR e a imunoenaios para detecção de *Staphylococcus* enterotoxigênicos. Dentre os 15 isolados de SCN, foram encontrados genes codificadores de enterotoxinas em 5 deles e 4 isolados foram positivos no imunoensaio, provando a produção *in vitro* de enterotoxinas por esse grupo de microrganismos.

Rall et al. (2010) encontraram SCN em 65 (72,2%) amostras de queijo Minas coletados de supermercados e lojas de produtos lácteos em Botucatu-SP. Constatou-se a presença de genes *sea*, *seb* e *sec*, para enterotoxinas estafilocócicas SEA, SEB e SEC em 17 (26,2%) isolados de SCN. No entanto, vale ressaltar que nenhum deles produziu enterotoxinas *in vitro*, pelo método de imunoensaio.

Em pesquisa realizada por Nunes; Aguila e Paschoalin (2015), para verificar a presença de espécies de SCN enterotoxigênicas, em salames comerciais e artesanais, no município do Rio de Janeiro (Brasil), foram isoladas 19 amostras pertencentes às espécies *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. xylosus*, *S. carnosus*, *S. succinus*, *S. epidermidis* e *S. hominis*, sendo que 15 isolados possuíam múltiplos genes de enterotoxinas. A enterotoxigenicidade das cepas também foi provada através de imunoenaios, onde foi confirmada a produção de enterotoxinas *in vitro*.

A presença de SCN não foi encontrada apenas em alimentos de origem animal. Udo et al. (1999), promoveram um estudo para pesquisar a presença de SCN nas mãos de manipuladores de alimentos de 50 restaurantes na cidade do Kuwait, e também a produção de enterotoxinas pelos isolados. Os autores detectaram que 11 isolados foram produtores de enterotoxinas, dentre eles *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. warneri* e *S. schleiferi*. A detecção de SCN enterotoxigênico em manipuladores de alimentos sugere que essas cepas podem contribuir para intoxicação alimentar se o alimento for contaminado e mantido em condições que permitam seu crescimento e produção das enterotoxinas.

Em trabalho realizado por Wang et al. (2018), utilizando 180 cortes de carne de frango crua obtidas de diversos supermercados, foi possível constatar a presença de SCN em 11,7% das amostras, no entanto, nenhum dos isolados desse microrganismo apresentou genes para enterotoxinas. Esse estudo contradiz os de outros autores (VERAS et al., 2008; RALL et al., 2010; NUNES; AGUILA e PASCHOALIN et al., 2015), mostrando a importância da realização de mais pesquisas acerca da potencialidade dos *Staphylococcus* coagulase negativa em causar intoxicação alimentar.

Alimentos frequentemente implicados em intoxicação alimentar estafilocócica incluem carne e produtos de carne; aves e ovoprodutos; saladas; produtos de padaria, como bolos recheados com creme, tortas de creme e chocolate; recheios de sanduíche; e leite e produtos lácteos; alimentos que requerem manuseio considerável durante a preparação e que são mantidos em temperaturas levemente elevadas - >7,2 °C (VERAS et al., 2008; MORENTE; RUIZ e PULIDO, 2016).

2.5 Intoxicação alimentar estafilocócica

A intoxicação alimentar estafilocócica é uma doença causada pela ingestão de enterotoxinas (SEs) pré-formadas nos produtos alimentícios, produzidas por bactérias do gênero *Staphylococcus*, sendo *S. aureus* o principal agente (NUNES e CALDAS, 2017). A doença ocorre devido à manipulação inadequada de alimentos, sendo necessários alguns fatores para que as SE causem doença nos indivíduos, tais como, quantidade de microrganismos e de toxinas pré-formadas no alimento, a susceptibilidade do indivíduo, o peso corporal e, especialmente, o estado de saúde da pessoa acometida, como também da quantidade de alimento contaminado ingerido (LAMPEL et al., 2012).

Os sintomas dessa intoxicação se iniciam agudamente, de 1 a 7 horas após a ingestão da toxina, com náuseas, vômitos, cólicas abdominais, diarreia e calafrios, com ou sem a presença de febre. Os sintomas adicionais incluem tonturas e mialgias. Embora a desidratação grave possa ocorrer, as condições clínicas são relativamente leves, a doença geralmente é autolimitada e regride em 24 a 48 horas com cuidados de suporte adequados. Pode ser grave às vezes, requerendo hospitalização devido a desidratação, cefaléia, sudorese e alteração da temperatura corporal, isso ocorre como resultado da quantidade ingerida e da suscetibilidade do indivíduo. Mortes são raras, no entanto, foram observadas entre crianças e idosos (VERAS et al., 2008; LAMPEL et al., 2012; PODKOWIK et al., 2013; DUQUENNE et al., 2016).

2.6 Enterotoxinas estafilocócicas

A intoxicação alimentar estafilocócica é uma das principais doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo (LEROY; VERMASSEN e TALON, 2016). Embora as enterotoxinas sejam produzidas principalmente por *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP), alguns *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) envolvidos em diversas infecções humanas e animais, também despertam interesse de pesquisadores que investigam a presença de genes de enterotoxinas em cepas de SCN isoladas de alimentos (CUNHA et al., 2006).

As enterotoxinas estafilocócicas (SEs) pertencem a uma família de superantígenos que foram originalmente identificados em *S. aureus*, sendo proteínas globulares extracelulares de cadeia simples, com pesos moleculares variando de 22 a 30 kDa, ricas nos aminoácidos lisina, ácido aspártico, ácido glutâmico e resíduos de tirosina (LAMPEL et al., 2012). São hidrossolúveis e resistentes à ação de enzimas proteolíticas do sistema digestivo, como pepsina e tripsina, permanecendo ativas após a ingestão (PODKOWIK et al., 2013). Sua produção ocorre durante toda fase do crescimento bacteriano, mas principalmente durante a fase exponencial (NUNES e CALDAS, 2017). Os genes que codificam essas SEs são encontrados em vários pontos genéticos como as ilhas de patogenicidade ou ilhas genômicas, e podem ser transportados por elementos genéticos móveis, como plasmídeos e fagos (DUQUENNE et al., 2016).

Outra característica importante das enterotoxinas estafilocócicas envolve a termoestabilidade, pois elas são resistentes a tratamentos térmicos que destruiriam *Staphylococcus* produtores destas enterotoxinas, além de outras condições ambientais, como congelamento, secagem e pH baixo, os quais não seriam capazes de destruí-las (MORENTE; RUIZ e PULIDO, 2016). As características do alimento e as condições de processamento podem diminuir ou matar as células bacterianas, entretanto, as enterotoxinas podem permanecer ativas (NUNES e CALDAS, 2017).

Até o momento, 23 ou mais SEs foram descritas, dentre elas as SEA, SEB, SEC, SED, SEE, SEG, SEH, SEI, SER e SET. No entanto, apenas a SEH e as cinco consideradas clássicas, SEA a SEE estão envolvidas na maioria das intoxicações alimentares estafilocócicas, onde as principais encontradas são a SEA e a SEB (DUQUENNE et al., 2016; LEROY; VERMASSEN e TALON, 2016). Os genes dessas duas enterotoxinas, *sea* e *seb*, são conhecidos por ocuparem o mesmo *locus* cromossômico, justificando o motivo pelo qual elas são comumente encontradas juntas nos surtos de intoxicação alimentar (VERAS et al., 2008). Há também várias SEs designadas como SE-like (SEL), uma vez que não possuem propriedades eméticas ou suas atividades eméticas ainda não foram identificadas (PODKOWIK et al., 2013).

A dose de SE capaz de causar intoxicação é inferior a 1,0 µg, nível de toxina que é atingido quando as populações de *Staphylococcus* excedem 100.000 organismos/g (10^5 UFC/g) em alimentos (DUQUENNE et al., 2016). Esta dose indica

condições inadequadas de higiene e que o produto pode ser prejudicial para a saúde. Em pessoas altamente sensíveis, a ingestão de 100 a 200 ng de enterotoxina pode causar sintomas de intoxicação alimentar estafilocócica (NUNES e CALDAS, 2017). Enterotoxinas estafilocócicas são estáveis no trato gastrointestinal e estimulam indiretamente o centro do reflexo emético através de eventos moleculares indeterminados. Acredita-se que o nervo vago esteja envolvido na sequência de eventos que produzem a resposta emética (LAMPEL et al., 2012).

