

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELISA HIZURU UEMURA YAMANAKA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DA MICROBIOTA ISOLADA DE  
SALAMES E QUEIJOS ARTESANAIS EM DEZ CAPITALS BRASILEIRAS**

CURITIBA

2016

ELISA HIZURU UEMURA YAMANAKA

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DA MICROBIOTA ISOLADA DE  
SALAMES E QUEIJOS ARTESANAIS EM DEZ CAPITAIS BRASILEIRAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, como parte das exigências para obtenção de título de doutor.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Ida Chapaval Pimentel  
Co-orientadoras: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Patricia R. Dalzoto e  
Prof<sup>ª</sup>. Dra. Laura Lúcia Cogo

CURITIBA

2016

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Yamanaka, Elisa Hizuru Uemura

Caracterização fenotípica e genotípica da microbiota isolada de salames e queijos artesanais em dez capitais brasileiras. / Elisa Hizuru Uemura Yamanaka. – Curitiba, 2016.

95 f.: il. ; 30cm.

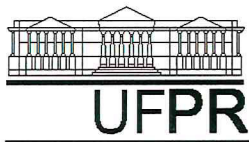
Orientador: Ida Chapaval Pimentel

Coorientadores: Patricia R. Dalzoto e Laura Lúcia Cogo

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

1. Virulencia (Microbiologia) 2 Alimentos - Qualidade 3. Intoxicação alimentar 4. Listeria 5. Salmonela I. Título II. Pimentel, Ida Chapaval III. Dalzoto, Patricia do Rocio IV. Cogo, Laura Lúcia V. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 576.64



Ministério da Educação  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**  
**SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
Departamento de Patologia Básica  
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

## TERMO DE APROVAÇÃO

**“CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE FATORES DE VIRULÊNCIA DA MICROBIOTA ISOLADA DE SALAMES E QUEIJOS ARTESANAIS EM 10 CAPITAIS BRASILEIRAS”**

por

**ELISA H. UEMURA YAMANAKA**

**Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos professores:**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ida Chapaval Pimentel - Presidente**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Débora D. Lückemeyer**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cristina Leise Bastos Monteiro**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Márcia Regina Beux**

**Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Keite Nogueira**

**Curitiba, 31 de março de 2016.**



*Dedico este trabalho,*  
*Aos pais, Hideomi e Mieko, pelos ensinamentos e exemplos de vida,*  
*Ao esposo Akira, aos filhos, Diogo e Gabriel, pelo amor, compreensão e apoio para todas as*  
*nossas conquistas,*  
*Ao professor, mestre e Dr. Carlos, que estará sempre presente entre nós com os teus*  
*ensinamentos*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por proporcionar a vida, energia e saúde e, uma natureza tão imensa e encantadora, com muito para se pesquisar sobre ela.

Ao professor, mestre e pesquisador da UFPR, Dr. Carlos Henrique Montanha Vianna, fundador da Laborclin, incentivador para que sigamos seu legado: “Estude sempre, “filha”. Ser “doutor” não significa nada, pois quanto mais estudamos, mais percebemos o quão ignorantes somos. Doenças transmitidas por micro-organismos se disseminam em progressão geométrica e, uma vez que se fez curso superior, tens como obrigação com a saúde pública, utilizar os conhecimentos visando conter tais doenças”.

À família, meus pais, exemplos de pessoas, que não mediram esforços para nos educar e, com simplicidade e sabedoria oriental nos ensinaram que o conhecimento é o bem mais valioso que devemos almejar. Agradeço muito pelo nome que me deram, o método ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) ajuda a diagnosticar várias doenças e salvar vidas. Família de agricultores, incentiva ainda mais para o que me cabe, adotando os conhecimentos da microbiologia para a a missão de produzir alimentos com qualidade e produtividade. Meus queridos, Akira, Diogo e Gabriel, preciosidades da minha vida, sempre incentivando minhas decisões pessoais e profissionais, e se sacrificando para mais esta conquista. Meus irmãos e cunhados, pela compreensão e apoio em inúmeros momentos, que além da ajuda que dão, muitas vezes dão o ombro fraterno para os momentos de dificuldades.

A todas as pessoas e entidades que, direta ou indiretamente contribuíram para a realização do presente trabalho. Nomear todos é uma tarefa quase impossível, pois todos foram de suma importância.

À Universidade Federal do Paraná, que além de oportunizar mais esta importante etapa de desenvolvimento profissional, foi onde graduei como Farmacêutica, Bioquímica

e Industrial, e mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia. Aos diversos laboratórios onde tive as portas abertas para a realização das pesquisas, em especial ao Laboratório de Microbiologia, Labmicro. Ao Laboratório de Neurobiologia por ter doado células HeLa para a realização da pesquisa.

Aos diretores da Laborclin, pelo incentivo, através do Programa Laborclin de Treinamento e Incentivo à Pesquisa (PLTIP), rebatizado em 2016 como “Pesquisar Mais”, e por permitir ausência ao trabalho para que este pudesse ser realizado.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia que, muito contribuíram para a realização deste trabalho, com ensinamentos, sugestões e críticas que não há como mesurar o valor. Prof. Ida, Patrícia, Laura, pela orientação, oportunidade, amizade, apoio, confiança, carinho, paciência e por tudo que me ensinam. Prof. Juliana, por ter orientado na realização da pesquisa com células. Prof. Adriana, por ter doado células HeLa. Prof. Nelson Nakazato da Universidade Estadual de Londrina, por ter doado linhagens de *Escherichia coli*. Prof. Larissa, Gisele e Élide, por proporcionar uso de equipamentos essenciais às análises realizadas. Prof. Cris, Márcia, Keite e Débora, da banca examinadora, por todas as sugestões visando enriquecimento do trabalho. Prof. Márcia e Wanda, muito obrigada por apoiar o estudo da microbiologia de alimentos.

Aos amigos, professores que me incentivaram para mais este desafio. Aos amigos da Laborclin pelo apoio e quem muito contribuíram para a realização do presente trabalho. Aos amigos do Labmicro pelos ensinamentos, amizade, apoio, incentivo, principalmente compreensão e paciência. Em especial à Dra. Mariana Porsani, quem não mediu esforços em me ajudar na etapa final dos experimentos. Aos amigos da Uniandrade pela oportunidade na disseminação de conhecimentos adquiridos em microbiologia.

A todos que colaboraram com a coleta das amostras de salames e queijos, principalmente em locais de difícil acesso.

"O conflito não é entre o bem e o mal, mas  
entre o conhecimento e a ignorância."

—Buddha

## RESUMO

Queijos e salames são alimentos prontos para consumo e artesanalmente produzidos são mais susceptíveis à contaminação microbiana. Poucos estudos tem verificado a qualidade desses alimentos provenientes de diferentes regiões do Brasil. Um dos parâmetros usados para avaliar a qualidade microbiológica de produtos de origem animal é a quantificação de *Escherichia coli*, *Staphylococcus* coagulase positiva, e pesquisa de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. A presença destes, além do risco de uma infecção ou intoxicação alimentar, indica contaminação e com isto, possibilidade de outras doenças com transmissão oral-fecal. Da mesma forma, a resistência a antimicrobianos com capacidade de aderência e formação de biofilme encontradas em cepas isoladas de alimentos, é preocupante do ponto de vista epidemiológico, pois indica disseminação de cepas resistentes. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica de 32 amostras de queijos e 13 de salames artesanais, adquiridos comercialmente, em casas de produtos artesanais ou feiras de produtores nas regiões metropolitana de dez capitais brasileiras. Análises microbiológicas com respectivas contagens de indicadores de contaminação microbiana, *Escherichia coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva, bem como pesquisa dos patógenos *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. foram realizadas através de métodos bacteriológicos. Além de pesquisar genes de virulência, diarreiogênicos ou codificadores de enterotoxina estafilocócica, avaliou-se o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos comumente utilizados na clínica humana, capacidade de formação de biofilme e aderência a células HeLa em *E. coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva. Nas amostras de queijos analisadas foram observadas *E. coli* em 50,0%, *Staphylococcus* coagulase positiva em 34,4% e *Salmonella* spp. em 6,3%. Nas amostras de salames foram observadas *Staphylococcus* coagulase positiva em 23,1% e *Salmonella* spp. em 7,7%. Nenhuma das amostras apresentou genes codificadores de *E. coli* diarreiogênicas. A pesquisa dos genes codificadores de enterotoxinas demonstrou a presença de genes *seg*, *sei*, *sen* e *seu*. Quanto ao perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, 28,9% das amostras apresentaram isolados resistentes a antimicrobianos. Resistência a duas ou mais classes de antimicrobianos foram observados em 20,0% das amostras. Todos os isolados apresentaram capacidade de formação de biofilme, e 26,7% das amostras apresentaram capacidade de aderência em células HeLa. De acordo com as regulamentações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), cerca de 51% das amostras de alimentos artesanalmente produzidas na Região Metropolitana de dez capitais brasileiras estavam impróprias para consumo, concluindo-se a importância de um monitoramento próximo e efetivo para prevenir surtos de origem alimentar. Apesar de não terem sido isoladas *E. coli* diarreiogênicas, a presença de *Staphylococcus* coagulase positiva enterotoxigênicas, isolados resistentes a antimicrobianos, capazes de formarem biofilmes e aderirem em células teciduais podem representar um potencial risco à saúde de seus consumidores.

**Palavras chave:** resistência antimicrobiana; intoxicação alimentar estafilocócica; genes de virulência; *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., qualidade microbiológica.

## ABSTRACT

Cheeses and fermented sausages are ready-to-eat foods, and the artisanal production process of these foods is susceptible to microbial contamination. Few studies have examined the quality of these foods from different Brazilian regions. One of the parameters used to evaluate the microbiological quality of animal origin products is the quantification of *Escherichia coli*, coagulase-positive staphylococci and the presence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*. The presence of them, besides the risk of food poisoning or an infection indicates contamination and thus, the possibility of other diseases with fecal-oral transmission. Similarly, resistance to antimicrobials with adhesion and biofilm formation found in isolated strains of foods worrisome from the epidemiological point, it indicates spread of resistant strains. In this context, the aim of this study was to evaluate the microbiological quality of 32 cheese samples and 13 fermented sausages purchased commercially from artisanal food houses or fair producers from the metropolitan area of ten Brazilian capitals. Microbiological analysis were conducted to determine the counts of microbial contamination indicators, including *E. coli* and coagulase-positive staphylococci, and evaluate the presence of pathogens like *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* using bacteriological methods. In addition to searching virulence genes, diarrheagenic or staphylococcal enterotoxin encoders evaluated the susceptibility profile to antimicrobials commonly used in human clinical, biofilm-forming ability and adherence to HeLa cells in *E. coli* and coagulase-positive staphylococci. *E. coli* was detected in 50.0% of samples, coagulase-positive staphylococci in 34.4%, and *Salmonella* spp. in 6.3%. In fermented sausage samples, we detected coagulase-positive staphylococci in 23.1% of samples and *Salmonella* spp. in 7.7%. None of the samples showed genes encoding diarrheagenic *E. coli*. The research of the genes encoding enterotoxins showed the presence of *seg*, *sei*, *sen* and *seu* genes. As for the susceptibility profile to antimicrobials, 28.9% of the samples had isolates resistant to antimicrobials. Resistance to two or more classes of antimicrobials were observed in 20.0% of samples. All isolates have biofilm formation capacity, and 26.7% of the samples adherence capacity in HeLa cells. According to Brazilian Health Regulatory Laws (ANVISA), about 51% of the artisanal food samples from the metropolitan areas of 10 capital cities were improper for consumption, indicating the importance of close monitoring of these foods and effective measures for preventing foodborne outbreaks. Although they have not been isolated *E. coli* diarrheagenic, the presence of enterotoxigenic coagulase-positive staphylococci isolates resistant to antimicrobials, capable of forming biofilms and adhere to tissue cells may represent a potential risk to the health of its consumers.

**Keywords:** Antimicrobial resistance, food poisoning, virulence genes, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., microbiological quality

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 - Fluxo de genes de resistência e mobilidade dos elementos genéticos através de microbioma de alimentos de origem animal, meio ambiente e população humana. ....	21
FIGURA 02 - Fluxograma de trabalho e publicações .....	25
FIGURA 03 - Aderência agregativa (AA) de <i>E. coli</i> às células HeLa (microscopia de 1000x) .....	58
FIGURA 04 - Aderência difusa (AD) de <i>E. coli</i> às células HeLa (microscopia de 1000x) .....	58
FIGURA 05 - Aderência localizada (AL) de <i>E. coli</i> às células HeLa (microscopia de 1000x) .....	59
FIGURA 06 - Gel de agarose 1,6% mostrando a amplificação das amostras para os genes <i>coa</i> , utilizando oligonucleotídeos iniciadores, <i>coa</i> .....	78
FIGURA 07 - Produtos de amplificação de diferentes genes de enterotoxinas analisadas por eletroforese em gel de agarose 1,6% .....	79
FIGURA 08 - Aderência às células HeLa de <i>Staphylococcus</i> (microscopia de 1000x) ..	80

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 01 - Iniciadores para prova de PCR para genes de <i>E. coli</i> diarreioogênicas .	53
QUADRO 02 - Iniciadores para prova de PCR para genes de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva enterotoxigênicos .....	75

## LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - Populações de coliformes, <i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva, <i>Salmonella</i> spp. e <i>Listeria</i> spp. de amostras de queijos e salames artesanais adquiridos comercialmente em área metropolitana de dez cidades brasileiras. ....	39
TABELA 02 - Resultado do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, fenótipos de virulência, formação de biofilme e padrão de aderência em células HeLa de <i>E. coli</i> . ....	57
TABELA 03 - Resultado do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, genótipos de virulência, formação de biofilme e aderência em células HeLa de <i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva. ....	78
TABELA 04 - Populações de <i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva, <i>Salmonella</i> spp. e <i>Listeria</i> spp. de amostras de queijos e salames artesanais adquiridos comercialmente em área metropolitana de dez cidades brasileiras, e potencial risco patogênico .....	90

## LISTA DE SIGLAS

AA	- Aderência Agregativa
AD	- Aderência Difusa
AL	- Aderência Localizada
ALOA	- <i>Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti</i> (ágar Listeria de acordo com Ottaviani e Agosti)
AMC	- Amoxicilina/acido clavulânico
AMI	- Amicacina
AMP	- Ampicilina
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i> (Coleção de Culturas Americana)
BHI	- <i>Brain Heart Infusion</i> (infusão de coração e cérebro)
CAZ	- Ceftazidima
CDC	- <i>Centers for Disease Control and Prevention</i> (Centro de Controle e Prevenção de Doenças)
CIA	- <i>Chloroform:Isoamyl alcohol</i> (clorofórmio:álcool isoamílico)
CIP	- Ciprofloxacina
CFL	- Cefalotina
CFO	- Cefoxitina
CFU	- <i>Colony Forming Unit</i> (Unidades formadoras de colônias)
CLO	- Cloranfenicol
CLSI	- <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> (Instituto de Padronização Clínica e Laboratorial)
CPM	- Cefepime
CRX	- Cefuroxima
CTAB	- <i>Cetyltrimethylammonium bromide</i> (brometo de cetiltrimetilamônio)
DAEC	- Difusamente aderente <i>E. coli</i>
DEC	- Diarreiogênica <i>E. coli</i>
DNA	- <i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)

dNTP	- <i>Deoxynucleoside triphosphate</i> (trifosfato de desoxinucleotídeo)
DO <sub>NC</sub>	- Densidade ótica do controle negativo
DTA	- Doenças Transmitidas por Alimentos
EAEC	- <i>E. coli</i> enteroagregativa
EIEC	- <i>E. coli</i> enteroinvasiva
ELISA	- <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i> (ensaio imunoenzimático)
EPEC	- <i>E. coli</i> enteropatogênica
ESBL	- <i>Extended Spectrum Beta-Lactamase</i> (Enterobacteriaceae produtora de $\beta$ - Lactamase de Espectro Extendido)
ETEC	- Enterotoxigênica <i>E. coli</i>
GEN	- Gentamicina
ISO	- <i>International Standard for Organization</i> (organização internacional para normalização)
KPC	- <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
MALDI-TOF	- <i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight</i> (ionização por dessorção a laser assistida por matriz – tempo de voo)
MDR	- Multidrogarresistência
MEM	- <i>Minimal Essential Medium</i> (meio mínimo essencial)
MER	- Meropenem
MKTTn	- Muller Kauffmann Tetracionato Novobiocina
MRSA	- <i>Meticillin resistant Staphylococcus aureus</i> ( <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina)
MSSA	- <i>Meticillin susceptible Staphylococcus aureus</i> ( <i>Staphylococcus aureus</i> sensível à meticilina)
NIT	- Nitrofurantoína
PBP	- <i>Penicillin binding protein</i> (proteína ligadora de penicilina)
PBS	- <i>Phosphate Buffered Saline</i> (Tampão Salina Fosfatada)
PCR	- <i>Polimerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia por polimerase)
PEN	- Penicilina
RIAL	- Revista Instituto Adolfo Lutz
RIF	- Rifampicina