Os diferentes métodos disponíveis para detecção e investigação de toxinas bacterianas em alimentos são baseados em bioensaios, técnicas imunológicas, biologia molecular e métodos baseados em espectrometria de massa (MORENTE; RUIZ e PULIDO, 2016). Uma vez que os imunoenaios requerem uma quantidade detectável de toxina, as técnicas moleculares podem ser complementares a estes, através da detecção de genes da enterotoxina estafilocócica como uma ferramenta importante no laboratório de microbiologia (CUNHA et al., 2006). A ferramenta molecular mais utilizada envolve a PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e detecta genes que codificam enterotoxinas em cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de alimentos contaminados (UDO et al., 1999; CUNHA et al., 2006; VERAS et al., 2008; RALL et al., 2010; NUNES; AGUILA e PASCHOALIN, 2015; MORENTE; RUIZ e PULIDO, 2016).

Algumas cepas de SCN isoladas de alimentos e pertencentes às espécies *Staphylococcus saprophyticus*, *S. haemolyticus*, *S. capitis* subsp. *urealyticus*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. carnosus*, *S. cohnii*, *S. epidermidis*, *S. equorum*, *S. lentus*, *S. gallinarum*, *S. piscifermentans*, *S. simulans* e *S. xylosus* foram descritas como sendo capazes de produzir enterotoxinas (CUNHA et al., 2006; VERAS et al., 2008; RALL et al., 2010; NUNES; AGUILA e PASCHOALIN, 2015; LEROY; VERMASSEN e TALON, 2016).

No estudo de Veras et al. (2008), foi constatado que as enterotoxinas mais frequentemente encontradas em SCN isolados de laticínios, foram a SEA, SEC e SED na identificação de genes por PCR, e SEA, SEB, SEC e SED, pelos imunoenaios. Rall et al. (2010) verificaram que em 17 cepas de SCN isolados de queijo Minas com presença de genes para enterotoxinas, o sea foi o mais frequentemente encontrado, seguido por sec em três e seb em duas cepas, enquanto o gene sed não foi encontrado. Apesar da presença destes genes de

enterotoxina, estas estirpes não produziram enterotoxinas *in vitro*. No trabalho de Nunes; Aguila e Paschoalin (2015), foi isolado SCN em salames de origem comercial e artesanal, onde também pesquisaram genes codificadores de enterotoxinas e detectaram os seguintes: *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seh*, *sei*, *sel* e comprovaram a produção de enterotoxinas *in vitro*.

A PCR é uma técnica utilizada na amplificação de genes para uma determinada característica, como a presença de genes que codificam para SEs, sendo assim, não fornece informações sobre a capacidade do microrganismo produzir a toxina biologicamente ativa ou a quantidade suficiente para causar doença (LAMPEL et al., 2012). Essa é uma consideração importante, pois os genes das enterotoxinas apresentam diferentes padrões de expressão e podem ser influenciados por fatores que afetam o crescimento e a sobrevivência do microrganismo, como pH, temperatura, atividade de água, potencial redox e fatores nutricionais (MORENTE; RUIZ e PULIDO, 2016). No entanto, tem sido sugerido que cepas contendo genes para certas toxinas devem ser consideradas potencialmente produtoras de toxinas, uma vez que sua capacidade de produzir toxinas em surtos reais de intoxicação alimentar não pode ser excluída (VERAS et al., 2008).

2.7 Formação de biofilmes

Os microrganismos possuem diversos mecanismos de defesa para sua permanência em ambientes adversos, favorecendo assim sua sobrevivência. Um desses mecanismos consiste da aderência a superfícies sólidas e úmidas e formação de um revestimento viscoso e escorregadio, onde se desenvolvem comunidades organizadas e com heterogeneidade funcional, o que caracteriza o biofilme (COSTERTON; STEWART e GREENBERG, 1999). Estas comunidades podem ser formadas por diversas espécies de microrganismos, bactérias e fungos, sendo este o biofilme heterogêneo, mais comumente encontrado, e com diferentes padrões de resistência ao estresse. Outros biofilmes podem ser constituídos apenas de um tipo de microrganismo, por exemplo, de bactérias, constituindo o biofilme homogêneo (BRIDIER et al., 2015; GOETZ et al., 2017).

Os biofilmes possuem células fortemente aderidas a superfícies, chamadas de sésseis, que podem dar origem a indivíduos não-sésseis, as bactérias planctônicas, estas podem se multiplicar rapidamente e se dispersarem (COSTERTON; STEWART e GREENBERG, 1999). As células sésseis apresentam um fenótipo, metabolismo, fisiologia e expressão gênica diferentes das células planctônicas (LIRA et al., 2016). Bactérias sésseis são mais resistentes aos antibióticos e sanitizantes do que sua forma planctônica, aumentando a probabilidade de sobrevivência e subsequente contaminação de alimentos (DARWISH e ASFOUR, 2013; SOUZA et al., 2014).

Os microrganismos mudam do estado planctônico para o estado do biofilme através de um mecanismo complexo e altamente regulado que é influenciado pelas condições ambientais, por exemplo, baixa disponibilidade de nutrientes e alta densidade populacional (GIAOURIS e SIMÕES, 2018). Além disso, muitas bactérias controlam seu metabolismo por meio de um processo chamado *quorum sensing* - QS (BRIDIER et al., 2015), um dos principais sistemas reguladores que controlam a expressão de virulência em *Staphylococcus*, no qual as células se comunicam sintetizando, detectando e respondendo a pequenas moléculas de sinalização solúveis chamadas autoindutoras ou feromônios bacterianos (DUQUENNE et al., 2016).

Duas etapas estão envolvidas no processo de formação do biofilme: 1. a aderência inicial das células bacterianas planctônicas a uma superfície, que desencadeia uma adesão reversível (BRIDIER et al., 2015) e 2. a adesão intercelular, onde há o acúmulo de bactérias dependentes do crescimento em aglomeração, formando as multicamadas celulares (MELO et al., 2012).

Inicialmente as bactérias aderem a uma superfície, mediada por um antígeno capsular específico de alto peso molecular, que tem a mesma função da cápsula bacteriana e intervém na aderência inicial das bactérias, o polissacarídeo capsular/adesina (PS/A) que é descrito como componente da superfície celular e da camada do biofilme protegendo as bactérias. Em seguida, as bactérias se multiplicam para formar um biofilme de múltiplas camadas, que foi associado à produção de adesina intercelular polissacarídica (PIA) (DARWISH e ASFOUR, 2013; LIRA et al., 2016). O final desse ciclo é a dispersão celular, em que as bactérias são capazes de se separar ativamente da comunidade e iniciar um novo ciclo de

colonização em um novo habitat, sendo os sinais do QS frequentemente envolvidos neste processo ativo (BRIDIER et al., 2015).

As estruturas que se formam nos biofilmes contêm canais nos quais os nutrientes podem circular e nutrir as bactérias ali presentes, além de eliminar os produtos do metabolismo bacteriano (COSTERTON; STEWART e GREENBERG, 1999). A espessura e a composição do biofilme têm um papel importante em sua funcionalidade, a complexa matriz polimérica dos biofilmes maduros atua como um “escudo”, o qual reduz ou bloqueia a difusão de antibióticos e sanitizantes (BRIDIER et al., 2015). Uma matriz polimérica mais espessa pode tornar mais difícil a penetração desses agentes no biofilme (GOETZ et al., 2017).

O aumento da resistência dos microrganismos em um biofilme a agentes antimicrobianos e sanitizantes pode ser devido a limitações à difusão livre de agentes antimicrobianos através da matriz do biofilme; a variabilidade nos microambientes físicos e químicos dentro do biofilme (por exemplo, condições variadas de pH, força osmótica ou nutrientes), levando a níveis variados de atividade metabólica das células do biofilme e também à alteração da eficiência do sanitizante (FRIEDRICZEWSKI et al., 2018); a respostas adaptativas ao estresse, resultantes de mutações, expressão gênica alterada e também através de possível transferência horizontal de genes codificadores de resistência; e a diferenciação de células bacterianas em estados fisiológicos menos suscetíveis a tratamentos (GIAOURIS e SIMÕES, 2018).

Os biofilmes constituem um modo de crescimento protegido, sendo um dos mecanismos mais importantes que aumenta a capacidade dos microrganismos em resistir a fatores adversos e colonizar ambientes hostis (SOUZA et al., 2014; LIRA et al., 2016). Algumas vantagens que os microrganismos possuem com a formação de biofilmes são: proteção contra condições ambientais adversas (antimicrobianos, estresse nutricional e oxidativo, desafios de calor e ácido, exposição à luz UV, pH, mudanças de osmolaridade e dessecação); disponibilidade de nutrientes e cooperatividade metabólica; e aquisição de novas características genéticas, transferência horizontal de genes (GIAOURIS e SIMÕES, 2018).