RTE	- <i>Read-to-Eat</i> (alimento pronto para consumo)
SC	- Estafiloagulase
SEs	- <i>Staphylococcal Enterotoxins</i> (enterotoxinas estafilocócicas)
SFP	- <i>Staphylococcal Food Poisoning</i> (intoxicação alimentar estafilocócica)
STEC	- <i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga
SUT	- Sulfametoxazol/trimetoprim
TBE	- <i>Tris-borate ethylene diamine tetra acid buffer</i> (tampão Tris-borato ácido etileno diaminotetracético)
TEC	- Teicoplanina
TET	- Tetraciclina
TOB	- Tobramicina
TSB	- <i>Tryptic Soy Broth</i> (caldo tríptico de soja)
UFC	- Unidades Formadoras de Colônias
XLD	- <i>Xylose Lysine Deoxycholate</i> (desoxicolato de xilose e lisina)

### LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<i>agr</i>	- <i>accessory gene regulator</i> (gene regulador acessório)
ng	- Nanograma
pb	- Pares de base
kb	- Quilobase

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	18
1.1	OBJETIVOS .....	23
1.1.1	Objetivo Geral .....	23
1.1.2	Objetivos Específicos .....	24
1.2	FLUXOGRAMA DE TRABALHO .....	24
	REFERÊNCIAS .....	26
<b>2</b>	<b>QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS E SALAMES ARTESANAIS BRASILEIROS</b> .....	30
2.1	INTRODUÇÃO .....	32
2.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	35
2.2.1	Coleta de amostras e identificação .....	35
2.2.2	Análise microbiológica .....	35
2.2.3	Purificação de colônias .....	37
2.3	RESULTADOS .....	37
2.4	DISCUSSÃO .....	40
2.5	CONCLUSÃO .....	42
	REFERÊNCIAS .....	43
<b>3</b>	<b>AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS, POTENCIAL DIARREIOGÊNICO, FORMAÇÃO DE BIOFILME E CAPACIDADE DE ADERÊNCIA A CÉLULAS HeLa DE <i>Escherichia coli</i> ISOLADAS DE QUEIJOS ARTESANAIS EM CAPITAIS BRASILEIRAS</b> .....	46
3.1	INTRODUÇÃO .....	49
3.2	MATERIAL E METODOS .....	51
3.2.1	Amostras e Isolados Bacterianos .....	51
3.2.2	Identificação dos Isolados .....	51
3.2.3	Extração de ácido desoxirribonucléico (DNA) .....	52
3.2.4	Pesquisa de Genes de Virulência por PCR .....	52
3.2.5	Avaliação do Perfil de Susceptibilidade a Antimicrobianos .....	54
3.2.6	Formação de biofilme .....	54

3.2.7	Teste de aderência às células teciduais .....	55
3.3	RESULTADOS .....	55
3.4	DISCUSSÃO .....	59
3.5	CONCLUSÃO .....	61
	REFERÊNCIAS .....	63
<b>4</b>	<b><i>Staphylococcus</i> COAGULASE POSITIVA ISOLADO DE QUEIJOS E SALAMES ARTESANAIS EM CAPITALS BRASILEIRAS: ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS, SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA, FORMAÇÃO DE BIOFILME E TESTE DE ADERÊNCIA .....</b>	<b>68</b>
4.1	INTRODUÇÃO .....	70
4.2	MATERIAL E MÉTODOS .....	73
4.2.1	Extração de ácido desoxirribonucléico (DNA) .....	73
4.2.2	Pesquisa de Genes de Virulência por PCR .....	74
4.2.3	Avaliação do Perfil de Susceptibilidade a Antimicrobianos .....	75
4.2.4	Formação de biofilme .....	76
4.2.5	Teste de aderência às células teciduais .....	77
4.3	RESULTADOS .....	77
4.4	DISCUSSÃO .....	81
4.5	CONCLUSÃO .....	83
	REFERÊNCIAS .....	85
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>89</b>
	<b>APÊNDICE 1 .....</b>	<b>90</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

A busca dos consumidores por alimentos mais saudáveis tornou crescente a valorização dos produtos orgânicos, que passaram a ser associados à tradição, à natureza, ao artesanal e ao local, sendo o queijo o de maior presença entre os produtos agroindustriais (WESZ JUNIOR, TRENTIN e FILIPPI, 2008; GAZOLLA, NEIDERLLI e WAQUIL, 2012). O Brasil possui inúmeras pequenas agroindústrias, que podem não seguir as boas práticas de fabricação encontradas em grandes centros industrializados, fazendo com que os micro-organismos ali presentes se proliferem e disseminem. A falta de condições higiênicas para o processamento e o uso de água de poços no processamento, sem desinfecção prévia, favorece a proliferação bacteriana (WESZ JUNIOR, TRENTIN e FILIPPI, 2008).

Micro-organismos da microbiota intestinal normal de homens e animais como *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus* e bacilos Gram-negativos, incluindo os coliformes e *Escherichia coli*, são considerados indicadores de contaminação fecal em água e alimentos (SILVA *et al.*, 2010). A maioria das doenças transmitidas por alimentos (DTA) no Brasil são causadas por *Salmonella* spp., *E. coli* diarreiogênica (DEC) e *Clostridium perfringens*, e por toxinas de *S. aureus* e *Bacillus cereus* (BRASIL, 2015).

*E. coli* é o principal habitante comensal do intestino humano e de animais endotérmicos e faz parte essencial da microbiota que mantém a fisiologia de hospedeiros saudáveis. É também considerada indicador microbiológico de contaminação fecal ou qualidade de processo; além de algumas linhagens causarem diarreia (SILVA *et al.*, 2010; PUÑO-SARMIENTO *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2014).

Coliformes são indicadores microbianos de higiene em processamento de alimentos e são afetados por fatores como qualidade de matéria-prima, falhas durante processamento ou contaminação pós-processamento em alimentos pasteurizados. Eles são facilmente destruídos por calor e muitas vezes não conseguem sobreviver ao tratamento térmico (SILVA *et al.*, 2010; VISOTTO *et al.*, 2011).

A presença de *S. aureus* em leite e derivados sugere o uso de matéria prima de animais infectados (mastite) ou a probabilidade do agente contaminante ter sido introduzido através de manipuladores assintomáticos (VISOTTO *et al.*, 2011). O agente

causador de intoxicação alimentar estafilocócica (SFP) inclui enterotoxinas estafilocócicas (SEs) e exotoxinas pré-formadas por *S. aureus* em alimentos. SEs são produzidas quando a população do patógeno é maior ou igual a 5 log UFC g<sup>-1</sup> de alimento (Unidades Formadoras de Colônias) (VISOTTO *et al.*, 2011).

A salmonelose, causada pela enterobactéria *Salmonella* spp., constitui uma importante doença entérica, tanto em seres humanos quanto em outros animais. A cada ano, estima-se que ocorram 1,4 milhões casos de salmonelose em seres humanos nos Estados Unidos, resultando em 16.000 hospitalizações e aproximadamente 600 mortes. As infecções humanas por salmonelas são mais comumente causadas pela ingestão de alimentos, água e leite contaminados por fezes humanas ou de animais (WINN *et al.*, 2008).

*Listeria monocytogenes* é um bacilo Gram-positivo curto, patogênica e, portadores assintomáticos podem liberá-la nas fezes. Amplamente distribuída na natureza, pode provocar a doença chamada listeriose, cujo desenlace na população de maior risco, representada por crianças, idosos, gestantes e pessoas imunodeprimidas, pode ser grave, levando a óbito em 20 a 30% dos casos. Também está associada à contaminação do leite através da ingestão pelos bovinos de silagem contaminada (WINN *et al.*, 2008). Dentre as medidas de controle da *L. monocytogenes* em alimentos pronto para consumo está o uso de agente aprovados que a reduza ou a elimine (BRASIL, 2009). Agentes conservadores como nitrito, sulfito, propionato, sorbato, benzoato, o antibiótico natamicina, ou bacteriocinas reduzem ou inibem a multiplicação de micro-organismos patogênicos e/ou deteriorantes (KRUGER, 2006).

Com o passar dos anos o homem vem inserindo em seu habitat uma quantidade cada vez maior de antibióticos. Doenças diarreicas raramente requerem tratamento antimicrobiano e podem ser prevenidas pela melhoria das condições de vida, no entanto, a sua ampla utilização indevida diminui a eficácia de medicamentos financeiramente acessíveis e disponíveis, o que representa um sério problema quando é necessário o tratamento (KARIUKI, 2010).

O uso de antimicrobianos como fator de crescimento animal e também ao combate de patógenos tanto de animais como de plantas na agroindústria, bem como o reaproveitamento de material orgânico proveniente de fezes animais ou lodo de esgoto

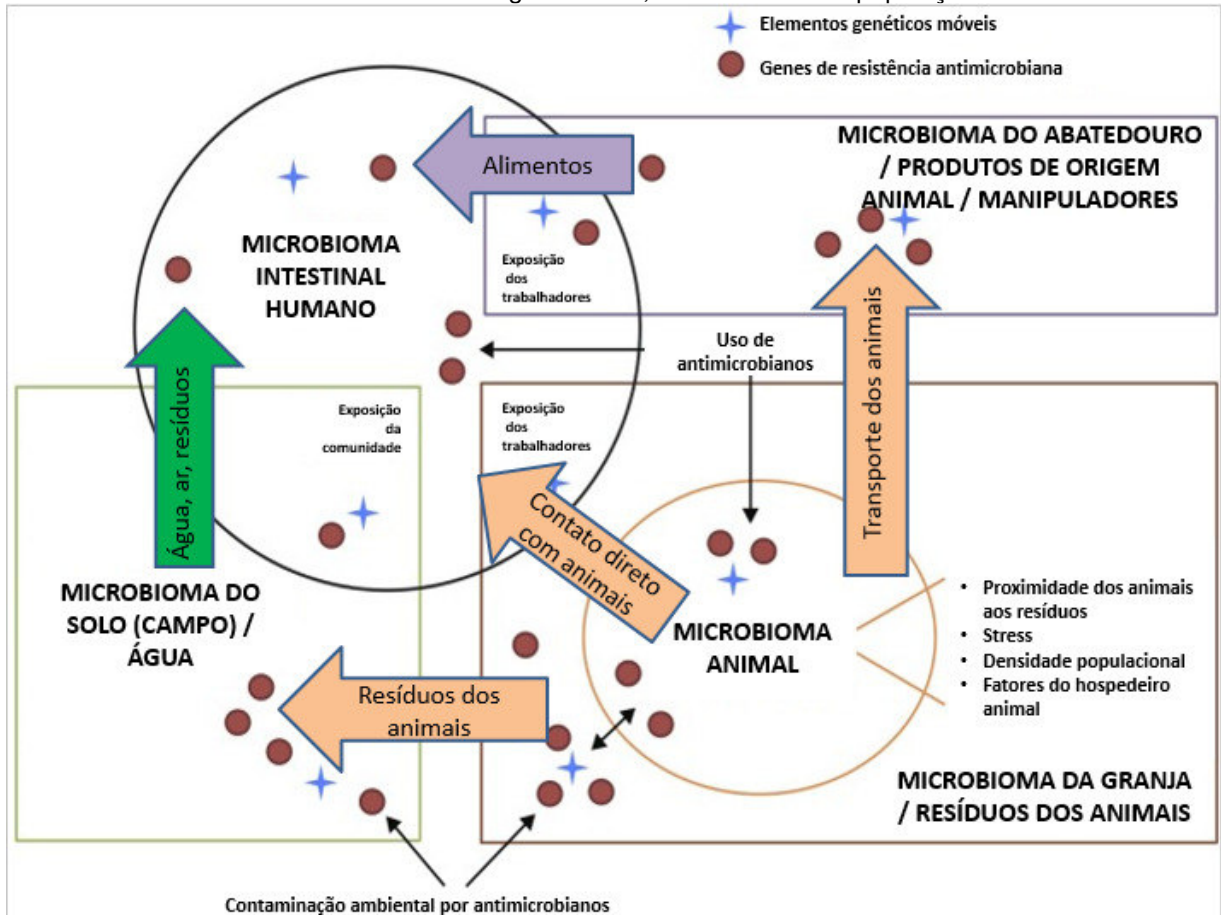
como fonte de adubação propicia o aumento de incidência de micro-organismos resistentes e tem contribuído para a disseminação de micro-organismos carregando genes de resistência, denominados resistomas, através de alimentos, homens, animais e ambiente (SILBERGELD, GRAHAM e PRICE, 2008; COLLIGNON *et al.*, 2009; SALHSTROM *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2010; SMALLA, 2011; AIDARA-KANE, 2012; HEUER e SCHMITT, 2011; ORAND, 2012; SATO *et al.*, 2014; YOU e SILBERGELD, 2014).

A resistência antimicrobiana aumenta, enquanto o desenvolvimento de novos antibióticos diminuem. Em apenas oito décadas de uso de antibióticos, as infecções bacterianas que antes eram facilmente tratadas estão se tornando intratáveis. Os antimicrobianos têm permitido o avanço das diversas áreas da prática médica. No entanto, resistência aos antibióticos, representa uma grave ameaça para grande parte da saúde. A resistência aos antibióticos se correlaciona com o uso de antibióticos, de modo que a melhoria da administração de antimicrobianos, com uma melhor prevenção e diagnóstico de infecção, pode ajudar a conservar os agentes antimicrobianos atualmente disponíveis (MACGOWAN e MACNAUGHTON, 2013).

Terapias com antimicrobianos são importantes ao combate aos micro-organismos causadores de doenças e manutenção da saúde do hospedeiro. No entanto, a exposição da microbiota intestinal aos antibióticos pode conduzir ao decréscimo da susceptibilidade e desenvolver organismos multi droga resistentes através da redução da colonização intrínseca e transferência de genes de resistência (MACFARLANE, 2014).

Não se conhecem fronteiras para o problema da resistência antimicrobiana, onde micro-organismos fármaco-resistentes podem se mover entre as pessoas e animais, de um país para outro (SOSA *et al.*, 2010). You e Silbergeld (2014) representaram (Figura 1) a estrutura conceitual para entender o fluxo de genes de resistência e elementos genéticos móveis através de microbiomas entre animais o ambiente e a população humana.

**FIGURA 01** – Fluxo de genes de resistência e mobilidade dos elementos genéticos através de microbioma de alimentos de origem animal, meio ambiente e população humana.



FONTE: adaptado de You e Silbergeld (2014).