2.8 Biofilmes de *Staphylococcus* spp. na indústria de alimentos

A adesão bacteriana e a formação de biofilme dependem das espécies bacterianas, da natureza da superfície, do meio de crescimento e de outras condições ambientais (SOUZA et al., 2014). Bactérias do gênero *Staphylococcus* possuem a capacidade de formar biofilmes, sendo este um dos fatores de virulência que facilitam a aderência e colonização destes agentes às superfícies de manipulação de alimentos (DARWISH e ASFOUR, 2013; LIRA et al., 2016). A formação de biofilme fornece a este patógeno várias vantagens de sobrevivência em comparação com suas células planctônicas, tais como: interações benéficas célula-célula, maior proteção contra tensões externas (estresse de processamento de alimentos com temperaturas relativamente altas e alto teor de sal), juntamente com uma maior capacidade de dispersão (VÁZQUEZ-SÁNCHEZ e RODRÍGUEZ-LÓPEZ, 2018).

A contaminação por biofilme das superfícies de contato com alimentos, fabricadas de aço inoxidável, vidro, borracha, poliestireno, polipropileno, dentre outras, é um fator importante na persistência de microrganismos deteriorantes e patogênicos em ambientes de processamento de alimentos (DI CICCIO et al., 2015). A exposição de patógenos a superfícies pode ocorrer por contato direto com materiais contaminados ou indiretamente pela microbiota do ar (LIRA et al., 2016). Bactérias do gênero *Staphylococcus* já foram detectadas em biofilmes em indústrias de laticínios e acredita-se que esta contaminação tenha um impacto significativo na saúde pública (BRIDIER et al., 2015).

Os biofilmes podem se desenvolver em superfícies de processamento de alimentos caso estas não sejam adequadamente limpas (COSTERTON; STEWART e GREENBERG, 1999; STEPANOVIC et al., 2003). A fixação de bactérias com posterior desenvolvimento de biofilmes em superfícies de equipamentos e utensílios de indústrias alimentícias tem importantes consequências econômicas, uma vez que podem servir como fonte potencial de contaminação cruzada de alimentos (SOUZA et al., 2014). As bactérias aderentes ao biofilme podem se soltar durante a produção (células planctônicas) e contaminar os alimentos à medida que passam sobre as superfícies dos equipamentos, levando à deterioração e diminuição da vida de prateleira dos produtos (GIAOURIS e SIMÕES, 2018).

A formação de biofilmes por bactérias patogênicas, como *Staphylococcus* enterotoxigênicos, podem levar à transmissão de doenças no caso das intoxicações alimentares, que acarretam sérios riscos para a saúde do consumidor (DUQUENNE et al., 2016); além disso, perdas econômicas por *recalls* de produtos alimentícios contaminados e/ou contaminação de água, corrosão da superfície do metal e a obstrução de equipamentos (VÁZQUEZ-SÁNCHEZ e RODRÍGUEZ-LÓPEZ, 2018).

A prevenção e o controle de biofilmes de *Staphylococcus* spp. no ambiente de processamento de alimentos devem ser baseados em esforços integrados, inicialmente com limpeza e desinfecção regulares de todos os equipamentos e superfícies de contato com alimentos (BRIDIER et al., 2015), e também durante o processamento com uma temperatura ambiente não superior a 12°C, estes fatores são essenciais para evitar ou reduzir o risco de formação de biofilme de *Staphylococcus* spp. na indústria alimentícia (DI CICCIO et al., 2015).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral:

Determinar o potencial enterotoxigênico e de formação de biofilme de *Staphylococcus* spp. em queijos Mussarela fatiados e fatiador de frios.

3.2 Objetivos Específicos:

- Determinação da presença de *Staphylococcus* coagulase negativa em fatiador de frios e em queijos Mussarela fatiados nos comércios varejistas;
- Identificação fenotípica das espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa;
- Determinação genotípica do gênero *Staphylococcus*;
- Investigação da presença de genes *sea*, *seb*, *sec* e *sed* que codificam para SEs A, B, C e D nos isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa;
- Determinação da capacidade de formação de biofilme das espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa.

4. REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 364, de 4 de setembro de 1997. Aprova o regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Mozzarella (Muzzarella ou Mussarela). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 08 set. 1997.
- BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal - RIISPOA. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 01 ago. 2001.
- BRIDIER, A. et al. Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. **Food Microbiology**. v. 45, p. 167-178, 2015.
- CHAJECKA-WIERZCHOWSKA, W. et al. Coagulase-negative *Staphylococci* (CoNS) isolated from ready-to-eat food of animal origin – phenotypic and genotypic antibiotic resistance. **Food Microbiology**. v. 46, p. 222-226, 2015.
- COELHO, K. O. et al. Níveis de células somáticas sobre a proteólise do queijo Mussarela. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. v.13, n. 3, p. 682-693, 2012.
- COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**. v. 284, p. 1318–1322, 1999.
- CUNHA, M. L. R. S. et al. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative *Staphylococci* isolated from foods. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 37, p. 70-74, 2006.
- DARWISH, S. F.; ASFOUR, H. A. E. Investigation of biofilm forming ability in *Staphylococci* causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. **The Scientific World Journal**. p.1-9, 2013.
- DI CICCIO, P. et al. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* on food contact surfaces: Relationship with temperature and cell surface hydrophobicity. **Food Control**. v. 50, p. 930-936, 2015.
- DUQUENNE, M. et al. Milk maturation temperature and time are key technological parameters to limit staphylococcal enterotoxin production during uncooked semi-hard cheese manufacture. **Food Control**. v. 59, p. 118-127, 2016.
- EMATER-MG. Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural do estado de Minas Gerais. **Fabricação de produtos lácteos: princípios básicos**. p.68, 2012.
- FAGNANI, R. et al. Pontos de contaminação microbiológica em Indústrias de Queijo Muçarela. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v. 35, n. 3, p. 217-223, 2013.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Gateway to dairy production and products**. Disponível em: <<http://www.fao.org/dairy-production-products/products/types-and-characteristics/en/>>. Acesso em: 29 ago. 2018.

FONTANA, C.; FAVARO, M. Coagulase-positive and coagulase-negative Staphylococci in Human Disease. **Pet-To-Man Travelling Staphylococci. A World in Progress.** p. 25-42. 2018.

FRIEDRICZEWSKI, A. B. et al. Formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* isolados de queijo Mussarela elaborado com leite de búfala e seu efeito sobre a sensibilidade a sanitizantes. **Acta Scientiae Veterinariae.** v. 46, p. 1528, 2018.

GIAOURIS, E. E.; SIMÕES, M. V. Pathogenic biofilm formation in the food industry and alternative control strategies. **Foodborne Diseases.** p. 309-377, 2018.

GOETZ, C. et al. Coagulase-negative *Staphylococci* species affect biofilm formation of other coagulase-negative and coagulase-positive *Staphylococci*. **Journal Dairy Science.** v. 100, p. 1-11, 2017.

JANA, A. H; MANDAL, P. K. Manufacturing and quality of Mozzarella cheese: A Review. **International Journal of Dairy Science.** v. 6, p. 199-226, 2011.

KOÇAK KIZANLIK, P.; GÖKSOY, E. O. Microbiological quality evaluation of various types of cheese. **Journal of Faculty of Veterinary Medicine.** v. 15, n. 2, p. 86-93, 2018.

KUREKCI, C. Short communication: Prevalence, antimicrobial resistance, and resistant traits of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from cheese samples in Turkey. **Journal Dairy Science.** v. 99, p. 1-5, 2016.

LAMICHHANE, P.; KELLY, A. L.; SHEEHAN, J.J. Invited review: Structure-function relationships in cheese. **Journal Dairy Science.** v. 101, p. 1-18, 2018.

LAMPEL, K. A. et al. Food and drug administration. Bad Bug Book. Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins - *Staphylococcus aureus*. 2^o Ed., 2012.

LEROY, S.; VERMASSEN, A.; TALON, R. *Staphylococcus*: Occurrence and properties. **Encyclopedia of Food and Health.** p. 140-145, 2016.

LIRA, M. C. et al. Biofilm-forming and antimicrobial resistance traits of *Staphylococci* isolated from goat dairy plants. **The Journal of Infection in Developing Countries.** v. 10, n. 9, p. 932-938, 2016.