São seis os maiores patótipos de *E. coli* diarreio gênicas, que se diferenciam com base nos fatores de virulência, no padrão de adesão a células HeLa e sintomas clínicos (PUÑO-SARMIENTO, 2014). *E. coli* enteropatogênica (EPEC), aderência localizada, gene *eaeA* (TRABULSI, KELLER e TARDELLI GOMES, 2002), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), gene toxigênico, *est* e *elt* (QADRI *et al.*, 2005), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), aderência agregativa, gene *aggR* (ESTRADA-GARCIA e NAVARRO-GARCIA, 2012), *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (Le BOUGUÉNEC e SERVIN, 2006), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), gene de invasão, *ipaH* (CROXEN *et al.*, 2013) e *E. coli* produtoras

de toxina Shiga (STEC), genes *stx1* e *stx2* (BLANCO *et al.*, 2004; CROXEN *et al.*, 2013; DESIN, TOWNSEND e POTTER, 2015).

A SFP resulta da ingestão de alimento contendo toxina estafilocócica enterotoxigênica produzida durante a multiplicação de estafilococos e os efeitos são em nível de trato gastrointestinal (GUIMARÃES *et al.*, 2013). A produção da toxina no alimento processado, principalmente cárneos e lácteos, se dá durante a sua manipulação e subsequente estocagem em temperaturas elevadas. Os sintomas aparecem rapidamente e incluem náuseas, vômitos violentos, com ou sem diarreia (ARGUDIN, MENDOZA e RODICIO, 2010; OMOE *et al.*, 2013). Enterotoxina A (SEA) e enterotoxina D (SED) são as SE mais comumente observadas nas SFP. Estas SE, juntamente com as enterotoxinas B (SEB), C (SEC), E (SEE) são as mais conhecidas. Recentemente foram reportadas as toxinas SEG, SEH, SEI, SER, SES e SET, e as enterotoxinas-like (SEI) SEIJ, SEIK, SEIL, SEIM, SEIN, SEIO, SEIP, SEIQ, SEIU, e SEIV. Até agora, mais de 20 SE foram descritas (HENNEKINNE, 2010; ALIBAYOV, *et al.* 2014). Enterotoxina A, seja sozinha ou com outras é a mais comumente reportada nos alimentos, e é considerada como a principal causa de SFP, provavelmente devido a sua extraordinária resistência a enzimas proteolíticas (ARGUDIN, MENDOZA e RODICIO, 2010; GUIMARÃES *et al.*, 2013; NAGARAJ *et al.*, 2014).

Formação de biofilme é um potencial fator de virulência, especialmente para *S. aureus* em ambiente de processamento de leite devido à capacidade em se fixar a superfícies de aço inoxidável ou borracha. Biofilmes são um conjunto de células bacterianas enclausuradas numa matriz polimérica e aderidas a uma superfície inerte ou viva, que se acumulam, amadurecem e que se destacam para disseminação e persistência dos micro-organismos (LEE *et al.*, 2013). Esta propriedade que *Staphylococcus* spp. possuem contribui para a aderência e colonização do epitélio da glândula mamária nas mastites bovinas. A estrutura de biofilme protege a bactéria contra altas concentrações antimicrobianas e fagocitose, permitindo a sobrevivência em ambientes hostis no hospedeiro (XUE, CHEN e SHANG, 2014).

Para avaliar o risco de consumo de alimentos contaminados é necessário avaliar as amostras, não só sob o aspecto vinculado aos aspectos higiênico-sanitários, mas principalmente aos vinculados à incidência de isolados com fatores de virulência e

resistência antimicrobiana, bem como capacidade de aderência em células e formação de biofilme em superfícies. A avaliação da resistência aos antimicrobianos em micro-organismos considerados indicadores de contaminação fecal em alimentos irá contribuir para o conhecimento sobre a disseminação de micro-organismos resistentes pelo território brasileiro. Estudos anteriores foram realizados por Yamanaka (2011), envolvendo a determinação de bactérias indicadoras de contaminação fecal em água, resistentes a antimicrobianos, onde foram isoladas cepas de *E. coli* e *Enterococcus* spp resistentes a antimicrobianos em águas disponíveis em fontes de parques públicos, minas ou poços da Região Metropolitana de Curitiba.

A escolha de salame e queijos se deve ao fato de serem produtos de origem animal, prontos para consumo, e estão numa categoria de risco maior que outros alimentos preparados usando calor para cozimento (MARTINS *et al.*, 2015).

A importância deste trabalho está no fato de poucos estudos tem sido conduzidos simultaneamente cobrindo diferentes regiões do Brasil. A área metropolitana foi incluída na análise pois alguns municípios possuem o serviço de vigilância efetiva para a venda de alimentos artesanais.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Isolar indicadores microbianos de contaminação, bem como patógenos presentes em salames e queijos com alto teor de umidade, produzidos artesanalmente, nas regiões metropolitanas de dez capitais brasileiras (Porto Alegre, Curitiba, Belo Horizonte, Recife, Natal, Fortaleza, Manaus, Brasília, São Paulo e Salvador) e investigar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, fatores de virulência, bem como capacidade de formação de biofilme e padrão de aderência às células HeLa.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Quantificar coliformes totais, *E. coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva de amostras de salame e queijo com alto teor de umidade produzidos artesanalmente, pelo método de semeadura em meio de cultura e identificá-los por métodos fenotípicos.
- Isolar patógenos *Listeria* spp. e *Salmonella* spp., de amostras de salame e queijo com alto teor de umidade produzidos artesanalmente, pelo método de semeadura em meio de cultura e identificá-los por métodos fenotípicos.
- Avaliar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de isolados de *E. coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva, através do método de disco difusão em ágar.
- Pesquisar genes de virulência de isolados de *E. coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva utilizando oligonucleotídeos iniciadores específicos.
- Avaliar a capacidade de formação de biofilme e de aderência em células HeLa de isolados de *E. coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva.
  - Correlacionar os isolados aos padrões regulamentares e potencial risco patogênico de consumo por seres humanos.

### 1.2 FLUXOGRAMA DE TRABALHO

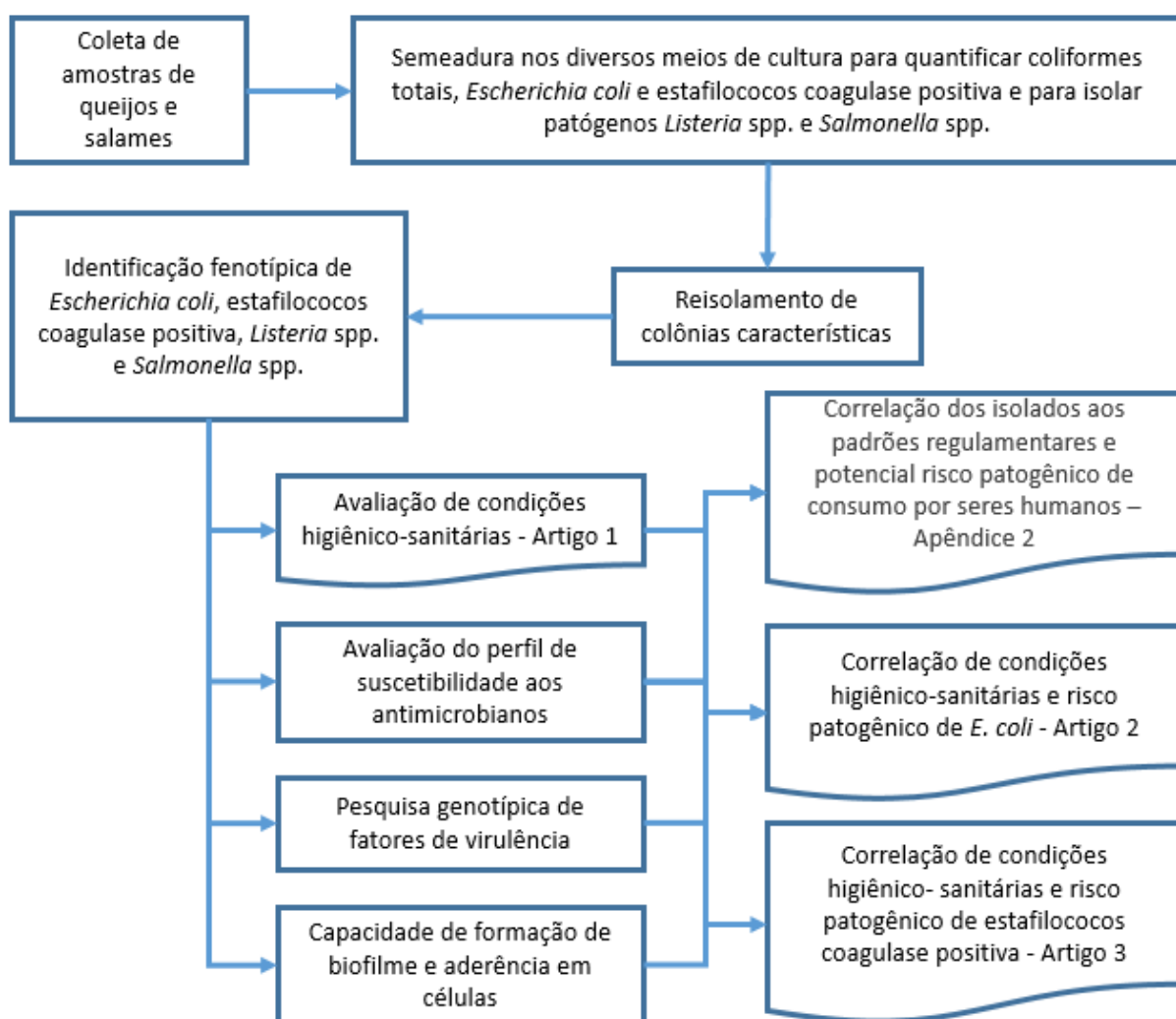
Conforme Figura 2, o estudo está subdividido em três partes:

- Qualidade microbiológica de queijos e salames artesanais brasileiros. Está apresentado no item 2, formato de artigo.
- Avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, potencial diarreiogênico, formação de biofilme e capacidade de aderência a células HeLa de *E. coli* isoladas de

queijos artesanais em capitais brasileiras. Está apresentado no item 3, formato de artigo.

- *S. aureus* isolado de queijos e salames artesanais em capitais brasileiras: enterotoxinas estafilocócicas, susceptibilidade antimicrobiana, formação de biofilme e teste de aderência. Está apresentado no item 4, formato de artigo.
- Correlação dos isolados aos padrões regulamentares e potencial risco patogênico de consumo por seres humanos. Está apresentado no APENDICE 1.

FIGURA 02 – Fluxograma do trabalho e publicações



## REFERÊNCIAS

AIDARA-KANE, A. Containment of antimicrobial resistance due to use of antimicrobial agents in animals intended for food: WHO perspective. **Scientific and Technical Review**, v. 1, p. 277-287, 2012.

ALIBAYOV, B.; ZDENKOVA, K.; SYKOROVA, H.; DEMNEROVA, K. Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands (SaPI) and their superantigens combination of food samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 107, p. 197–204, 2014.

ARGUDÍN, M.Á.; MENDOZA, M.C.; RODICIO, M.R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**, v. 2, n.7, p. 1751-1773, 2010.

BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; MORA, A.; DAHBI, G.; ALONSO, M.P.; GONZÁLEZ, E.A.; BERNÁRDEZ, M.I.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae-xi). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 645-651, 2004.

Le BOUGUÉNEC, C.; SERVIN, A.L. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. **FEMS Microbiology Letters**, v. 256, p. 185–194, 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde. ANVISA. RDC 12. **Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**. 02 de janeiro de 2001.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária – SDA. Ofício Circular DIPOA nº 12/09. **Institui os Procedimentos de Controle da *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal, prontos para o consumo**. 22 de abril de 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual Integrado de Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos**. Disponível em: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_integrado\\_prevencao\\_doencas\\_alimentos.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_prevencao_doencas_alimentos.pdf). Acesso em: 21.11.15.

COLLIGNON, P.; POWERS, J.H.; CHILLER, T.M.; AIDARA-KANE, A.; AARESTRUP, F.M. World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: A critical step for developing risk management strategies for the use of antimicrobials in food production animals. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 1, p.132-141, 2009.

CROXEN, M.A.; LAW, R.J.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K.M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B.B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiological Reviews**, v. 26, p. 822-880, 2013.

DESIN, T.S.; TOWNSEND, H.G.; POTTER, A.A. Antibodies Directed against Shiga-Toxin Producing *Escherichia coli* Serotype O103 Type III Secreted Proteins Block Adherence of Heterologous STEC Serotypes to HEP-2 Cells. **PLoS One**, v. 10, n. 10, e0139803, 2015. Disponível em: DOI:10.1371/journal.pone.0139803. Acesso em: 17.04.2016.

ESTRADA-GARCIA, T.; NAVARRO-GARCIA, F. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 66, p. 281–298, 2012.

GAZOLLA, M.; NEIDERLLI, P.A.; WAQUIL, P.D. Agregação de Valor nas Agroindústrias Rurais: uma análise com base nos dados do Censo Agropecuário. **Revista Paranaense de Desenvolvimento**, n.122, p.241-262, 2012.

GUIMARÃES, F.F.; NÓBREGA, D.B.; RICHINI-PEREIRA, V.B.; MARSON, P.M.; PANTOJA, J.C.F.; LANGONI, H. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 5, p.2866–2872, 2013.

HENNEKINNE, J.A.; OSTYN, A.; GUILLIER, F.; HERBIN, S.; PRUFER, A.L.; DRAGACCI, S. How Should Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks Be Characterized? **Toxins**, v. 2, n. 8, p. 2106–2116, 2010.

HEUER, H.; SCHMITT, H.; SMALLA, K. Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, p. 236-243, 2011.

KARIUKI, S. Antimicrobial resistance in enteric pathogens in developing countries. In: SOSA, A. J.; BYARUGABA, D. K.; AMÁBILE-CUEVAS, C. F.; HSUEH, P. R.; KARIUKI, S.; OKEKE, I. N. **Antimicrobial resistance in developing countries**. London: Springer, p. 177-197, 2010.

KRUGER, M. F. **Controle de *Listeria monocytogenes* em linguiça fresca refrigerada através do uso de óleo essencial do orégano e nisina**. 91 p. Dissertação (grau de Mestre em Ciência dos Alimentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

LEE, C.; CHO, I.H.; JEONG, B.C.; LEE, S.H. Strategies to Minimize Antibiotic Resistance. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, p. 4274-4305, 2013.

MACFARLANE, S. Antibiotic treatments and microbes in the gut. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 919-924, 2014.

MACGOWAN, A.; MACNAUGHTON, E. Antibiotic resistance. **Medicine**, v. 41, n. 11, p. 642-648, 2013.

MARTINS, J.M.; GALINARI, É.; PIMENTEL-FILHO, N.J.; RIBEIRO JR, J.I.; FURTADO, M.M.; FERREIRA, C.L. Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 219-230, 2015.

NAGARAJ, S.; RAMLAL, S.; SRIPATHY, M.H.; BATRA, H.V. Development and evaluation of a novel combinatorial selective enrichment and multiplex PCR technique for molecular detection of major virulence-associated genes of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food samples. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 2, p. 435-446, 2014.

OMOE, K.; HU, D.L.; ONO, H.K.; SHIMIZU, S.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; ET ALUCHIYAMA, T.; SHINAGAWA, K.; OMANISHI, K. Emetic potentials of newly identified staphylococcal enterotoxin-like toxins. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 10, p. 3627-3631, 2013.

ORAND, J.P. Antimicrobial resistance and the standards of the World Organization for Animal Health. **Scientific and Technical Review**, v. 1, p.335-42, 325-334, 2012.

PUÑO-SARMIENTO, J.; GAZAL, L.E.; MEDEIROS, L.P.; NISHIO, E.K.; KOBAYASHI, R.K.; NAKAZATO, G. Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from avian organic fertilizers. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, n. 9, p. 8924-8939, 2014.

QADRI, F.; SVENNERHOLM, A.M.; FARUQUE, A.S.G.; SACK, R.B. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, p. 465–483, 2005.

SALHSTROM, L.; REHBINDER, V.; ALBIHN, A.; ASPAN, A.; BENGTSSON, B. Vancomycin resistant enterococci (VRE) in Swedish sewage sludge. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 51, n. 24, 2009. Disponível em: <http://www.actavetscand.com/content/51/1/24>. Acesso em: 17.04.2016.

SATO, T.; OKUBO, T; USUI, M.; YOKOTA, S.; IZUMIYAMA, S.; TAMURA, Y. Association of veterinary third-generation cephalosporin use with the risk of emergence of extended-spectrum-cephalosporin resistance in *Escherichia coli* from dairy cattle in Japan. **PLoS One**, v. 9, n. 4, e96101, 2014. Disponível em: doi:10.1371/journal.pone.0096101. Acesso em: 17.04.2016.

SILBERGELD, E.K.; GRAHAM, J.; PRICE, L.B. Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. **Annual Review of Public Health**, v. 29, p.151-169, 2008.

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

SILVA, F.F.P.; HORVATH, M.B.; SILVEIRA, J.G.; PIETA, L. TONDO, E.C. Occurrence of *Salmonella* spp. and generic *Escherichia coli* on beef carcasses sampled at a Brazilian slaughterhouse. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 17-23, 2014.

SOSA, A. J.; BYARUGABA, D. K.; AMÁBILE-CUEVAS, C. F.; HSUEH, P. R.; KARIUKI, S.; OKEKE, I. N. **Antimicrobial resistance in developing countries**. London: Springer, 548p., 2010.

TRABULSI, L.R.; KELLER, R.; TARDELLI GOMES, T.A. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 508–513, 2002.

VISOTTO, R.G.; OLIVEIRA, M.A.; PRADO, S.P.T.; BERGAMINI, A.M.M. Queijo Minas Frescal: perfil higiênico-sanitário e avaliação da Rotulagem. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 1, p. 8-15, 2011.

XUE, T.; CHEN, X.; SHANG, F. Effects of lactose and milk on the expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from a dairy cow with mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 10, p. 6129–6134, 2014.

WESZ JUNIOR, V.J.; TRENTIN, I.C.L.; FILIPPI, E.E. **Os reflexos das agroindústrias familiares para o desenvolvimento das áreas rurais no Brasil**. IV Congresso Internacional de La Red SIAL. Argentina, Mar Del Plata, 27 al 31 de octubre de 2008.

WINN, W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. **Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

YAMANAKA, E. H. U. **Incidência, fatores de virulência e resistência a antibióticos de *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp. isolados como indicadores de contaminação fecal em água de consumo de fontes alternativas de Curitiba e região metropolitana**. 147 p. Dissertação (grau de Mestre em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

YANG, H.; BYELASHOV, O.A.; GEORNARAS, I.; GOODRIDGE, L.D.; NIGHTINGALE, K.K.; BELK, K.E.; SMITH, G.C.; SOFOS, J.N. Presence of antibiotic-resistant commensal bacteria in samples from agricultural, city, and national park environments evaluated by standard culture and real-time PCR methods. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 56, n. 9, p.761-770, 2010.

YOU, Y.; SILBERGELD, .EK. Learning from agriculture: understanding low-dose antimicrobials as drivers of resistome expansion. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 284, p. 1-10, 2014. Disponível em: doi: 10.3389/fmicb.2014.00284. Acesso em 17.04.2016.

## 2 QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE QUEIJOS E SALAMES ARTESANAIS BRASILEIROS

O presente artigo foi aceito para publicação pela revista Instituto Adolfo Lutz (RIAL) com número 1209, última revisão 19/01/16, submetido em inglês, Apêndice 1, aqui traduzido.

### ABSTRACT

Cheeses and fermented sausages are ready-to-eat foods, and the artisanal production process of these foods is susceptible to microbial contamination. Few studies have examined the quality of these foods from different Brazilian regions. The aim of this study was to evaluate the microbiological quality of 32 cheese samples and 13 fermented sausages purchased commercially from artisanal food houses or fair producers from the metropolitan areas of 10 Brazilian capitals. Microbiological analysis was conducted to determine the counts of microbial contamination indicators, including *Escherichia coli* and coagulase-positive staphylococci, as well as evaluating the presence of pathogens like *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp using bacteriological methods. *E. coli* was detected in 50.0% of samples, coagulase-positive staphylococci in 34.4%, and *Salmonella* spp. in 6.3%. In fermented sausage samples, we detected coagulase-positive staphylococci in 23.1% of samples and *Salmonella* spp. in 7.7%. According to Brazilian Health Regulatory Laws, approximately 63% of the cheese samples and 23% of the artisanally produced fermented sausage samples from the metropolitan areas of 10 capital cities were improper for consumption, indicating the importance of close monitoring of these foods and effective measures for preventing foodborne outbreaks.

**Keywords.** *Escherichia coli*, coagulase-positive staphylococci, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., microbiological quality

## RESUMO

Queijos e salames são alimentos prontos para consumo e quando artesanalmente produzidos são susceptíveis à contaminação microbiana. A importância do estudo com dez capitais brasileiras deve-se à carência de dados obtidos simultaneamente abrangendo diferentes regiões do Brasil. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica de 32 amostras de queijos e 13 de salames artesanais, adquiridos comercialmente, em casas de produtos artesanais ou feiras de produtores nas regiões metropolitana de dez capitais brasileiras. Análises microbiológicas com respectivas contagens de indicadores de contaminação microbiana, *Escherichia coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva, bem como pesquisa dos patógenos *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. foram realizadas através de métodos bacteriológicos. Nas amostras de queijos analisadas foram observadas *E. coli* em 50,0%, *Staphylococcus* coagulase positiva em 34,4% e *Salmonella* spp. em 6,3%. Nas amostras de salames foram observadas *Staphylococcus* coagulase positiva em 23,1% e *Salmonella* spp. em 7,7%. De acordo com a legislação sanitária brasileira, cerca de 63% das amostras de queijos e 23% das amostras dos salames artesanais analisadas da Região Metropolitana de dez capitais brasileiras estavam impróprias para consumo, concluindo-se a importância de um monitoramento próximo e efetivo para prevenir surtos de origem alimentar.

**Palavras - chave.** *Escherichia coli*. *Staphylococcus* Coagulase Positiva. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., qualidade microbiológica

## 2.1 INTRODUÇÃO

Queijos e salames artesanais são produzidos em muitos países e tem tido propriedades específicas dependendo da região onde são fabricados. Alimentos artesanais são produzidos principalmente pelo trabalho familiar para aumentar sua renda. Em muitos casos, estas famílias não possuem recursos suficientes para adaptar sua produção e melhorar a qualidade, principalmente por questões de falta de investimentos de agências governamentais responsáveis pelo seu desenvolvimento. Alimentos prontos para consumo, tais como queijos e salames, estão numa categoria de risco maior do que outros alimentos que são preparados usando a etapa de calor para o cozimento (MARTINS *et al.*, 2015). Queijos caseiros tem sido a segunda causa mais comum de surtos alimentares causados por queijos fabricados com leite não pasteurizado entre 1998-2011 (GOULD, MUNGAI e BEHRAVESH, 2014).

A ocorrência de doenças transmitidas por alimentos tem aumentado mundialmente. Muitos fatores tem contribuído para a emergência destas doenças, como o aumento da exposição da população a alimentos prontos para consumo. Surtos de doenças transmitidas por alimentos podem ser definidos como a ocorrência de dois ou mais casos de doenças semelhantes resultantes da ingestão de um alimento em comum. Entre 1998-2011, 90 surtos alimentares onde o queijo foi o alimento responsável foram reportados pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) Estes surtos resultaram em 1882 doentes, 230 internamentos hospitalares e seis mortes (GOULD, MUNGAI e BEHRAVESH, 2014). A maioria das doenças transmitidas por alimentos no Brasil são causadas por bactérias como *Salmonella spp.*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella spp.*, *Bacillus cereus*, e *Clostridium perfringens* (BRASIL, 2015).

Para avaliar a qualidade microbiológica de alimentos de origem animal, a quantificação de *E. coli* e a presença de *Salmonella spp.* são usados no mundo todo pois estes micro-organismos são bons indicadores de qualidade e segurança alimentar (SILVA *et al.*, 2014). *E. coli* é o maior habitante comensal do intestino humano e de animais de sangue quente e faz parte essencial da microbiota que mantém a fisiologia da saúde de seu hospedeiro. Esta bactéria é também considerada como indicador de contaminação fecal ou qualidade de processamento; no entanto algumas linhagens

podem causar diarreia (SILVA *et al.*, 2010a; SILVA *et al.*, 2014; PUÑO-SARMIENTO *et al.*, 2014).

Coliformes são indicadores microbianos de higiene em processamento de alimentos e são afetados por fatores como a qualidade de matéria prima, falha durante processamento, ou contaminação durante pós-processamento em alimentos pasteurizados. Estes são facilmente destruídos por calor e geralmente não sobrevivem ao tratamento por calor (SILVA *et al.*, 2010a; VISOTTO *et al.*, 2011).

A presença de *S. aureus* no leite e seus derivados sugere a utilização de matérias-primas provenientes de animais infectados (mastite) ou uma provável contaminação introduzida por manipuladores portadores assintomáticos. Os agentes causadores de intoxicação alimentar estafilocócica incluem enterotoxinas estafilocócicas (SEs) e exotoxinas pré-formadas pelo *S. aureus* em alimentos. SE são produzidos quando a população de agentes patogênicos é maior do que ou igual a  $5 \log \text{UFC.g}^{-1}$  (Unidade Formadora de Colônias) de alimento (VISOTTO *et al.*, 2011).

A salmonelose é uma zoonose de grande importância e uma grande preocupação para a saúde pública mundial (KOTTWITZ *et al.*, 2010; ELHADI, ALJINDAN e ALJELDAH, 2013; TADESSE e GEBREMEDHIN, 2015). Os sorotipos mais prevalentes de *Salmonella* spp. variam geograficamente e ao longo do tempo (KOTTWITZ *et al.*, 2010). No geral, nos Estados Unidos, a incidência de salmonelose não tem diminuído ao longo das últimas décadas; e a incidência aumentou substancialmente para alguns sorotipos e diminuiu para os outros (KOTTWITZ *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2014).

Processadores de alimentos, particularmente aquelas que produzem produtos pronto para consumo, devem estar vigilantes contra a *Listeria monocytogenes*, o patógeno causador de listeriose (BRASIL, 2009; LEONG, ALVAREZ-ORDÓÑEZ e JORDAN, 2014). *Listeria monocytogenes* é onipresente no ambiente e pode sobreviver por longos períodos de tempo em ambientes aparentemente inóspitos, como em instalações de processamento de alimentos devido à sua capacidade para resistir a várias situações estressantes e formar biofilmes. *L. monocytogenes* pode replicar a temperaturas de refrigeração, e, portanto, é de particular preocupação em produtos com uma longa vida de prateleira (LEONG, ALVAREZ-ORDÓÑEZ e JORDAN, 2014). Do ponto de vista de saúde pública, *L. monocytogenes* apresenta o impacto mais forte em

indivíduos imunocomprometidos e é o patógeno de origem alimentar com a maior taxa de mortalidade (28%) (KRAMARENKO *et al.*, 2013; VALLIM *et al.*, 2015). Não há notificação obrigatória para os casos de listeriose no Brasil, mas, a fim de controlar e garantir a segurança dos produtos de origem animal prontos para consumo, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2009) estabeleceu critérios e procedimentos para controle de *L. monocytogenes*. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) também estabelece a ausência do patógeno em 25 g de amostra de queijo (BRASIL, 2001).

A importância deste trabalho é porque poucos estudos têm sido realizados simultaneamente, cobrindo diferentes regiões do Brasil. As áreas metropolitanas foram incluídas na análise principalmente porque alguns serviços de monitoramento de saúde municipais são eficazes para a venda de alimentos artesanais.

Métodos ISO para análise microbiana foram utilizados para o isolamento rápido de colônias características sobre as placas de ágar primários, ao contrário de quando são utilizados métodos convencionais, como técnica de múltiplos tubos que são prolongadas. Em geral, os meios cromogênicos são capazes de isolar e identificar espécies de bactérias e, assim, permitir uma detecção mais rápida, por exemplo, a fim de distinguir *L. monocytogenes* de *Listeria* spp. (LAW *et al.*, 2015). Salames e queijos foram analisados por causa de sua origem animal, e são alimentos artesanais prontos para consumo, que não requerem qualquer tratamento térmico antes do consumo, e a probabilidade de isolar possíveis micro-organismos patogênicos é alta.

O objetivo deste estudo foi determinar a qualidade microbiológica de alimentos artesanais brasileiros, prontos para consumo, tais como queijos e salames comercialmente adquiridos de casas de alimentos artesanais e feiras de produtores nas regiões metropolitanas de dez capitais brasileiras. Foram avaliados indicadores microbiológicos, tais como de qualidade higiênico-sanitária de matéria-prima e dos processos ou bactérias patogênicas, tais como a *E. coli*, coliformes e *Staphylococcus* coagulase positiva, e determinar a presença de bactérias patogênicas *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 Coleta de amostras e identificação

Um total de 45 amostras de alimentos artesanais, pronto para consumo, incluindo 32 amostras de queijos e 13 amostras de salames, foram comercialmente adquiridas de casas de alimentos artesanais ou feiras de produtores nas áreas metropolitanas de dez capitais brasileiras de janeiro a dezembro de 2013. O número de amostras em cada cidade foi a seguinte (queijo / salame): Porto Alegre (3/3), Curitiba (4/3), São Paulo (3/3), Belo Horizonte (4/1), Salvador (3/0), Recife (3/0), Natal (3/0), Fortaleza (3/3), Manaus (3/0), e Brasília (3/0). As amostras foram obtidas de diferentes produtores e não possuíam o selo de inspeção sanitária.

Os resultados de quantificação microbiana foram expressos como log UFC.g<sup>-1</sup>, e presença ou ausência de patógenos por 25g.

### 2.2.2 Análise microbiológica

Quantificação microbiana de indicadores, incluindo *E. coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva, e pesquisas microbianas de bactérias patogênicas, incluindo *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp., foram conduzidos como descrito abaixo. Coliformes foram quantificados, a fim de complementar os dados de níveis de contaminação por meio de indicadores microbianos de higiene (VISOTTO *et al.*, 2011).

Para quantificar coliformes, *E. coli*, e *Staphylococcus* coagulase positiva, alíquotas de 25 g de queijo ou salames foram homogeneizadas com 225 mL de água estéril contendo 0,1% de peptona, e diluições decimais foram preparados utilizando o mesmo diluente (TAYLOR *et al.*, 2015), (Laborclin, Pinhais, Brasil).

*E. coli* e coliformes foram determinados seguindo metodologias ISO 4832:2006 e ISO 16649-2:2001 sobre a superfície do ágar cromogênico Compass® ECC (Biokar Diagnostics, Paris, França), seguido por incubação a 35 ± 1 °C por 24 ± 2 h (ISO 4832, 2006). Este meio de cultura inclui dois substratos cromogênicos, magenta-galactoside e X-glucuronide, para detecção simultânea de coliformes e *E. coli*. Colônias magenta são

considerados coliformes por possuírem atividade  $\beta$ -galactosidase e colônias azuis escuras como *E. coli* por possuírem atividades  $\beta$ -galactosidase e  $\beta$ -glucuronidase (ISO 16649-2, 2001; MANAFI; KNEIFEL, 1991).

Uma a três colônias suspeitas com diferentes morfotipos foram confirmados por purificação em Cromoclin US agar (Laborclin) e fenotipicamente identificados usando sistemas de identificação Bactray® 1 and 2 (Laborclin).

Processamentos microbiológicos das amostras para isolamento de *Staphylococcus* coagulase positiva foram conduzidos através de métodos ISO 6888-1:1999 com ágar Baird Parker (Laborclin) seguido de incubação at  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24–48 h. Isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva foram identificados através da observação de cocos Gram-positivos, catalase e coagulase positiva.