MARINHEIRO, M. F. et al. Qualidade microbiológica de queijo mussarela em peça e fatiado. **Semina: Ciências Agrárias.** v. 36, n. 3, p. 1329-1334, 2015.

MELO, P. C. et al. Phenotypic and molecular analysis of biofilm production by *Staphylococcus aureus* strains isolated of bovine mastitis case. **Bioscience Journal.** v. 28, n. 1, p. 94-99, 2012.

MORENTE, E. O.; RUIZ, A. G. P.; PULIDO, R. P. *Staphylococcus*: Detection. Encyclopedia of food and health. **Encyclopedia of Food and Health.** p. 128-132, 2016.

NUNES, R. S. C.; AGUILA, E. M. D.; PASCHOALIN, V. M. F. Safety evaluation of the coagulase-negative *Staphylococci* microbiota of salami: superantigenic toxin production and antimicrobial resistance. **BioMed Research International.** 17 p., 2015.

- NUNES, M. M.; CALDAS, E. D. Preliminary quantitative microbial risk assessment for *Staphylococcus* enterotoxins in fresh Minas cheese, a popular food in Brazil. **Food Control**. v. 73, p. 524-531, 2017.
- PODKOWIK, M. et al. Enterotoxigenic potential of coagulase-negative *Staphylococci*. **International Journal of Food Microbiology**. v. 163, p. 34-40, 2013.
- RALL, V. L. et al. Polymerase chain reaction detection of enterotoxins genes in coagulase-negative *Staphylococci* isolated from Brazilian Minas cheese. **Foodborne Pathogens and Disease**. v. 7, p. 1121–1123, 2010.
- REGES, J. T. A. et al. Qualidade microbiológica e físico química do queijo mussarela a granel comercializadas em Jataí (Goiás, Brasil). **Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales**. v. 4, p. 69-77, 2017.
- SANTANA, E. H. W. et al. Estafilococos em Alimentos – Revisão. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 77, n. 3, p. 545-554, 2010.
- SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5º Ed., Blucher, 2017, 560 p.
- SOUZA, E. L. et al. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food contact surfaces in a meat-based broth and sensitivity to sanitizers. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 45, p. 67-75, 2014.
- STEPANOVIC, S. et al. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. **Food Microbiology**. v. 20, n. 3, p. 339-343, 2003.
- UDO, E. E. et al. Enterotoxin production by coagulase-negative *Staphylococci* in restaurant workers from Kuwait City may be a potential cause of food poisoning. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 48, p. 819-823, 1999.
- VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, P. Biofilm formation of *Staphylococcus aureus*. **Staphylococcus aureus**. p.87-103, 2018.
- VERAS, J. F. et al. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive *Staphylococcal* isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 12, p. 410-415, 2008.
- WANG, H. et al. Pathogenicity and antibiotic resistance of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from retailing chicken meat. **Food Science and Technology**. v. 90, p. 152–156, 2018.

5. ARTIGO CIENTÍFICO

Potencial enterotoxigênico e de formação de biofilme de *Staphylococcus* spp. isolados de queijos mussarela fatiados e fatiadores de frios

Formatado para revista:

Canadian Journal of Microbiology

Potencial enterotoxigênico e de formação de biofilme de *Staphylococcus* spp. isolados de queijos mussarela fatiados e fatiadores de frios

Resumo

Espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) também são encontradas como contaminantes em alimentos de origem animal. Este estudo teve como objetivo investigar a presença dos genes de enterotoxinas *sea*, *seb*, *sec* e *sed* e a capacidade de formar biofilmes de isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa em queijos Mussarela fatiados e fatiadores de frios. De 85 isolados de SCN foram identificadas nove espécies bacterianas, sendo as mais frequentes: *Staphylococcus* (*S.*) *saprophyticus* 22 (25,9%), *S. xylosus* 14 (16,5%) e *S. cohnii* subsp. *urealyticum* 7 (8,2%). As demais espécies identificadas foram: *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. captis* subsp. *ureolyticus*, *S. chromogenes*, *S. caprae* e *S. simulans*, sendo que 31 (36,5%) dos isolados foram classificados como *Staphylococcus* spp. Não houve diferença significativa entre as espécies encontradas nas amostras de queijo Mussarela e nas superfícies dos fatiadores de frios. Do total de isolados, 44 (51,8%) foram negativos para a produção de biofilme e 41 (48,2%) positivos, com a maior frequência de detecção nas espécies *S. saprophyticus* e *S. cohnii* subsp. *urealyticum*. Quando pesquisados quanto à presença de genes codificadores para as enterotoxinas SEA, SEB, SEC e SED, em nenhum isolado foram detectados genes que codificam para estas enterotoxinas. Os resultados apontam para o potencial risco de contaminação cruzada de outros alimentos, uma vez que os queijos Mussarela e os fatiadores de frios alvos deste estudo apresentaram altas contagens de SCN produtores de biofilme, podendo colonizar e persistir em superfícies de diversos equipamentos. Por esta razão, é necessário salientar a importância das Boas Práticas de Manipulação e Higienização uma vez que esse grupo bacteriano é um importante indicador da qualidade dos alimentos.

Palavras-chave: *Staphylococcus* spp., intoxicação alimentar, produto lácteo, persistência, contaminação

Introdução

O queijo Mussarela faz parte de diversos alimentos prontos para o consumo (*ready-to-eat*), sendo um produto bastante consumido (Koçak Kizanlik e Göksoy 2018). Tradicionalmente era produzido com leite de búfala, porém, atualmente é elaborado principalmente a partir de leite de vaca (Jana e Mandal 2011). Por ser um produto rico em nutrientes é passível de contaminação por bactérias patogênicas e deteriorantes, inclusive do gênero *Staphylococcus*, e sua inocuidade tem grande importância para a saúde pública (Friedriczewski et al. 2018).

Muitas espécies de *Staphylococcus* spp. classificadas como coagulase negativa (SCN) possuem a capacidade de formar biofilmes, facilitando a aderência e colonização de suas células às superfícies de manipulação de alimentos (Darwish e Asfour 2013; Lira et al. 2016), como também são detectadas nos próprios alimentos, inclusive nos fermentados, como os queijos, mostrando sua importância para a saúde pública (Chajecka-Wierzchowska et al. 2015, Nunes; Aguila e Paschoalin 2015, Kurekci 2016).

Bactérias do gênero *Staphylococcus*, em biofilmes, são mais resistentes a materiais saneantes e também a antimicrobianos, podendo se desenvolver em superfícies de processamento de alimentos quando estas não estiverem adequadamente limpas. A população bacteriana é então envolvida por uma matriz de exopolissacarídeos que lhe confere proteção, dando condições para este microrganismo produzir enterotoxinas estafilocócicas (SE) (Stepanovic et al. 2003). As células microbianas fixam-se às superfícies onde iniciam o seu crescimento e, quando são liberadas, contaminam os alimentos, representando riscos à saúde do consumidor (Pires et al. 2005).

O potencial enterotoxigênico dos SCN em surtos de intoxicação alimentar estafilocócica ainda não está totalmente comprovado, porém há diversos estudos que apontam esta possibilidade, ao detectarem genes de enterotoxinas em espécies de SCN (Cunha et al. 2006, Veras et al. 2008, Rall et al. 2010, ChajECKa-Wierzchowska et al. 2015, Nunes; AguilA e Paschoalin 2015, Kurekci 2016). Portanto, cepas enterotoxigênicas de SCN podem contribuir para intoxicação alimentar.

O presente estudo teve como objetivo investigar a presença dos genes *sea*, *seb*, *sec* e *sed* e a capacidade de formação de biofilmes em isolados de *Staphylococcus coagulase negativa* provenientes de queijos Mussarela fatiados e fatiadores de frios.

Material e Métodos

Coleta das amostras

As amostragens foram realizadas em 44 estabelecimentos varejistas, sendo 15 panificadoras, 24 minimercados de bairro e 5 supermercados, na cidade de Garanhuns-PE (Brasil), no período de outubro a dezembro de 2017. As amostras de queijo Mussarela e de *swab* dos fatiadores utilizados para o fracionamento do tipo de queijo amostrado foram adquiridas com o apoio da equipe de Vigilância Sanitária (VISA) do município. Após a coleta, as amostras foram imediatamente conduzidas ao Centro Laboratorial de Apoio à Pesquisa da Unidade Acadêmica de Garanhuns (CENLAG), Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, para realização das análises.