*Listeria* foi detectada seguindo a metodologia ISO BS EN ISO 11290-1:2004, o qual inclui homogeneização de 25 g de amostra com 225 mL de caldo Demi Fraser (BD Diagnostics, Sparks, EUA). O caldo de enriquecimento foi incubado a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 h. Culturas primárias de caldo Fraser foram transferidas para caldo Fraser secundárias (Laborclin) e estriadas sobre a superfície de ágar Palcam (Laborclin) e ágar ALOA (Agar *Listeria* de acordo com Ottaviani e Agosti) (Laborclin). Caldo Fraser e as placas em ágar foram incubadas a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por  $48 \pm 2$  h. Caldo Fraser secundário foi estriado sobre a superfície de ágar Palcam e ágar ALOA e incubados a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  por  $48 \pm 2$  h. Todas as placas foram analisadas para a presença de colônias de *Listeria*, que aparentam pequenas colônias marrom escuras na superfície de ágar Palcam, e pequenas colônias azuis sobre ágar ALOA, com ou sem halo opaco ao redor. Isolados purificados, que incluem aqueles azuis sobre ágar Cromoclin US, cocobacilos Gram-positivos pela coloração de Gram, apresentando atividade catalase positiva com peróxido de hidrogênio 3%, e foram positivos no teste de motilidade a  $25^\circ\text{C}$  com a forma típica de guarda-chuva em meio SIM (Laborclin), foram identificados como *Listeria* spp. Testes de fermentação de carboidratos foram conduzidos em caldo púrpura para carboidratos (Laborclin) contendo xilose e ramnose, onde *L. monocytogenes* fermenta ramnose, mas não a xilose.

*Salmonella* foi detectada seguindo a metodologia ISO 6579:2002, após pre-enriquecimento em água peptonada tamponada e enriquecimento em caldo Muller

Kauffmann Tetratonato Novobiocina (MKTTn), (Laborclin) e caldo Rapaport-Vassiliadis Soja (RVS), (Laborclin), incubados a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 h, respectivamente. Culturas enriquecidas foram estriadas sobre a superfície de ágar XLD (*Xylose Lysine Deoxycholate*) (Laborclin) e ágar cromogênico *Salmonella* (Laborclin). As placas foram incubadas a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  por  $24 \pm 2$  h. Isolados purificados, brancos no ágar Cromoclin US, foram identificados usando sistema miniaturizado Bactray® (Laborclin). Testes sorológicos como flagelar polivalente (H) e polivalente somático (O) foram realizados usando soro anti-*Salmonella* (Probac, São Paulo, Brasil).

### 2.2.3 Purificação de colônias

Embora os métodos ISO sugiram o uso de ágar nutriente para a purificação de colônias, colônias suspeitas no meio primário foram inoculadas na superfície de ágar Cromoclin US (Laborclin) antes da identificação fenotípica pois este meio nutriente é adicionado de substratos cromogênicos que facilitam a visualização de colônias características. Neste meio cromogênico, coliformes aparecem como colônias azuis escuras pois consomem X-glucoside e magenta-galactoside, *E. coli* consome magenta-glucuronide e magenta-galactoside, enquanto que *Enterococcus* spp. e *Listeria* spp. consomem X-glucoside e suas colônias ficam azuis claras. Colônias rosas isoladas de ágar Baird Parker foram descartadas pela atividade galactosidase de *Staphylococcus saprophyticus*. Colônias de *Staphylococcus* coagulase positiva e *Salmonella* spp. não consomem estes substratos e ficam brancos a amarelados. Este meio permite distinguir *Proteus* spp. isolados do ágar XLD e ágar cromogênico *Salmonella*, as quais aparecem como colônias marrom devido à atividade triptofanase.

## 2.3 RESULTADOS

As populações de coliformes, *E. coli*, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* spp., e *Listeria* spp. de queijos e salames artesanais, adquiridas na área metropolitana de dez capitais brasileiras estão reportadas na Tabela 01.

Dentre as 45 amostras comercialmente adquiridas de casas de alimentos artesanais ou feiras de produtores, 62,5% de amostras de queijos artesanais (20/32) e 23,1% de amostras de salames artesanais (3/13) apresentaram-se impróprios para consumo humano. De acordo com as normas da ANVISA (BRASIL, 2001), 51,1% das amostras (23/45) apresentaram-se impróprios para consumo humano devido à presença de *E. coli* e *Staphylococcus coagulase* positiva e/ou *Salmonella* spp. em níveis acima do tolerado pela legislação.

A contagem de *Staphylococcus coagulase* positiva foi maior do que a máxima permitida em legislação de 3,7 log UFC.g<sup>-1</sup> e 2,7 log ufc.g<sup>-1</sup> para 23,1% para amostras de salames (3/13) e 34,4% de amostras de queijos (11/32), respectivamente, queijos de muito alta umidade (> 55%); valores estes acima do tolerado pela ANVISA (BRASIL, 2001).

Coliformes foram isolados de 78,1% de amostras de queijos (26/32) com contagens de 3,0–8,5 log UFC.g<sup>-1</sup> e 23,1% de amostras de salames (3/13) contendo 4,3–4,9 log UFC.g<sup>-1</sup>.

Embora *E. coli* não tenha sido isolada de amostras de salames, 56,3% das amostras de queijos (18/32) apresentaram valores entre 2,4–6,3 log UFC.g<sup>-1</sup>. Considerando que *E. coli* pertence ao grupo coliformes a 45°C (SILVA *et al.*, 2010) onde o valor máximo tolerado é 2,7 log UFC.g<sup>-1</sup> para queijos de muita alta umidade (BRASIL, 2001), 50,0% das amostras de queijos (16/32) apresentaram-se impróprias para consumo humano.

*Salmonella* spp. foi isolada de 6,3% de amostras de queijos (2/32) e 7,7% amostras de salames (1/13).

*Listeria* spp. foi isolada de 6,3% amostras de queijos (2/32) e 30,8% amostras de salames (4/13); no entanto a presença de *L. monocytogenes* não foi confirmada.

**Tabela 01.** Populações de coliformes, *E. coli*, *Staphylococcus* coagulase-positiva, *Salmonella* spp. e *Listeria* spp. de amostras de queijos e salames artesanais adquiridos comercialmente em área metropolitana de dez cidades brasileiras.

Amostra	Região	Cidade	Coliformes (log·UFC.g <sup>-1</sup> )	<i>E. coli</i> (log·UFC.g <sup>-1</sup> )	<i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva (log·UFC.g <sup>-1</sup> )	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Listeria</i> spp.	Amostra imprópria <sup>a</sup>
<b>Queijo</b>								
<b>Valores de Referência<sup>b,c</sup></b>			-	2,7 <sup>d</sup>	2,7 <sup>d</sup>	ausência	-	-
1	Sul	1	< 2	< 2	< 2	ausência	ausência	Não
2	Sul	1	7,66	6,30	< 2	ausência	presença	Sim
3	Sul	1	8,56	6,08	< 2	ausência	ausência	Sim
4	Sul	2	5,32	2,48	< 2	ausência	ausência	Não
5	Sul	2	7,08	5,69	5,59	ausência	ausência	Sim
6	Sul	2	4,38	3,85	3,95	ausência	ausência	Sim
7	Sul	2	5,54	< 2	< 2	ausência	ausência	Não
8	Sudeste	3	< 2	< 2	< 2	ausência	ausência	Não
9	Sudeste	3	6,63	< 2	< 2	ausência	ausência	Não
10	Sudeste	3	< 2	< 2	< 2	ausência	ausência	Não
11	Sudeste	4	4,60	4,00	< 2	ausência	ausência	Sim
12	Sudeste	4	< 2	< 2	< 2	ausência	ausência	Não
13	Sudeste	4	< 2	< 2	6,58	ausência	ausência	Sim
14	Sudeste	4	4,40	< 2	< 2	ausência	ausência	Não
15	Nordeste	5	3,30	< 2	< 2	ausência	ausência	Não
16	Nordeste	5	6,16	< 2	< 2	ausência	ausência	Não
17	Nordeste	5	3,90	< 2	5,31	ausência	ausência	Sim
18	Nordeste	6	4,88	3,78	< 2	ausência	ausência	Sim
19	Nordeste	6	6,67	5,97	5,46	ausência	ausência	Sim
20	Nordeste	6	6,43	< 2	< 2	ausência	ausência	Não
21	Nordeste	7	5,37	5,13	6,00	presença	ausência	Sim
22	Nordeste	7	3,00	< 2	4,85	ausência	ausência	Sim
23	Nordeste	7	6,22	6,16	< 2	ausência	ausência	Sim
24	Nordeste	8	4,90	4,15	3,78	ausência	ausência	Sim
25	Nordeste	8	4,93	4,62	< 2	ausência	ausência	Sim
26	Nordeste	8	5,44	5,16	4,95	ausência	ausência	Sim
27	Norte	9	4,60	4,00	< 2	presença	ausência	Sim
28	Norte	9	4,66	4,56	4,00	ausência	ausência	Sim
29	Norte	9	3,20	2,60	3,85	ausência	ausência	Sim
30	Centro-oeste	10	6,51	6,09	< 2	ausência	ausência	Sim
31	Centro-oeste	10	< 2	< 2	< 2	ausência	ausência	Não
32	Centro-oeste	10	6,35	5,78	< 2	ausência	presença	Sim
<b>Salames</b>								
<b>Reference values<sup>b</sup></b>			-	3,0 <sup>d</sup>	3,7	ausência	-	-
33	Sul	1	< 2	< 2	< 2	ausência	ausência	Não
34	Sul	1	< 2	< 2	< 2	ausência	ausência	Não
35	Sul	1	< 2	< 2	< 2	ausência	ausência	Não
36	Sul	2	< 2	< 2	< 2	ausência	presença	Não
37	Sul	2	4,91	< 2	6,00	presença	presença	Sim
38	Sul	2	4,60	< 2	< 2	ausência	presença	Não
39	Sudeste	3	4,32	< 2	< 2	ausência	presença	Não
40	Sudeste	3	< 2	< 2	4,60	ausência	ausência	Sim
41	Sudeste	3	< 2	< 2	5,52	ausência	ausência	Sim
42	Sudeste	4	< 2	< 2	< 2	ausência	ausência	Não
43	Sudeste	8	< 2	< 2	< 2	ausência	ausência	Não
44	Nordeste	8	< 2	< 2	< 2	ausência	ausência	Não
45	Nordeste	8	< 2	< 2	< 2	ausência	ausência	Não

a. Amostra imprópria: contendo *E. coli*, *Staphylococcus* coagulase-positiva, e/ou *Salmonella* spp. acima dos valores tolerados em legislação.

b. Valores de referência de acordo com Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001).

c. Queijo com muita alta umidade (> 55%).

d. Dados considerados para coliformes a 45°C (BRASIL, 2001).

## 2.4 DISCUSSÃO

Foram isolados *E. coli*, *Staphylococcus* coagulase positiva, e/ou *Salmonella* spp. nas amostras estudadas, corroborando com os resultados de Almeida *et al.* (2013) os quais demonstraram que estes micro-organismos estão entre os agentes etiológicos mais comuns em amostras positivas de surtos de origem alimentar no estado do Paraná, Brasil.

Os resultados obtidos para *Staphylococcus* coagulase positiva foram comparáveis aos dos estudos anteriores de Evencio-Luz, Lima-Filho e Evencio-Neto (2012), que relataram a ocorrência de *Staphylococcus* coagulase positiva em Salvador e Recife. Em seus estudos, um total de 21,0% (16/75) e 31,2% (20/65) das amostras de queijo de coalho foram impróprias para consumo humano.

Entre 30 amostras, Visotto *et al.* (2011) verificaram que quatro amostras (13,3%), dois industrializados e dois artesanais, continham populações de *Staphylococcus* coagulase positiva acima de 5 log UFC.g<sup>-1</sup>. Este relatório está em conformidade com o presente estudo, em que quatro de 32 amostras de queijo (12,5%) continham *Staphylococcus* coagulase positiva acima de 5,0 log UFC.g<sup>-1</sup>. Borelli *et al.* (2006) encontraram *Staphylococcus* spp. em níveis superiores a 5,0 log UFC.g<sup>-1</sup> em todas as amostras de queijo analisadas da região da Serra da Canastra, em Minas Gerais, entre os quais 93,3% eram capazes de produzir enterotoxinas estafilocócicas.

Para coliformes, resultados semelhantes aos que para queijo foram relatados por Visotto *et al.* (2011), que mostraram que 90% das amostras (27/30) continham populações superior a 3,0 log NMP.g<sup>-1</sup> (número mais provável). Os autores afirmaram que a elevada ocorrência desses indicadores microbianos indicam que os queijos foram produzidos com matérias-primas de baixa qualidade ou que falhas haviam ocorrido durante os processos de fabricação e armazenamento.

Em um estudo anterior, as amostras de queijo avaliadas foram consideradas impróprias para o consumo por causa da contaminação por *E. coli* como relatado por Visotto *et al.* (2011), que observaram que 50% das amostras de queijo artesanal (4/8) e 54,5% das amostras de queijo industriais (12/22) comercialmente adquiridos de Ribeirão

Preto, São Paulo, Brasil continuam populações de coliformes termotolerantes em níveis superiores aos tolerados pelos regulamentos. Borelli *et al.* (2006) encontraram altos níveis de coliformes termotolerantes em amostras de queijo da região da Serra da Canastra, e relatou a presença deste micro-organismo em todas as amostras de água utilizada para produção de queijo.

Em contraste aos resultados de Osailli *et al.* (2012) que isolaram *Listeria* spp. de 27,1% de amostras de queijo e *L. monocytogenes* de 39 (11,1%) de amostras de queijo branco em salmoura na Jordânia, foram isoladas *Listeria* spp. mas não de *L. monocytogenes*.

O isolamento de *Salmonella* spp. e *Listeria* spp. neste estudo levanta preocupações sobre os riscos para a saúde humana. Gould *et al.* (2014) notificou surtos atribuídos ao queijo nos Estados Unidos de 1998-2011, onde três mortes foram relacionadas com queijos produzidos a partir de leite não pasteurizado contendo *Listeria* (duas mortes) e *Salmonella* sorotipo Typhimurium. Três mortes ocorreram em surtos resultantes de queijos produzidos a partir de leite pasteurizado contendo *Listeria*. Kottwitz *et al.* (2010) relataram que os derivados de carne e queijo estão entre os alimentos associados a surtos de salmonelose humana no Paraná entre 1999 e 2008, em que foram analisados um total de 286 surtos; 14,0% dos surtos foram associados a derivados de carne e 1% com queijo.

A baixa ocorrência de *Salmonella* spp. e a ausência de *L. monocytogenes* em amostras de queijo avaliadas no presente estudo pode ser explicado pelos resultados de Visotto *et al.* (2011) e Silva *et al.* (2010b). Estes autores relataram que a *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* podem estar ausentes de amostras de queijo por causa da presença da microbiota autóctone. Esta microbiota pode limitar o crescimento de micro-organismos patogênicos ao reduzir a capacidade competitiva de tais espécies em relação às outras bactérias presentes nos queijos e / ou a produção de moléculas antagonistas.

Nos salames avaliados no presente estudo, a ausência de *L. monocytogenes* e *E. coli* e a baixa ocorrência de *Salmonella* spp. pode ser explicada com base nos resultados de Lindqvist *et al.* (2009) e Porto-Fett *et al.* (2008). Lindqvist *et al.* (2009) incluiu um período de maturação acima de temperaturas de refrigeração antes da distribuição e reduziu contagens de *L. monocytogenes* e *E. coli* em salames. Porto-Fett

*et al.* (2008) relataram que a fermentação para pH 4,8 e armazenamento a 21°C foram eficazes para a redução do número de *L. monocytogenes* (2,54 log UFC.g<sup>-1</sup> de redução) e *Salmonella* sorotipo Typhimurium (redução ≥ 5,23 log UFC.g<sup>-1</sup>).

Os resultados obtidos em regiões diferentes sugerem que a região nordeste inclui o maior número de amostras impróprias para consumo, onde 75% das amostras de queijo analisadas (9/12) não estavam em conformidade com a legislação sanitária brasileira vigente (BRASIL, 2001). Apenas alguns estados e / ou municípios brasileiros compilam dados estatísticos sobre os agentes etiológicos mais comuns, alimentos comuns envolvidos em surtos, a população de maior risco e fatores que contribuem para doenças transmitidas por alimentos. Para melhorar a qualidade do queijo Minas artesanal, o governo de Minas Gerais criou leis que estabelecem parâmetros físico-químicos e microbiológicos em que esses queijos devem aderir (MARTINS *et al.*, 2015).