Isolamento e Identificação de *Staphylococcus coagulase negativa* (SCN)

Após a coleta, as amostras de queijo foram processadas de acordo com os métodos de análises microbiológicas para alimentos de origem animal (Bennett et al. 2017), onde 25 g de cada amostra de queijo e 225 mL de água peptonada 0,1%, foram homogeneizadas em *stomacher*. Em seguida procedeu-se a diluição seriada (10^{-1} a 10^{-3}), onde 1 mL de cada

diluição foi transferido para 9 mL de água peptonada 0,1%, tanto para as amostras de queijo quanto para os *swabs* das superfícies dos fatiadores (diluídos inicialmente em 10 mL de água peptonada 0,1%). Em seguida, 100 µL de cada diluição foi transferido em duplicata para placas com ágar Baird-Parker (BP) contendo telurito e emulsão de gema de ovo, procedendo o plaqueamento em superfície. As placas foram incubadas a 37°C por 48h. Para confirmação do gênero *Staphylococcus*, 3 colônias típicas (negras brilhantes com anel opaco, rodeadas por um halo claro, transparente e destacado sobre a opacidade do meio) e 3 atípicas (acinzentadas ou negras brilhantes, sem halo ou com apenas um dos halos) foram coletadas de cada placa e cultivadas em 3 mL de caldo BHI (Caldo Cérebro Coração) a 37°C/24h para realização das provas de Gram, catalase e coagulase em tubo. Os isolados com características de *Staphylococcus* spp. foram congelados -20°C em BHI contendo 20% glicerol para posterior identificação das espécies de SCN, verificação da produção de biofilmes e pesquisa de genes codificadores de SEs.

Caracterização das espécies de *Staphylococcus* spp.

O gênero *Staphylococcus* foi diferenciado de *Micrococcus* spp. através de teste de resistência ao antibiótico bacitracina (0,04 U.I.). A identificação em nível de espécie de SCN foi realizada através de testes bioquímicos. Inicialmente, os isolados foram testados quanto à resistência ou sensibilidade ao antibiótico novobiocina (5mcg), segundo recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI 2008). Os isolados resistentes a novobiocina foram submetidos a teste de fermentação dos seguintes açúcares: D-xilose, D-manose, L-arabinose, D-celobiose, rafinose e sacarose, além de redução de nitrato; o grupo dos isolados sensíveis a novobiocina foram testados para fermentação de α -lactose, D-manitol, D-trealose, maltose, sacarose e D-manose, bem como a utilização de arginina. Todos os isolados foram testados para a presença de urease (Kloos e Schleifer 1975, Silva et al. 2004).

Produção de biofilme pelo teste de aderência em placa

A avaliação da produção de biofilme *in vitro* foi realizada seguindo recomendações de Stepanovic et al. (2003) e Darwish e Asfour (2013). Os isolados de SCN foram reativados em Ágar Triptona de Soja (TSA) e depois transferidos para Caldo Triptona de Soja (TSB) suplementado com 0,25% de glicose (TSB-Glicose 0,25%) (Cucarella et al. 2001) e incubados por 24 horas a 37°C. Foram utilizadas placas de microtitulação de poliestireno de 96 poços de fundo chato, onde prosseguiu a diluição de 1:40 do inóculo em TSB-Glicose 0,25%; após foram distribuídos 200 µL dos isolados em cada poço da placa, em triplicata para cada amostra, em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Como controle negativo foi utilizado TSB-Glicose 0,25% estéril. Após a incubação, o conteúdo de todos os poços foi removido por aspiração e as paredes dos poços lavadas por três vezes com 250 µL de solução salina estéril. A placa foi então invertida e colocada em estufa a 37°C por 1 hora até a completa secagem. Logo após, cada poço foi preenchido com 250 µL de metanol e a placa mantida em temperatura ambiente por 15 minutos (etapa de fixação do biofilme), onde então o metanol foi desprezado por inversão da placa e adicionando-se em cada poço 250 µL de solução aquosa de cristal violeta a 0,5% (etapa de coloração do biofilme), incubando por 5 minutos em temperatura ambiente. Por fim, o cristal violeta foi desprezado e 250 µL de etanol foi adicionado em cada poço, de forma a retirar o corante não aderido, e imediatamente desprezado, mantendo a placa em temperatura ambiente até a completa secagem dos poços. A leitura foi realizada em leitora de microplacas (Analítica, Asys UVM 340) utilizando-se o espectro de 620 nm. A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com a média aritmética da absorbância das densidades óticas (ODs) das amostras testes (ODt) e do controle negativo (ODc), onde foram utilizadas para classificar cada amostra de acordo com as categorias a seguir: Não produtora de biofilme = $ODt \leq ODc$; Fraca produtora de

biofilme=ODc<ODt≤(2xODc); Moderadamente produtora de biofilme=(2xODc)<ODt≤(4xODc); Forte produtora de biofilme=(4xODc)<ODt.

Pesquisa de genes codificadores para enterotoxinas

Extração e purificação do DNA bacteriano

O DNA genômico de todos os isolados de SCN foi extraído e purificado utilizando a metodologia do aquecimento descrita por Hassanzadeh et al. (2016), com modificações, a partir de culturas em TSB incubadas a 37°C/24h, bem como as cepas de *Staphylococcus aureus* usadas como referência neste estudo. O DNA foi obtido a partir de 1 mL do cultivo bacteriano, o qual foi centrifugado a 14000 rpm por 5 minutos. O sedimento foi lavado com 500 µL de tampão de lise (20 mM EDTA + 20 mM Tris pH 7,5 + 75 mM NaCl) e recentrifugado; as células bacterianas foram suspensas novamente em 300 µL do mesmo tampão e submetidas a dois ciclos de fervura/congelamento, sendo 2 minutos cada etapa. Em seguida, adicionou-se 30 µL de lisozima (1mg/mL), incubou-se por 1 hora a 37°C quando foi adicionado 33 µL de SDS 10% e 120 µL de acetato de sódio (AcNa) 3M, incubando-se as amostras a 55°C e/ou ambiente gelado após a adição de cada um dos reagentes. Realizou-se, então, centrifugação e o sedimento foi submetido a etapas consecutivas de clorofórmio, isopropanol e etanol. Após a última lavagem com etanol gelado a 70% (v/v), os tubos foram secos por inversão e o DNA diluído em 30 µL de tampão TE pH 7,5 e congelado a -20°C.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os primers utilizados para realização da PCR estão descritos na **Tabela 1**. Para a PCR foi utilizado o kit PCR SuperMix (InvitrogenTM), seguindo as etapas de adição de 27 µL mix, 1 µL de cada primer (0,01nmoles/µL) e 1 µL do DNA em tubos de 200 µL. A amplificação foi realizada no Termociclador Mastercycler® X50 (Eppendorf), utilizando o seguinte ciclo: a desnaturação inicial foi a 94°C por 2 min, seguido de 36 ciclos com desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C (*sea*, *seb*, *sec*) ou 43,9°C (*sed*) por 30 segundos e extensão a

72°C por 1 min. A extensão final foi a 72°C por 10 minutos. Todos os isolados foram testados para o 16S rRNA, a fim de confirmação do gênero *Staphylococcus* spp., onde os primers utilizados foram: 16S 1 (5' -GTA GGT GGC AAG CGT TAT CC-3') e 16S 2 (5' -CGC ACA TCA GCG TCA G- 3'), com 228 pb. A amplificação foi visualizada utilizando gel de Agarose a 2% em tampão TBE 1X, corado com Syber Safe Corante de gel 10.000X (Invitrogen). O tamanho dos produtos da amplificação foi comparado com o Ladder 100 pb (Ludwig Biotec). As fotos foram realizadas sob iluminação UV.

Tabela 1. Primers utilizados na identificação de genes codificadores para enterotoxinas estafilocócicas (SE) e para identificação do gênero *Staphylococcus* (16S).