## 2.5 CONCLUSÃO

A elevada ocorrência de micro-organismos detectados na análise microbiológica em algumas das dez capitais indicou a baixa qualidade higiênico-sanitária das amostras. A presença de agentes patogênicos em algumas amostras representa um risco potencial para a saúde dos consumidores, salientando a importância de um controle estreito e eficaz através do serviço de Vigilância Sanitária para evitar surtos de origem alimentar. A detecção rápida de bactérias patogênicas em alimentos é crucial e pode evitar surtos de doenças transmitidas por alimentos.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Laborclin, que através do programa de incentivo à pesquisa e treinamento doaram os meios de cultura.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, J.C.; PAULA, C.M.S.; SVOBODA, W.K.; LOPES, M.O.; PILONETTO, M.P.; ABRAHÃO, W.M.; GOMES, E.C. Perfil epidemiológico de casos de surtos de doenças transmitidas por alimentos ocorridos no Paraná, Brasil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 34, n. 1, p. 97-106, 2013.
- BORELLI, B.M.; FERREIRA, E.G.; LACERDA, I.C.A.; SANTOS, D.A.; CARMO, L.S.; DIAS, R.S.; SILVA, M.C.C.; ROSA, C.A. Enterotoxigenic *Staphylococcus* spp. and other microbial contaminants during production of Canastra cheese, **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 545-550, 2006.
- BRASIL, Ministério da Saúde. ANVISA. RDC 12. **Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**. 02 de janeiro de 2001.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 9, de 8 de abril de 2009. **Institui os Procedimentos de Controle da *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal, prontos para o consumo**. D.O.U., 09/04/2009 - Seção 1.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual Integrado de Prevenção e Controle de Doenças Transmitidas por Alimentos**. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_integrado\\_prevencao\\_doencas\\_alimentos.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_prevencao_doencas_alimentos.pdf). Acesso em 21.11. 2015.
- ELHADI, N.; ALJINDAN, R.; ALJELDAH, M. Prevalence of nontyphoidal *Salmonella* serogroups and their antimicrobial resistance patterns in a university teaching hospital in Eastern Province of Saudi Arabia. **Infection and Drug Resistance**, v. 6, p. 199–205, 2013.
- EVÊNCIO-LUZ, L.; LIMA-FILHO, J.V.; EVÊNCIO-NETO, J. Occurrence of *Salmonella* sp. and coagulase-positive staphylococci in raw eggs and coalho cheese: comparative study between two cities of Brazil's northeast. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1463-1466, 2012.
- GOULD, L.H.; MUNGAI, E.; BEHRAVESH, C.B. Outbreaks attributed to cheese: differences between outbreaks caused by unpasteurized and pasteurized dairy products, United States, 1998-2011. **Foodborne Pathogen Diseases**, v. 11, n. 7, p.545-51, 2014.
- ISO 4832:2006. **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coliforms – Colony-count technique**. 2006.
- ISO 6579:2002. **Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.** 2002.

ISO 6888-1:1999. **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species.** 1999.

ISO 16649-2:2001. **Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of  $\beta$ -glucuronidase-positive *Escherichia coli*.** 2001.

KOTTWITZ, L.B.M.; OLIVEIRA, T.C.R.M.; ALCO CER, I.; FARAH, S.M.S.S.; ABRAHÃO, W.S.M.; RODRIGUES, D.P. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum - Health Sciences**, v. 32, n. 1, p. 9-15, 2010.

KRAMARENKO, T.; ROASTO, M.; MEREMÄE, K.; KUNINGAS M.; PÖLTSAMA, P.; ELIAS, T. *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. **Food Control**, v. 30, p.24-29, 2013.

LAW, J.W.; AB-MUTALIB, N.S.; CHAN, K.G.; LEE, L.H. An insight into the isolation, enumeration, and molecular detection of *Listeria monocytogenes* in food. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 1227, p. 1-15, 2015. Disponível em: doi:10.3389/fmicb.2015.01227. Acesso em 17.04.2016.

LEONG, D.; ALVAREZ-ORDÓÑEZ, A.; JORDAN, K. Monitoring occurrence and persistence of *Listeria monocytogenes* in foods and food processing environments in the Republic of Ireland. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 436, p. 1-8, 2014. Disponível em: doi: 10.3389/fmicb.2014.00436. Acesso em: 17.04.2016.

LINDQVIST, R.; LINDBLAD, M. Inactivation of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in fermented sausages during maturation/storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, n. 1, p. 59-67, 2009.

MANAFI, M.; KNEIFEL, W.; BASCOMB, S. Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. **Microbiology Reviews**, v. 55, n. 3, p. 335-348, 1991.

MARTINS, J.M.; GALINARI, É.; PIMENTEL-FILHO, N.J.; RIBEIRO-JUNIOR, J.I.; FURTADO, M.M.; FERREIRA, C.L. Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 219-230, 2015.

OSAILLI, T.M.; AL-NABULSI, A.A.; TAHA, M.H.; AL-HOLY, M.A.; ALABOUDI, A.R.; AL-ROUSAN, W.M.; SHAKER, S.S. Occurrence and Antimicrobial Susceptibility of *Listeria monocytogenes* Isolated from Brined White Cheese in Jordan. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 9, p. M528-M532, 2012.

PORTO-FETT, A.C.; HWANG, C.A.; CALL, J.E.; JUNEJA, V.K.; INGHAM, S.C.; INGHAM, B.H.; LUCHANSKY, J.B. Viability of multi-strain mixtures of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium, or *Escherichia coli* O157:H7 inoculated into the batter or onto

the surface of a soudjouk-style fermented semi-dry sausage. **Food Microbiology**, v. 25, n. 6, p. 793-801, 2008.

PUÑO-SARMIENTO, J.; GAZAL, L.E.; MEDEIROS, L.P.; NISHIO, E.K.; KOBAYASHI, R.K.; NAKAZATO, G. Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from avian organic fertilizers. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, p. 8924-8939, 2014.

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

SILVA, M.C.D.; RAMOS, A.C.S.; MORENO, I.; MORAES, J.O. Influência dos procedimentos de fabricação nas características físico-químicas, sensoriais e microbiológicas de queijo de coalho. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 2, p. 214-221, 2010b.

SILVA, F.F.P.; HORVATH, M.B.; SILVEIRA, J.G.; PIETA, L.; TONDO, E.C. Occurrence of *Salmonella* spp. and generic *Escherichia coli* on beef carcasses sampled at a Brazilian slaughterhouse. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 17-23, 2014.

TADESSE, G.; GEBREMEDHIN, E.Z. Prevalence of *Salmonella* in raw animal products in Ethiopia: a meta-analysis. **BMC Research Notes**, v. 8, p.163, 2015.

TAYLOR, T.M.; SOFOS, J.N.; BODNARUK, P.; ACUFF, G.R. **Sampling Plans, Sample Collection, Shipment, and Preparation for Analysis**. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 5<sup>th</sup> ed. Washington: American Public Health Association (APHA), Chapter 2, 2015.

VALLIM, D.C.; HOFER, C.B.; LISBÔA, R.C.; BARBOSA, A.V.; RUSAK, L.A.; REIS, C.M.F.; HOFER E. Twenty Years of *Listeria* in Brazil: Occurrence of *Listeria* Species and *Listeria monocytogenes* Serovars in Food Samples in Brazil between 1990 and 2012. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-8, 2015.

VISOTTO, R.G.; OLIVEIRA, M.A.; PRADO, S.P.T; BERGAMINI, A.M.M. Queijo Minas Frescal: perfil higiênico-sanitário e avaliação da Rotulagem. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 70, n. 1, p. 8-15, 2011.

### **3 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS, POTENCIAL DIARREIOGÊNICO, FORMAÇÃO DE BIOFILME E CAPACIDADE DE ADERÊNCIA A CÉLULAS HeLa DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE QUEIJOS ARTESANAIS EM CAPITAIS BRASILEIRAS**

#### **Lista de autores e afiliação**

Elisa H. U. Yamanaka<sup>1\*</sup>, Laura L. Cogo<sup>2</sup>, Patrícia R. Dalzoto<sup>3</sup>, Mariana V. Porsani<sup>1</sup>, Ida C. Pimentel<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia, Parasitologia e Patologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba. Tel: 55 (41) 3078.5833 / 9182.4575. Rua Professor Dário Veloso, 113 Ap. 401, Curitiba, PR. CEP 80320-050. Email: [elisauem@ufpr.br](mailto:elisauem@ufpr.br)

<sup>2</sup>Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR

<sup>3</sup>Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Patologia Básica. LabMicro, Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR

## RESUMO

Queijos artesanais são produzidos em muitos países e um dos parâmetros usados para avaliar a qualidade microbiológica de produtos de origem animal é a quantificação de *Escherichia coli*. A presença deste, além do risco de uma infecção alimentar por cepas diarreio gênicas, indica contaminação e com isto, possibilidade de outras doenças com transmissão oral-fecal. Da mesma forma, a resistência a antimicrobianos com capacidade de aderência e formação de biofilme encontradas em cepas isoladas de alimentos, é preocupante do ponto de vista epidemiológico, pois indica disseminação de cepas resistentes e/ou com potencial patogênico. O presente trabalho teve como objetivo pesquisar fatores de virulência diarreio gênicos, avaliar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos comumente utilizados na clínica humana, capacidade de formação de biofilme e aderência a células HeLa em *E. coli* isoladas de queijos artesanais de capitais brasileiras. Foram selecionados 41 isolados de *E. coli* em 18 amostras, pesquisando-se os genes diarreio gênicos *eaeA*, *ipaH*, *stx1*, *stx2*, *aggR* e *elt*. Avaliou-se o perfil de susceptibilidade a 12 antimicrobianos. Nenhuma das amostras apresentou *E. coli* com genes diarreio gênicos. Quanto ao perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, 50,0% (9/18) das amostras apresentaram isolados resistentes a antimicrobianos. Resistência a duas ou mais classes de antimicrobianos foram observados em 33,3% (6/18) das amostras. Todos os isolados apresentaram capacidade de formação de biofilme, e 27,7% (5/18) das amostras apresentaram capacidade de aderência em células HeLa. Apesar de não terem sido isoladas *E. coli* carreando genes diarreio gênicos dos queijos avaliados, a presença de *E. coli* resistentes a antimicrobianos, capazes de formarem biofilmes e aderirem em células teciduais podem representar um potencial risco à saúde de seus consumidores.

**Palavras chave:** *Escherichia coli*; genes de virulência; queijo artesanal; resistência antimicrobiana

## ABSTRACT

Artisanal cheeses are produced in many countries and one of the parameters used to evaluate the microbiological quality of animal origin products is the quantification of *Escherichia coli*. The presence of them, besides the risk infection indicates contamination and thus, the possibility of other diseases with fecal-oral transmission. Similarly, resistance to antimicrobials with adhesion and biofilm formation found in isolated strains of food, it is worrying from an epidemiological point of view because it indicates spread of resistant strains and / or pathogenic potential. The aim of this study was to evaluate diarrheagenic genes, evaluate the susceptibility profile to antimicrobials commonly used in human clinical, biofilm-forming ability and adherence to HeLa cells in *E. coli* isolated from artisanal cheeses from Brazilian capitals. 41 *E. coli* isolates were selected in 18 samples by searching diarrheagenic genes, *eaeA*, *ipaH*, *stx1*, *stx2*, *aggR* and *elt*. We evaluated the susceptibility profile to 12 antimicrobials. None of the samples showed diarrheagenic *E. coli*. As for the susceptibility profile to antimicrobials, 50.0% (9/18) of the samples showed isolates resistant to antimicrobials. Resistance to two or more classes of antimicrobials were observed in 33.3% (6/18) of the samples. All isolates showed biofilm formation capacity, and 27.7% (5/18) of the samples showed adhesiveness in HeLa cells. Although they have not been isolated *E. coli* diarrheagenic genes assessed, the presence of resistant *E. coli* to antimicrobials, capable of forming biofilms and adhere to tissue cells in these samples of cheeses may represent a potential risk to the health of its consumers.

**Key words:** *Escherichia coli*; virulence genes; artisanal cheeses; antimicrobials resistance.

### 3.1 INTRODUÇÃO

Queijos artesanais são produzidos em muitos países, principalmente envolvendo trabalho familiar como fonte de renda complementar. No entanto, a maioria destes produtores não possui recursos suficientes para melhorar a qualidade de sua produção e vários trabalhos tem demonstrado o risco de contaminação desses alimentos (MARTINS *et al.*, 2015). Um dos parâmetros mundialmente usados para avaliar a qualidade microbiológica de produtos de origem animal é a quantificação de *E. coli* (SILVA *et al.*, 2014).

*E. coli* é uma importante habitante comensal do intestino de seres humanos e animais endotérmicos e faz parte da microbiota essencial que mantém a fisiologia de hospedeiros saudáveis (PUÑO-SARMIENTO *et al.*, 2014). Por outro lado, através de ganho ou perda de genes que lhe permitem tornar-se um agente patogênico altamente diversificado e adaptado, podem causar uma ampla gama de doenças humanas que se estendem a partir do trato gastrointestinal para sítios extra-intestinais, tais como o trato urinário, corrente sanguínea, e sistema nervoso central (CROXEN *et al.*, 2013). Além de *E. coli* ser um bom indicador de qualidade microbiológica de processos e segurança alimentar, algumas linhagens podem causar diarreia, sendo *E. coli* diarreiogênicas (DEC), a segunda maior causa de surtos alimentares (SILVA *et al.*, 2014; PUÑO-SARMIENTO *et al.*, 2014; GOULD, MUNGAI e BEHRAVESH, 2014).

DEC requerem aderência ao epitélio do hospedeiro para iniciar a doença (CROXEN *et al.*, 2013). São seis os maiores patótipos de DEC, que se diferenciam com base nos fatores de virulência, no padrão de adesão a células HeLa e sintomas clínicos (PUÑO-SARMIENTO *et al.*, 2014). *E. coli* enteropatogênica (EPEC) possui padrão de aderência localizada codificada por gene *eaeA* (TRABULSI, KELLER e TARDELLI GOMES, 2002), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC) produz as toxinas estáveis e lábeis codificadas por genes toxigênicos *est* e *elt* (QADRI *et al.*, 2005), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) possui padrão de aderência agregativa codificada por gene *aggR* (ESTRADA-GARCIA e NAVARRO-GARCIA, 2012), *E. coli* difusamente aderente (DAEC) (Le BOUGUÉNEC e SERVIN, 2006), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) codifica gene de invasão, *ipaH* (CROXEN *et al.*, 2013) e *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) codificando

genes *stx1* e *stx2* (BLANCO *et al.* 2004; CROXEN, 2013 *et al.*; DESIN, TOWNSEND e POTTER, 2015).

O teste de aderência às células HEp-2 ou HeLa é um teste fenotípico, que pode ser usado para distinguir EPEC típico e atípico e outros DEC como DAEC e EAEC. Os padrões de aderência são aderência localizada (AL), aderência semelhante a localizada (LAL), aderência difusa (AD), e aderência agregativa (AA) (SCALETSKY, SILVA e TRABULSI, 1984; CROXEN *et al.*, 2013; HERNANDES *et al.*, 2013).

Recentes relatórios sobre antimicrobianos importantes para a terapia humana tem mostrado a presença de linhagens resistentes em alimentos de origem animal, tais como, Enterobacteriaceae produtora de  $\beta$ - Lactamase de Espectro Extendido (ESBL) e *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), ou ainda *E. coli* e *Salmonella enterica* resistente a carbapenêmicos (LEE *et al.*, 2013). O uso de antimicrobianos como fator de crescimento animal, no combate de patógenos tanto de animais como de plantas na agroindústria, bem como o reaproveitamento de material orgânico proveniente de fezes animais ou lodo de esgoto como fonte de adubação propiciam ao aumento de incidência de micro-organismos resistentes e tem contribuído para a disseminação dos mesmos (LEE *et al.*, 2013; SATO *et al.*, 2014; YOU e SILBERGELD, 2014). As bactérias podem facilmente se adaptar à mudanças de ambiente e adquirir resistência aos antimicrobianos através de vários mecanismos, incluindo mutação e transferência horizontal de genes dentro da mesma espécie e entre espécies diferentes (LEE *et al.*, 2013).

Dados publicados recentemente apontam que cerca de 70% dos antimicrobianos administrados aos animais destinados à alimentação não tem finalidade terapêutica, mas são usados como promotores de crescimento. Esta prática é perigosa pois os antimicrobianos são administrados em concentrações muito baixas por longos períodos de tempo e isto pode aumentar a população de bactérias resistentes. Alguns antimicrobianos tem sido totalmente proibidos para uso animal nos Estados Unidos com o objetivo de preservar sua utilidade clínica (LEE *et al.*, 2013).

A habilidade de *E. coli* se aderir a diferentes superfícies e formar biofilmes tem sido destacados como importantes características associadas à virulência. Alguns estudos prévios demonstram que a formação de biofilme por *E. coli* extraintestinal pode estar

associada à expressão de diferentes adesinas como fímbrias (CERGOLLE-NOVELLA *et al.*, 2015).

Pouco se conhece sobre os riscos para a saúde ao ingerir alimentos contaminados com patógenos resistentes a antimicrobianos provenientes de sistemas de produção artesanal mas a sua detecção alerta para a disseminação da resistência em ambiente não hospitalar. Assim, o presente trabalho teve como objetivo isolar *E. coli*, caracterizar os genes diarreiogênicos, avaliar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, bem como a capacidade de formação de biofilme e de aderência às células teciduais de *E. coli* isolados de queijos com alto teor de umidade, produzidos artesanalmente, nas regiões metropolitanas de dez capitais brasileiras.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Amostras e Isolados Bacterianos

No período de janeiro a dezembro de 2013 foram coletadas amostras de queijos produzidas artesanalmente na região metropolitana de Porto Alegre, Curitiba, São Paulo, Salvador, Belo Horizonte, Recife, Natal, Fortaleza, Manaus e Brasília, totalizando 32 amostras de queijo. Ao término da etapa de isolamento primário (YAMANAKA *et al.*, 2016,) foi realizada purificação de colônias com diferentes morfotipos, suspeitas de *E. coli* de cada meio de cultura, semeando-se em ágar nutriente contendo substrato cromogênico, Cromoclin US (Laborclin). Subsequentemente foram suspensas em solução crioprotetora contendo pérolas de porcelana, Cryobank® (Copan, Brescia, Itália), e mantidas a -80°C, para as pesquisas subsequentes.

Foram selecionados 41 isolados, com diferentes morfotipos, a partir de 18 amostras de queijos.

### 3.2.2 Identificação dos Isolados

Após reativação dos isolados armazenados a -80°C foi realizado o teste da oxidase. As cepas que apresentaram resultado negativo foram submetidas à identificação

preparando-se suspensão bacteriana com turvação comparada em densitômetro (Biomérieux, Marcy l'Etoile, França) à escala tubo 0,5 de McFarland, e semeadas no conjunto de provas bioquímicas BacTray® 1 e 2 (Laborclin, Pinhais, Brasil), incubados por 24 horas a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ , em câmara úmida. A identificação foi efetuada considerando-se o resultado esperado em software específico para interpretação.

As amostras identificadas como *E. coli* foram submetidas à identificação sorológica para avaliação de linhagens enteroinvasivas (EIEC), enteropatogênicas (EPEC) ou produtoras de toxina Shiga (STEC) foram utilizados os soros polivalentes para enteroinvasivas dos grupos A e B, enteropatogênicas dos grupos A, B e C, e *E. coli* O157, adquiridos comercialmente (Probac, São Paulo, Brasil).

### 3.2.3 Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir de 41 isolados através da adaptação do método descrito por Vicente *et al.* (2008). Uma suspensão bacteriana obtida em TSB (*Tryptic Soy Broth*) a  $37^{\circ}\text{C}$  por 24 horas foi centrifugada a  $12.000\text{g}$  por 10 min. Após maceração por 5 minutos em tampão brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) contendo sílica-celite (2:1) foi incubado em banho-Maria a  $65^{\circ}\text{C}$  por 10 min. Em seguida o DNA foi extraído em CIA (Clorofórmio-álcool isoamílico - 24:1, v/v), precipitando-se usando etanol gelado e ressuspenso em água estéril ultrafiltrada. A qualidade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose incluindo marcador de DNA 1 kb (Invitrogen®).

O DNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® 1000 (NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, DE, EUA), diluído com água estéril ultrafiltrada e padronizado a  $90\text{ng}/\mu\text{L}$  e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a realização do PCR. A pureza do DNA foi avaliada através da proporção de leitura a 260/280 e 260/230 entre 1,8 e 2,0 e 1,8 a 2,2 respectivamente.

### 3.2.4 Pesquisa de Genes de Virulência por PCR

Cada amostra de *E. coli* foi submetida a PCR multiplex, utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores específicos, codificadores de genes diarreiogênicos

(EasyPath, Erviegas, Brasil). Para cada gene pesquisado, a sequência dos oligonucleotídeos iniciadores e o tamanho dos fragmentos estão descritos no Quadro 01. Como controles positivo e negativo foram utilizadas as cepas de *E. coli* referência: STEC (O157:H7, *eaeA*+, *stx1*+, *stx2*+), EIEC (O124, *ipaH*+), EIEC (O136, *ipaH*+), EAEC (*aggR*) e EPEC (*elt*). A amplificação do DNA bacteriano foi realizada utilizando-se 1µL de DNA padronizado em 90ng/µL, em 24 µL de mistura reativa contendo 0,5 U de *Taq* polymerase (Invitrogen®), 0,24 mM de cada deoxynucleoside triphosphate (dNTP) (Invitrogen®), 1,3 mM de cloreto de magnésio (Invitrogen®), 2,2 mM de PCR buffer 10x (Invitrogen®), 0,18 mM de cada oligonucleotídeo iniciador (EasyPath®), e completando-se o volume com água estéril ultrapurificada. Para a escolha das misturas de oligonucleotídeo iniciador para o PCR multiplex considerou-se o tamanho do fragmento realizando-se a mistura *stx1* (150pb) com *stx2* (255pb), *eaeA* (248pb) com *ipaH* (619pb) e *aggR* (100pb) com *elt* (322pb). As condições do termociclador (Termociclador Bioer Lifepro - Thermal Cycler Bioer Servis Life) foram padronizadas com um ciclo de desnaturação inicial de 94°C por 3 min e 30 ciclos 94°C por 1 min, 52°C por 1 min, 72°C por 1 min e alongação final de 72°C por 5 min. A qualidade da amplificação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,6% seguido de visualização em transluminador ultravioleta Fluor Chem FC2 (Cell Biosciences Inc, Santa Clara, EUA). Marcador de DNA 1 kb (Invitrogen®) foi incluído em cada corrida.

**QUADRO 01** – Oligonucleotídeos iniciadores para prova de PCR para genes de *E. coli* diarreio gênicas

Gene	Orientação	Sequência do iniciador (5'→ 3')	Tamanho do produto (pb)	Referência
<i>eaeA</i>	F	ATG CTT AGT GCT GGT TTA GG	248	Wang; Clark; Rodgers (2002)
	R	GCC TTC ATC ATT TCG CTT TC		
<i>stx1</i>	F	CTG GAT TTA ATG TCG CAT AGT G	150	Lopez-Saucedo <i>et al.</i> (2003)
	R	AGA ACG CCC ACT GAG ATC ATC		
<i>stx2</i>	F	GGC ACT GTC TGA AAC TGC TCC	255	Lopez-Saucedo <i>et al.</i> (2003)
	R	TCG CCA GTT ATC TGA CAT TCT G		
<i>ipaH</i>	F	GTT CCT TGA CCG CCT TTC CGA TAC CGT C	619	Sethabutr <i>et al.</i> (1993)
	R	GCC GGT CAG CCA CCC TCT GAG AGT AC		
<i>aggR</i>	F	CGA AAA AGA GAT TAT AAA AAT TAA C	100	GUION <i>et al.</i> (2008)
	R	GCT TCC TTC TTT TGT GTA T		
<i>elt</i>	F	TCT CTA TGT GCA TAC GGA GC	322	TOMA <i>et al.</i> (2003)
	R	CCA TAC TGA TTG CCG CAA T		

LEGENDA: F - Senso R – Antisenso

### 3.2.5 Avaliação do Perfil de Susceptibilidade a Antimicrobianos

O perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados de *E. coli* foi avaliado pelo método de disco difusão em ágar, de acordo com o descrito em *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), (2015a), utilizando-se 12 discos de papel impregnados com antimicrobianos (Laborclin, Pinhais, Brasil) incluindo ceftazidima (CFO) 30µg, gentamicina (GEN) 10µg, amoxicilina/acido clavulânico (AMC) 20/10µg, ciprofloxacina (CIP) 5µg, cefuroxima (CRX) 30µg, cefalotina (CFL) 30µg, sulfametoxazol/trimetoprim (SUT) 1,25/23,75µg, ampicilina (AMP) 10µg, meropenem (MER) 10µg, amicacina (AMI) 30µg, ceftazidima (CTZ) 30µg e cefepime (CPM) 30µg. A placa foi incubada por 16 a 20 horas a 35±2°C e o halo de inibição foi medido em mm para avaliar susceptibilidade ou resistência do isolado, através de dados disponíveis em tabela CLSI, 2015b.

### 3.2.6 Formação de Biofilme

A determinação quantitativa de produção de biofilme foi realizada em placas para microtitulação de poliestireno, adaptada de Stepanovic *et al.* (2000). Culturas de 18 horas foram diluídas até a concentração de 10<sup>8</sup> células/mL (escala 0,5 de MacFarland) em TSB e 200 µL desta suspensão foi usada para inocular 3 poços de placas planas de microtitulação com 96 poços. Após incubação de 24 horas a 37°C, o conteúdo das placas foi descartado. Os poços foram lavados 3 vezes com Tampão Salina Fosfatada (PBS - pH 7,2) e secas ao ar. Células foram fixadas pelo calor através da exposição ao ar quente a 60°C por 60 min. O biofilme aderido foi corado com cristal violeta 0,5% por 1 min e o excesso de corante foi removido pelo enxágue com água corrente. Após secagem foi ressolubilizado com etanol 95% (v/v), a densidade ótica do biofilme foi avaliada com leitor de microplaca de *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) num comprimento de onda de 570 nm. A densidade ótica para os 3 poços foi obtida para cada isolado e a média foi determinada. A cepa *American Type Culture Collection* (ATCC) 6538 foi usada

como produtor de biofilme. O meio não inoculado foi utilizado como controle negativo ( $DO_{NC}$ ). A classificação dos isolados capazes de produzir biofilme foi fraco ( $DO_{NC} < DO < 2x DO_{NC}$ ), moderado ( $2x DO_{NC} < DO < 4x DO_{NC}$ ) ou forte produtor de biofilme ( $DO > 4x DO_{NC}$ ) (STEPANOVIC, 2007; PRENAFETA, 2014; XUE; CHEN; SHANG, 2014).

### 3.2.7 Teste de Aderência às células epiteliais

O teste de aderência em células HeLa foi realizado como descrito por Nataro *et al.* (1998). As células foram cultivadas em microplacas para cultura de tecidos de 24 poços aos quais foram inseridas lamínulas redondas estéreis (13 mm de diâmetro) antes da inoculação. O meio de crescimento em cada poço da microplaca consistiu de 0,9 ml de meio mínimo essencial de Eagle (MEM) suplementado com soro fetal bovino a 10% e 1% de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina 100.000 UI e 100 µg/mL). A monocamada de células HeLa foi cultivada durante 18 a 24 horas a 37°C com CO<sub>2</sub> a 5% para se obter, pelo menos, 70% de confluência. As lâminas foram lavadas três vezes com solução estéril de PBS a 0,05 M, pH 7,4. Quarenta microlitros da cultura bacteriana foi inoculada durante 18 a 24 horas em TSB a 37°C e foi adicionado 0,96 mL de MEM contendo 2% de soro fetal bovino. Após 3 h de incubação a 37°C com CO<sub>2</sub> a 5%, as monocamadas foram lavadas com PBS estéril e incubada por um período adicional de 3 h. Em seguida, as lâminas foram lavadas cinco vezes com PBS, fixadas com metanol absoluto durante 10 minutos e coradas com May-Grunwald e Giemsa. As lâminas foram examinadas em um microscópio de luz, utilizando uma lente de imersão em óleo. O padrão de aderência foi comparado ao obtido por Vasconcelos (2014) e Puño-Sarmiento *et al.* (2014).

## 3.3 RESULTADOS

O perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, fenótipo de virulência, formação de biofilme e teste de aderência em células HeLa das amostras estão apresentados na Tabela 02. Dentre os 41 isolados de *E. coli*, 3 isolados foram positivos para a sorotipagem de linhagens diarreio gênicas, através de soroaglutinação: dois para EPEC sorotipo B e

C e um para EIEC sorotipo A. Os genes *eaeA*, *ipaH*, *stx1*, *stx2*, *elt* e *aggR* não foram identificados em nenhum dos 41 isolados testados.

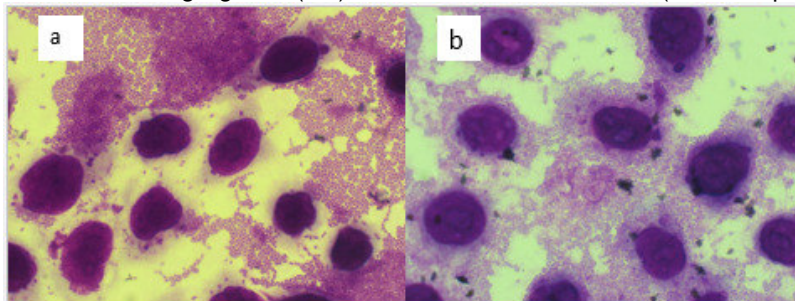
O padrão de aderência observado nos isolados de DEC quando cultivadas com células HeLa foi AA na amostra 23 (Figura 03b), AD nas amostras 6 (Figura 04e) e 18 (Figura 04f), e aderência localizada nas amostras 2 (Figura 05d), 11 (Figura 05e) e 21 (Figura 05f).

Tabela 02 – Resultado do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, fenótipos de virulência, formação de biofilme e padrão de aderência em células HeLa de *E. coli*.