Primers	Sequência de nucleotídeos 5' para 3'	Enterotoxinas	Tamanho dos amplicons (pb)
<i>sea</i> 1	TTG GAA ACG GTT AAA ACG AA	SEA	120
<i>sea</i> 2	GAA CCT TCC CAT CAA AAA CA	SEA	
<i>seb</i> 1	TCG CAT CAA ACT GAC AAA CG	SEB	478
<i>seb</i> 2	GCA GGT ACT CTA TAA GTG CC	SEB	
<i>sec</i> 1	GAC ATA AAA GCT AGG AAT TT	SEC	257
<i>sec</i> 2	AAA TCG GAT TAA CAT TAT CC	SEC	
<i>sed</i> 1	CTA GTT TGG TAA TAT CTC CT	SED	317
<i>sed</i> 2	TAA TGC TAT ATC TTA TAG GG	SED	

Fonte: Cunha et al., 2006

Resultados e Discussão

Um total de 88 amostras foram analisadas, das quais 44 eram de queijo Mussarela fatiado e 44 de *swabs* das superfícies dos fatiadores utilizados no fatiamento destes queijos. No presente estudo a contaminação por *Staphylococcus* spp. nas 44 amostras de *swabs* da superfície dos fatiadores variou de $1,0 \times 10^1$ a $9,4 \times 10^4$ UFC/mL. Nas amostras de queijo Mussarela a contaminação por *Staphylococcus* spp. variou de $1,0 \times 10^1$ a $6,5 \times 10^4$ UFC/g. Valores semelhantes foram encontrados por Nascimento et al. (2009), que observaram contagens de *Staphylococcus* spp. obtidos de amostras de queijo Mussarela provenientes de supermercados de Recife-PE entre $7,0 \times 10^2$ e $7,3 \times 10^5$ UFC/g.

A legislação brasileira vigente para análise microbiológica em alimentos, e mais especificamente em queijos Mussarela, determina que seja analisado o grupo de SCP, estando o queijo Mussarela apto para consumo com contagens máximas de até 10^3 UFC/g (Brasil, 1997; 2001). Contagens de *Staphylococcus* produtores de coagulase acima do limite máximo determinado na legislação foram relatados por Pires et al. (2005), Castro et al. (2012) e Marinheiro et al. (2015), que verificaram em seus respectivos trabalhos altas contagens destes microrganismos em fatiadores de frios e amostras de diferentes tipos de queijos.

Todos os isolados provenientes das amostras de queijo Mussarela e *swabs* de fatiadores foram identificados e classificados como SCN (cocos Gram-positivos, catalase positiva e coagulase negativa). Este resultado é de suma relevância devido ao significado epidemiológico da presença desses *Staphylococcus* em alimentos, sendo destacado por diferentes pesquisadores, os quais observaram características de patogenicidade nesse grupo bacteriano, como presença de genes codificadores para enterotoxinas, genes de resistência a antibióticos e cepas produtoras de biofilme (Cunha et al. 2006, Veras et al. 2008, Chajeka-Wierzchowska et al. 2015, Nunes, Aguila e Paschoalin 2015, wang et al. 2018).

Após a realização dos testes bioquímicos, foram identificados 85 isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa, os quais foram agrupados de acordo com o local de contaminação, superfície de fatiadores de frios ou amostras de queijo Mussarela fatiado, nas seguintes espécies: *Staphylococcus saprophyticus* (n=22), *S. xylosus* (n=14), *S. cohnii* subsp. *urealyticum* (n=7), *S. epidermidis* (n=4), *S. warneri* (n=3), *S. captis* subsp. *ureolyticus* (n=1), *S. chromogenes* (n=1), *S. caprae* (n=1) e *S. simulans* (n=1). Trinta e um isolados não foram identificados com os testes utilizados, sendo assim agrupados como *Staphylococcus* spp. **(Tabela 2)**.

Tabela 2. Frequência absoluta e relativa de espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa isoladas de amostras de queijo Mussarela e da superfície de fatiadores.

Espécie	Superfície de fatiadores	Queijo Mussarela	Total	
			Frequência Absoluta	Frequência Relativa (%)
<i>S. saprophyticus</i>	10	12	22	25,9
<i>S. xylosus</i>	8	6	14	16,5
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticum</i>	3	4	7	8,2
<i>S. epidermidis</i>	1	3	4	4,7
<i>S. warneri</i>	2	1	3	3,5
<i>S. captis</i> subsp. <i>ureolyticus</i>	1	0	1	1,2
<i>S. chromogenes</i>	0	1	1	1,2
<i>S. caprae</i>	0	1	1	1,2
<i>S. simulans</i>	0	1	1	1,2
<i>Staphylococcus</i> spp.*	17	14	31	36,5
Total	42	43	85	100

*isolados não identificados a nível de espécie pelos testes bioquímicos utilizados.

Embora não seja possível correlacionar que a espécie isolada nas amostras de queijos e equipamentos são as mesmas cepas, fica evidente que as mesmas espécies de SCN apareceram com similar frequência nas amostras analisadas. Diante disto, há necessidade de uma reavaliação dos padrões microbiológicos estabelecidos pela legislação brasileira para *Staphylococcus* enterotoxigênico em alimentos, a qual preconiza somente pesquisa e contagens de estafilococos coagulase positiva (Brasil 1997, 2001), tais padrões correlacionam a produção da enzima coagulase com a capacidade de produção de enterotoxinas pelo gênero *Staphylococcus*.

Ao pesquisar a presença de genes codificadores para as enterotoxinas SEA, SEB, SEC e SED a partir dos 85 isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa caracterizados em nível de espécie, de amostras de queijos Mussarela e fatiadores de frios, não foi encontrado nenhum dos genes *sea*, *seb*, *sec* ou *sed*. Resultado semelhante foi obtido por Wang et al. (2018), que pesquisaram, dentre outros, genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* em SCN isolados a partir de amostras de

produtos de carne de frango crua, indicando a potencialidade negativa para intoxicação alimentar por SCN nas amostras pesquisadas.

Os controles positivos utilizados para cada enterotoxina foram: *Staphylococcus aureus* 6+ (*sea* e *seb*), *S. aureus* FRI 361(*sec*₂) e *S. aureus* FRI 1151 (*sed*) e como controle negativo tubo sem DNA, como ilustrado na **figura 1**. Como controle, todos os isolados foram testados para o gene 16S, específico para o gênero *Staphylococcus*.

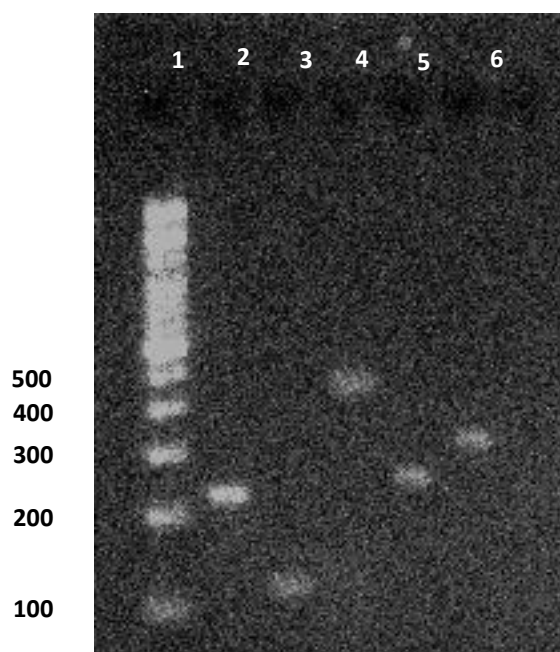


Figura 1. Amplificação dos genes 16S (1), *sea* (2), *seb* (3), *sec* (4), *sed* (5) e o controle negativo (6).

Mesmo com resultado negativo para as enterotoxinas pesquisadas neste estudo, diversos autores relatam a ocorrência de cepas coagulase negativa, com potencial enterotoxigênico em alimentos. Dentre as espécies de SCN isoladas de alimentos e com capacidade de produzir enterotoxinas estão: *S. epidermidis*, *S. xylosum*, *S. warneri*, *S. saccharolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. carnosus*, *S. succinus*, *S. lentus*, *S. simulans*. Nestas, os principais genes de enterotoxinas encontrados foram: *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seh*, *sei* e *sel* (Cunha et al. 2006, Chajęcka-Wierżchowska et al. 2015, Nunes, Aguilă e Paschoalin 2015).

Por outro lado, na avaliação da produção de biofilme em microplacas, dos 85 isolados de SCN, 44 (51,8%) foram negativos para produção de biofilme e 41 (48,2%) positivos (**Figura 2**). Como mostrado nas **figuras 3 e 4**, destes, 25 (61,0%) foram classificados como fraco produtores de biofilme, 9 (22,0%) como moderado produtores e 7 (17%) isolados foram forte produtores.

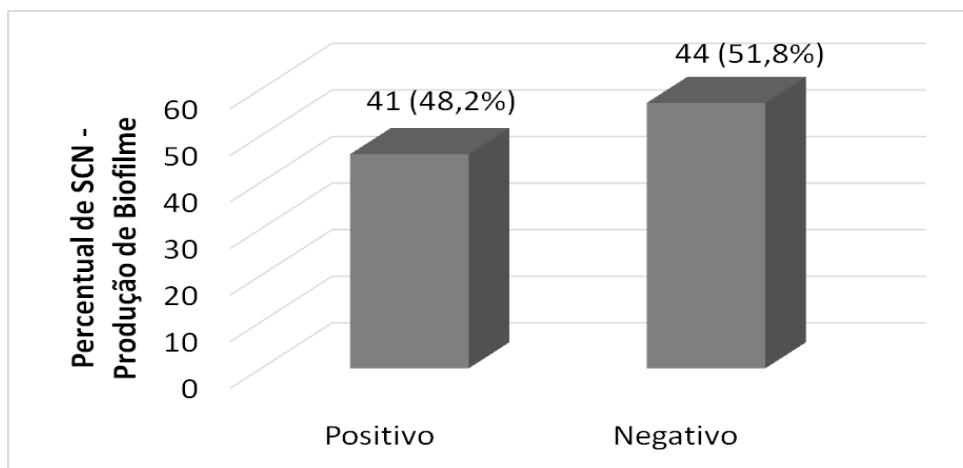


Figura 2. Amostras de *Staphylococcus* coagulase negativa produtoras e não produtoras de biofilme, isoladas de queijo mussarela e superfície de fatiadores.

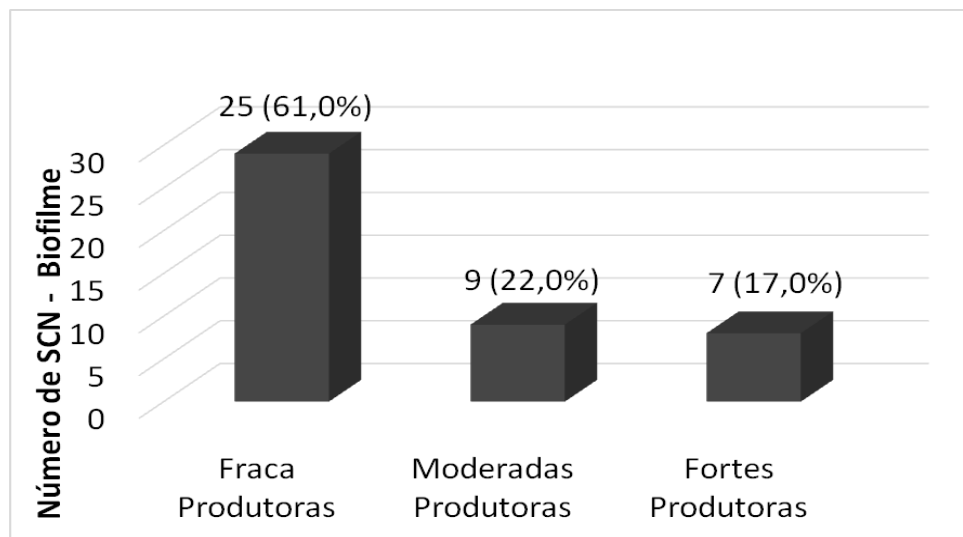


Figura 3. Classificação de amostras de *Staphylococcus* coagulase negativa quanto a produção de biofilme.

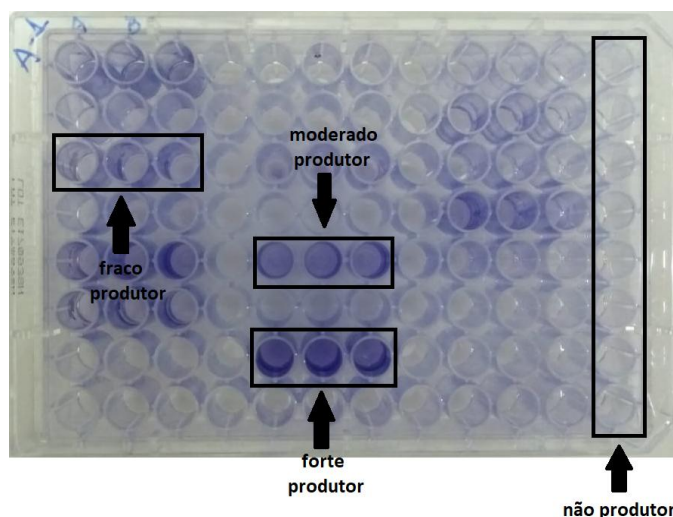


Figura 4. Método de microtitulação em placas de poliestireno mostrando isolados não produtores, fraco, moderado e forte produtores de biofilme diferenciados pela coloração com cristal violeta 0,5%.

A **Tabela 3** mostra a relação entre as espécies identificadas de *Staphylococcus* coagulase negativa e os 3 níveis de produção de biofilme e não produtores, evidenciando que todas as espécies identificadas são capazes de produzir biofilmes. Os isolados fortemente produtores de biofilme foram pertencentes às espécies *S. saprophyticus* (3), *S. cohnii* subsp. *urealyticum* (1) e aos *Staphylococcus* (3) que não foram identificados em nível de espécie.

Tabela 3. Presença de biofilme de acordo com as espécies de *Staphylococcus* coagulase negativa.

Espécies	Total	Produção de biofilme			
		Forte	Moderado	Fraco	Não produtor
<i>S. saprophyticus</i>	22	3	5	6	8
<i>S. xylosus</i>	14	0	0	4	10
<i>S. cohnii</i> subsp. <i>urealyticum</i>	7	1	1	2	3
<i>S. epidermidis</i>	4	0	0	0	4
<i>S. warneri</i>	3	0	0	0	3
<i>S. captis</i> subsp. <i>ureolyticus</i>	1	0	0	1	0
<i>S. chromogenes</i>	1	0	0	1	0
<i>S. caprae</i>	1	0	0	0	1
<i>S. simulans</i>	1	0	0	0	1
<i>Staphylococcus</i> spp.*	31	3	3	11	14
Total	85	7	9	25	44

*isolados não identificados a nível de espécie pelos testes bioquímicos utilizados.

Em estudo publicado por Darwish e Asfour (2013), dos 68 (63%) isolados de SCN provenientes de leite de vacas com mastite subclínica, 30 (44%) foram fortes produtores de biofilme, 21 (30,9%) foram moderado produtores e 13 (19,2%) foram fraco produtores, ao passo que apenas 4 (5,9%) isolados não produziram biofilme pelo método e microtitulação em placas. Da mesma maneira, Friedriczewski et al. (2018), encontraram 20 isolados de *S. aureus* em amostras de queijos mussarela produzidos a partir de leite de búfalas. Destes isolados, 2 (10%) foram classificados como fortes formadores de biofilme, 7 (35%) como moderados produtores, 10 (50%) como fracos produtores e 1 não produziu biofilme. De acordo com os dados do nosso estudo, foi observado uma quantidade considerável de amostras com a habilidade de produção de biofilme, concluindo então que tal característica causa uma preocupação por poderem se tornar persistentes no ambiente, contaminando queijos e outros produtos alimentícios comercializados no município de Garanhuns-PE.

Assim, podemos perceber que, independentemente das amostras coletadas e dos locais de amostragem (queijo ou *swab* de superfície), há a presença de contaminação por microrganismos do gênero *Staphylococcus* na área de realização deste estudo, indicando que todos os locais sujeitos a análise apresentaram más condições higiênicas no processamento e comercialização de queijos mussarela. Estes dados poderão ajudar na tomada de decisões junto aos órgãos de fiscalização, auxiliando as execuções de ações de extensão e treinamento, os quais poderão melhorar a obtenção e qualidade desse produto altamente consumido pela população.

Conclusão

Neste estudo foi possível constatar altas contagens de *Staphylococcus* coagulase negativa em queijos Mussarela e fatiadores de frios, além da verificação *in vitro* da produção de biofilmes por todos os isolados encontrados. Embora não tenham sido identificadas neste estudo cepas de SCN com genes *sea*, *seb*, *sec* e *sed*, os diferentes relatos publicados, que

indicam essa possibilidade, demonstram a importância de mais pesquisas sobre o tema. Os resultados observados denotam uma preocupação para saúde pública, visto que cepas coagulase negativa também possuem capacidade de formar biofilmes em superfícies de contato com alimentos, constituindo uma fonte de contaminação para estes. Por esta razão, é importante salientar a importância das Boas Práticas de Manipulação e Higienização dos equipamentos e utensílios utilizados no fracionamento das peças de queijo Mussarela, a fim de diminuir ao máximo o risco de intoxicações alimentares causadas por microrganismos deste gênero.

Acknowledgements

I thank the Foundation for the Support of Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE) for the scholarship of AELML and the Academic Unit of Garanhuns, Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE-UAG), for the financial support and material used in the development of this research. And Fiocruz (Fundação Oswaldo Cruz, Recife Pernambuco, Brazil) for provide the control strains used in the study.

References

- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 364, 4 de setembro de 1997. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de queijo Mozzarella (Muzzarella ou Mussarela). **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 08 set. 1997.
- Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 01 ago. 2001.
- Bennett, R.W., Hait, J.M. e Tallent, S.M. 2015. *Staphylococcus aureus* and staphylococcal enterotoxins. In Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Edited by Y. Salfinger and M.L. Tortorello. (eds.), 5th ed. American Public Health Association, Washington, D. C.,. Chapter 39, pp.509-526.
- Castro, A.C.S., Cardoso, Pinto-Júnior, W.R., Tapia, D.M. e Cardoso, L.G.V. 2012. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica de queijos do tipo Mussarela comercializados no CEASA de Vitória da Conquista - BA. Alimentos e Nutrição. **23**(3):407-413. [article in portuguese]

- Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., Nalepa, B., Sierpinska, M. e Łaniewska-Trokenheim, Ł. 2015. Coagulase-negative staphylococci (CoNS) isolated from ready-to-eat food of animal origin – Phenotypic and genotypic antibiotic resistance. *Food Microbiology*. **46**(2015):222-226. doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.001.
- CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute, In Vitro Sensitivity Test - Disk Diffusion. 2008. **28** (8):M31-A3.
- Cucarella, C., Solano, C., Valle, J., Amorena, B., Lasa, I. e Penadés, J.R. 2001. Bap, a *Staphylococcus aureus* surface protein involved in biofilm formation. *Journal Bacteriology*. **183**(9):2888-2896. doi: 10.1128/JB.183.9.2888–2896.2001.
- Cunha, M.L.R.S., Peresi, E., Calsolari, R.A.O. e Araújo-Júnior, J.P. 2006. Detection of enterotoxins genes in coagulase-negative staphylococci isolated from foods. *Brazilian Journal of Microbiology*. **37**(1):70-74. doi.org/10.1590/S1517-83822006000100013.
- Darwish, S.F. e Asfour, H.A.E. 2013. Investigation of biofilm forming ability in *Staphylococci* causing bovine mastitis using phenotypic and genotypic assays. *The Scientific World Journal*. **2013**:1-9. doi.org/10.1155/2013/378492.
- Friedriczewski, A.B., Gandra, E.A., Conceição, R.C.S., Cereser, N.D., Moreira, L.M. e Timm, C.D. 2018. Formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* isolados de queijo Mussarela elaborado com leite de búfala e seu efeito sobre a sensibilidade a sanitizantes. *Acta Scientiae Veterinariae*. **46**:1528. doi: 10.22456/1679-9216.81813. [article in portuguese]
- Hassanzadeh, S., Pourmand, M.R. Afshar, D., Dehbashi, S. e Mashhadi, R. 2016. TENT: A Rapid DNA Extraction method of *Staphylococcus aureus*. *Iranian Journal of Public Health*, **45**(8):1093-1095.
- Jana, A.H e Mandal, P.K. 2011. Manufacturing and quality of Mozzarella cheese: A Review. *International Journal of Dairy Science*. **6**(4):199-226. doi: 10.3923/ijds.2011.199.226.
- Kloos, W.E. e Schleifer, K.H. 1975. Simplified scheme for routine identification of *Staphylococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology*. **1**(1):82-88.
- Koçak-Kızanlık, P. e GÖKSOY, E.O. 2018. Microbiological quality evaluation of various types of cheese. *Journal of Faculty of Veterinary Medicine*. **15**(2):86-93.
- Kurekci, C. 2016. Short communication: Prevalence, antimicrobial resistance, and resistant traits of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from cheese samples in Turkey. *Journal Dairy Science*. **99**(4):1-5. doi.org/10.3168/jds.2015-10725.
- Lira, M.C., Givisiez, P.E.N., Sousa, F.G.C., Magnani, M., Souza, E.L., Spricigo, D.A., Gebreyes, W.A. e Oliveira, C.J.B. 2016. Biofilm-forming and antimicrobial resistance traits of *Staphylococci* isolated from goat dairy plants. *The Journal of Infection in Developing Countries*. **10**(9):932-938. doi:10.3855/jidc.6714.

- Marinheiro, M.F., Ghizzi, L.G., Cereser, N.D., Lima, H.G. e Timm, C.D. 2015. Qualidade microbiológica de queijo mussarela em peça e fatiado. *Semina: Ciências Agrárias*. **36**(3):1329-1334. doi: 10.5433/1679-0359.2015v36n3p1329. [article in portuguese]
- Nascimento, D.L., Luna, R.O., Conserva, J.C., Cavalcanti, T.B., Lira, L.B., Fagundes, R.H.S., Carvalho-Neto, P.M. e Mendes, E.S. 2009. *Staphylococcus* spp. em queijo tipo Mussarela fatiado comercializado em supermercados do Distrito Sanitário IV do Recife-PE. *JEPEX - UFRPE*. [article in portuguese]
- Nunes, R.S.C., Aguila, E.M.D. e Paschoalin, V.M.F. 2015. Safety evaluation of the coagulase-negative *Staphylococci* microbiota of salami: superantigenic toxin production and antimicrobial resistance. *BioMed Research International*. **2015**:17p. doi.org/10.1155/2015/483548.
- Pires, A.C.S., Araújo, E.A., Camilloto, G.P., Ribeiro, M.C.T., Soares, N.F.F. e Andrade, N.J. 2005. Condições higiênicas de fatiadores de frios avaliadas por atp-bioluminescência e contagem microbiana: sugestão de higienização conforme RDC 275 da ANVISA. *Alimentos e Nutrição*. **16**(2):123-129. [article in portuguese]
- Rall, V.L.M., Sforcin, J.M., Deus, M.F.R., Sousa, D.C., Camargo, C.H., Godinho, N.C., Galindo, L.A., Soares, T.C.S. e Araújo-Júnior, J.P. 2010. Polymerase chain reaction detection of enterotoxins genes in coagulase-negative *Staphylococci* isolated from Brazilian Minas cheese. *Foodborne Pathogens and Disease*. **7**(9):1121–1123. doi: 10.1089=fpd.2009.0478.
- SILVA, E.R., Siqueira, A.P., Martins, J.C.D., Ferreira, W.P.B. e Silva, N. 2004. Identification and in vitro antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from goat mastitis in the Northeast of Brazil. *Small Ruminant Research*. v. 55. p. 45-49. doi: 10.1016/j.smallrumres.2004.01.001.
- Stepanovic, S., Cirkovic, I., Mijac, V. e Svabic-Vlahovic, M. 2003. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food Microbiology*. **20**(3):339-343. doi.org/10.1016/S0740-0020(02)00123-5.
- Udo, E.E., Al-Bustan, M.A., Jacob, L.E. e Chugh, T.D. 1999. Enterotoxin production by coagulase-negative *Staphylococci* in restaurant workers from Kuwait city may be a potential cause of food poisoning. *Journal of Medical Microbiology*. **48**(9):819-823. doi: 10.1099/00222615-48-9-819.
- Veras, J.F., Carmo, L.S., Tong, L.C., Shupp, J.W., Cummings, C., Santos, D.A., Cerqueira, M.M.O.P., Cantini, A., Nicoli, J.R. e Jett, M. 2008. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive *Staphylococcal* isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *International Journal of Infectious Diseases*. **12**(4):410-415. doi:10.1016/j.ijid.2007.09.018.
- Wang, H., Wang, H., Bai, Y., Xu, X. e Zhou, G. 2018. Pathogenicity and antibiotic resistance of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from retailing chicken meat. *Food Science and Technology*. **90**:152–156. doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.029.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A realização deste estudo demonstrou a importância de investigar *Staphylococcus* coagulase negativa como contaminante de queijos Mussarela fracionados e fatiadores de frios da cidade de Garanhuns-PE. Altas contagens destes microrganismos foram detectadas, assim como diversas espécies isoladas foram capazes de formar biofilmes *in vitro*, com isto, mesmo que neste estudo não tenha sido detectado genes codificadores de enterotoxinas, o potencial risco de ocorrer surtos de intoxicação alimentar existe, já que há trabalhos que comprovaram a presença de genes de enterotoxinas em *Staphylococcus* coagulase negativa. Por esta razão, é de suma importância a realização de trabalhos posteriores objetivando treinamento dos manipuladores de alimentos com relação às Boas Práticas de Manipulação e Higienização.