Nº amostra	Nº cidade	<i>E. coli</i> (log-UFC.g <sup>-1</sup> )	Nº isolado	Nº de antibióticos R/I	Fenótipo de resistência	Formação de Biofilme	Fenótipo de virulência	Padrão de aderência
2	1	6,3	1	0/0	Susceptível	Moderado	-	AL
3	1	6,08	2	0/0	Susceptível	Moderado	-	-
4	2	2,48	3	2/0	SUT+AMP	Moderado	-	-
5	2	5,69	4	0/0	Susceptível	Moderado	-	-
6	2	3,85	5	1/0	SUT	Moderado	-	-
6	2	3,85	6	1/0	SUT	Moderado	-	-
6	2	3,85	7	1/1	SUT/CFL	Moderado	EPEC B	AD
11	4	4	8	0/0	Susceptível	Moderado	-	-
11	4	4	9	0/0	Susceptível	Moderado	-	-
11	4	4	10	0/0	Susceptível	Moderado	-	AL
18	6	3,78	11	2/1	AMC+AMP/CFL	Moderado	-	-
18	6	3,78	12	1/0	AMP	Moderado	-	AD
18	6	3,78	13	0/1	CFL	Moderado	-	-
19	6	5,97	14	0/0	Susceptível	Forte	-	-
19	6	5,97	15	0/0	Susceptível	Forte	EIEC A	-
19	6	5,97	16	0/0	Susceptível	Forte	-	-
21	7	5,13	17	0/0	Susceptível	Moderado	-	-
21	7	5,13	18	0/0	Susceptível	Moderado	-	-
21	7	5,13	19	0/0	Susceptível	Moderado	-	AL
23	7	6,16	20	0/1	CRX	Moderado	-	AA
23	7	6,16	21	2/1	SUT+AMP/AMC	Moderado	-	-
23	7	6,16	22	0/0	Susceptível	Moderado	-	-
24	8	4,15	23	0/0	Susceptível	Moderado	-	-
25	8	4,62	24	0/0	Susceptível	Moderado	-	-
25	8	4,62	25	0/0	Susceptível	Moderado	-	-
25	8	4,62	26	0/1	CFL	Moderado	-	-
26	8	5,16	27	0/0	Susceptível	Moderado	-	-
26	8	5,16	28	0/0	Susceptível	Moderado	-	-
26	8	5,16	29	0/1	SUT	Moderado	-	-
27	9	4	30	0/1	CFL	Moderado	-	-
27	9	4	31	0/0	Susceptível	Moderado	-	-
27	9	4	32	0/0	Susceptível	Moderado	-	-
28	9	4,56	33	0/0	Susceptível	Moderado	-	-
28	9	4,56	34	0/0	Susceptível	Moderado	-	-
28	9	4,56	35	0/0	Susceptível	Forte	-	-
29	9	2,6	36	2/0	SUT+AMP	Moderado	-	-
30	10	6,09	37	0/1	CRX	Moderado	EPEC B	-
30	10	6,09	38	0/0	Susceptível	Moderado	-	-
30	10	6,09	39	1/0	AMP	Forte	-	-
32	10	5,78	40	0/0	Susceptível	Moderado	-	-
32	10	5,78	41	0/0	Susceptível	Moderado	-	-

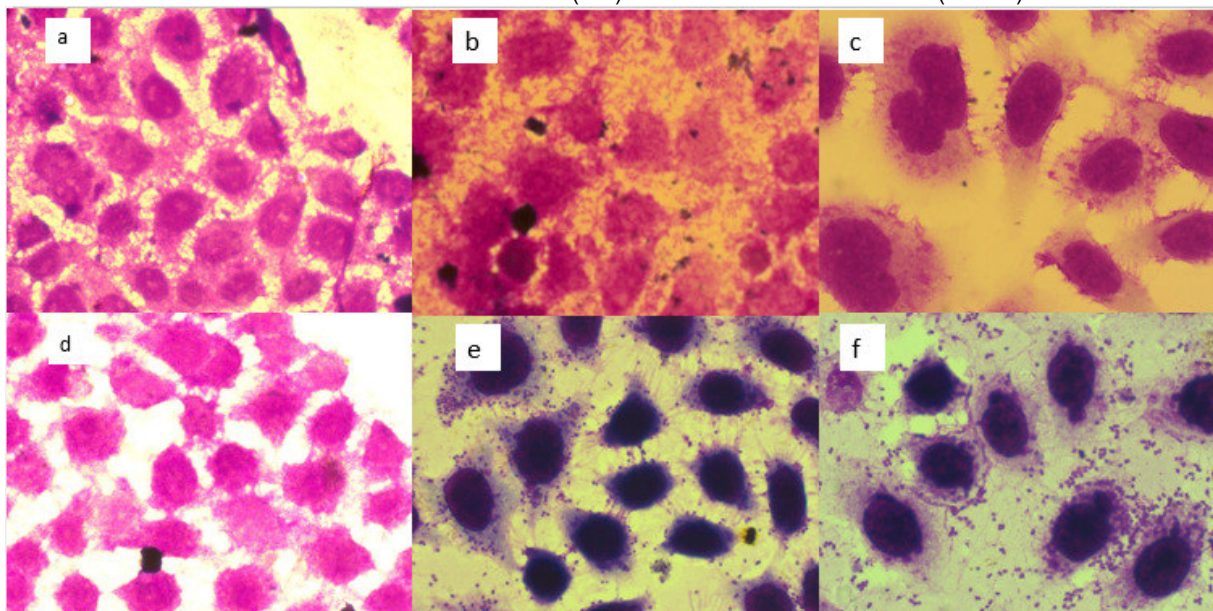
Legenda: R – resistente; I – sensibilidade intermediária; SUT - Sulfametoxazol/Trimetoprim (1,25/23,75µg); AMP - Ampicilina (10µg); CFL - Cefalotina (30µg); AMC - Amoxicilina/Ácido Clavulânico (20/10µg); CRX - Cefuroxima 30µg; EPEC B – *E. coli* enteropatogênica clássica sorotipo B; EPEC C – *E. coli* enteropatogênica clássica sorotipo C; EIEC A – *E. coli* enteroinvasora sorotipo A; AD – aderência difusa; AA – aderência agregativa; AL – aderência localizada.

**FIGURA 03** – Aderência agregativa (AA) de *E. coli* às células HeLa (microscopia de 1000x)



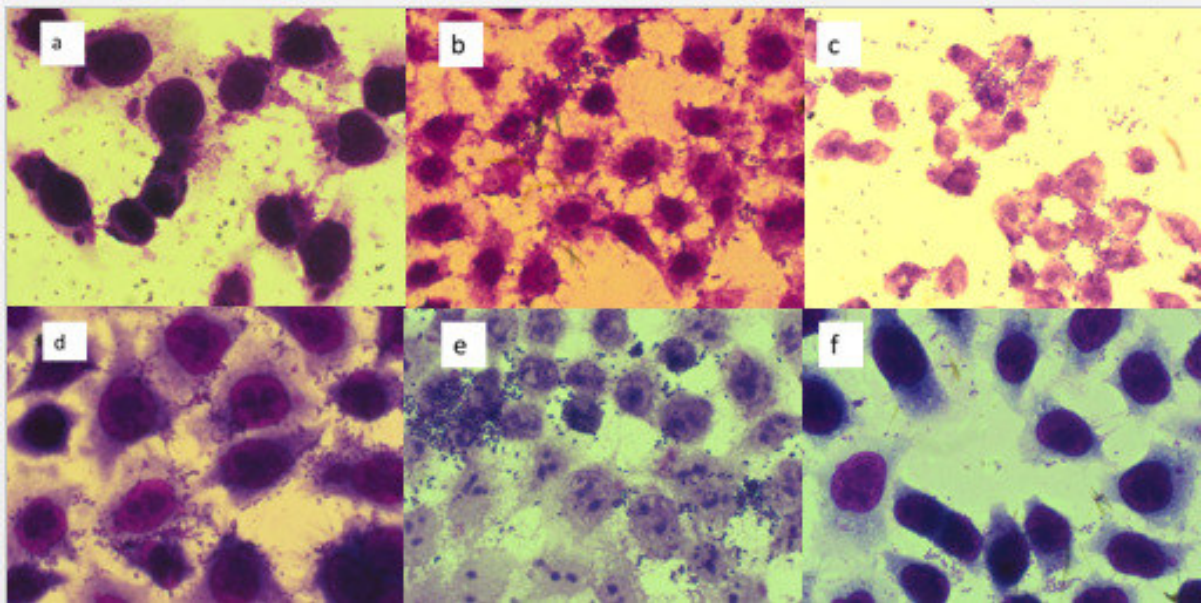
Legenda: (a) = EAEC; (b) = amostra 23

**FIGURA 04** – Aderência difusa (AD) de *E. coli* às células HeLa (1000x)



Legenda: (a) = EIEC; (b) = *E. coli* O26; (c) = *E. coli* O124; (d) = *E. coli* O136; (e) = amostra 6; (f) = amostra 18

**FIGURA 05** – Aderência localizada (AL) de *E. coli* às células HeLa (1000x)



Legenda: (a) = *E. coli* enteropatogênica; (b) = *E. coli* enterotoxigênica; (c) = *E. coli* O119; (d) = amostra 2; (e) = amostra 11; (f) = amostra 21

### 3.4 DISCUSSÃO

Os alimentos podem ser uma importante fonte de infecção para o homem. A pesquisa de potenciais agentes patogênicos, bem como bactérias multirresistentes, associadas à avaliação da qualidade dos alimentos prontos para consumo, como os queijos, são de alta relevância para evitar agravo de infecções causadas por estes.

O perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de *E. coli* pode servir como um indicador de exposição a antimicrobianos (GUIMARÃES *et al.*, 2012). No presente estudo, as amostras de queijo analisadas apresentaram isolados resistentes a sulfametoxazol/trimetoprim, cefalotina, ampicilina, cefuroxima e amoxicilina/ácido clavulânico. Cook *et al.* (2011) avaliaram a resistência antimicrobiana de *E. coli* isolada de carne de vitelo alimentado com leite no Sul de Ontário, Canadá e observaram maior ocorrência de resistência em animais alimentados com leite do que aqueles alimentados por grãos. Bonyadian, Moshtaghi e Akhavant-Taheri (2014) avaliaram a resistência antimicrobiana de *E. coli* isolada de leite fresco e queijos não pasteurizados e todos os 120 isolados foram resistentes a oxitetraciclina. Estes autores observaram que

gentamicina, sulfametoxazol/trimetoprim, ciprofloxacina, e ampicilina, apresentaram 30%, 28%, 20% e 23,4% de resistência respectivamente.

Neste estudo, 9 amostras apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano avaliado e dentre estas 22,2% (2/9) foram multirresistentes, apresentando resistência a três ou mais classes de antimicrobianos. Os 2 isolados multirresistentes foram provenientes de amostras distintas e coletadas em diferentes cidades da região nordeste. Multirresistência em *E. coli* isolada de queijo coalho também foi observada nos estudos conduzidos por Guimarães *et al.* (2012).

Três isolados apresentaram resistência a sulfametoxazol/trimetoprim e ampicilina. Melo *et al.* (2015) observaram resistência em isolados de alimentos para ampicilina e tetraciclina. Vidovic *et al.* (2013), observaram aproximadamente metade dos isolados de *E. coli* O157 (54%) resistentes a pelo menos um antimicrobiano, resistência para gentamicina, cloranfenicol, tetraciclina, ampicilina, estreptomicina e cefoxitina, e 46% (46/100) dos isolados foram susceptíveis a todos os 17 antimicrobianos avaliados. Estes autores atribuíram a resistência observada à pressão seletiva realizada devido ao uso de antimicrobianos administrados para promoção de crescimento animal num intensivo manejo da agropecuária. Os estudos conduzidos por Bok *et al.* (2015) apontam maior prevalência de resistência nos isolados da *E. coli* de laticínios do que de produtores de carnes, possivelmente pelo maior uso de antimicrobianos no tratamento de mastite. Nguyen *et al.* (2005) reportaram o uso de sulfametoxazol/trimetoprim, ampicilina e tetraciclina para tratamento de diarreia em países em desenvolvimento devido ao seu baixo custo e alta disponibilidade, observando resistência a estes antimicrobianos em seus estudos. Bactérias resistentes a antimicrobianos no intestino de animais contribuem significativamente para a contaminação do ambiente e disseminação de bactérias resistentes através de alimentos de origem animal (IVBADE, OJO e DIPEOLU, 2014). Para diferenciar isolados de *E. coli* O157 humanos dos bovinos na região oeste do Canadá, o teste de susceptibilidade antimicrobiana foi a mais característica (VIDOVIC *et al.*, 2013).

No presente estudo foram isolados dois EPEC B e um EPEC A, no entanto nenhum isolado apresentou os genes pesquisados. Bonyadian, Moshtaghi e Akhavant-Taheri (2014) avaliaram quatro genes de virulência de *E. coli* ETEC e EAEC isoladas de leite

fresco e queijos não pasteurizados e dentre os 120 isolados, 21,6% foram potencialmente virulentos (n=26), pois o consumo destes pode trazer risco de infecção humana e a transferência de fatores de resistência à microbiota intestinal do consumidor. Ivbade *et al.* (2014) isolaram *E. coli* O157:H7 de 5% das 202 amostras de leite e derivados (n=10) no estado de Ogun, Nigéria. Carvalho *et al.* (2015) identificaram *E. coli* O157:H7 em 6,67% das 30 amostras de queijo Minas Frescal comercializados em feiras livres (n=2) em Goiânia, Brasil. Esho *et al.* (2013) realizaram a identificação de isolados presuntivos de *E. coli* por PCR em tempo real e a análise de MALDI-TOF Mass Spectrophotometry (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight*) nas 126 amostras de queijos naturais no Japão e nenhuma das amostras foi positiva. No entanto, uma amostra (0,79%) apresentou positividade para o gene *ipaH*, indicando a presença de EIEC ou *Shigella* spp.

Habilidade a aderência em diferentes superfícies, e formação de biofilme tem sido importantes para a virulência de *E. coli* (CERGOLE-NOVELLA *et al.*, 2015). No presente estudo, todos os isolados apresentaram capacidade de formação de biofilme. Além disto, resistência antimicrobiana em isolados formadores de biofilmes e com capacidade de interagir com células epiteliais irá contribuir para sua persistência, o qual pode levar a infecções crônicas e problemas de tratamento (CERGOLE-NOVELLA *et al.*, 2015).

### 3.5 CONCLUSÃO

Apesar da ausência dos genes de virulência, a presença de *E. coli* e o perfil de susceptibilidade das amostras podem representar um risco à saúde de seus consumidores por indicarem a presença de contaminação fecal e disseminação de resistência a antimicrobianos bem como a capacidade de formação de biofilme e de aderência em células HeLa.

## **Agradecimentos**

À empresa Laborclin, que através do programa de Treinamento e Incentivo à Pesquisa realizou a doação dos meios de cultura e reagentes utilizados. Ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Paraná, Labmicro por ter permitido a realização da pesquisa. Ao Laboratório de Neurobiologia da Universidade Federal do Paraná, por ter doado células HeLa para a realização da pesquisa. À Prof. Dra. Juliana de Moura da Universidade Federal do Paraná, por ter orientado na realização da pesquisa com células HeLa. Ao Prof. Dr. Nelson Nakazato da Universidade Estadual de Londrina, por ter doado linhagens de *E. coli* para realização da pesquisa com oligonucleotídeos iniciadores específicos e com células HeLa.

## **Contribuição dos autores**

Elisa H. U. Yamanaka e Mariana V. Porsani tiveram contribuição substancial na concepção, aquisição e análise dos dados. Laura L. Cogo, Patrícia R. Dalzoto e Ida C. Pimentel revisaram criticamente o conteúdo.

## **Conflito de interesse**

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

- BLANCO, M.; BLANCO, J.E.; MORA, A.; DAHBI, G.; ALONSO, M.P.; GONZÁLEZ, E.A.; BERNÁRDEZ, M.I.; BLANCO, J. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae-xi). **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 645-651, 2004.
- BOK, E.; JMAZUREK, J.; STOSIK, M.; WOJCIECH, M.; BALDY-CHUDZIK, K. Prevalence of Virulence Determinants and Antimicrobial Resistance among Commensal *Escherichia coli* Derived from Dairy and Beef Cattle. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 12, p. 970–985, 2015.
- BONYADIAN, M., MOSHTAGHI, H., AKHAVAN TAHERI, M. Molecular characterization and antibiotic resistance of enterotoxigenic and entero-aggregative *Escherichia coli* isolated from raw milk and unpasteurized cheeses. **Veterinary Research Forum : an International Quarterly Journal**, v. 5, n. 1, p. 29-34, 2014.
- CARVALHO, R. N., DE OLIVEIRA, A. N., DE MESQUITA, A. J., MINAFRA E REZENDE, C. S., DE MESQUITA, A. Q., ROMERO, R. A. M. PCR and ELISA (VIDAS ECO O157®) *Escherichia coli* O157:H7 identification in Minas Frescal cheese commercialized in Goiânia, GO. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 7–10, 2014.
- CERGOLE-NOVELLA, M.C.; PIGNATARI, A.C.C.; GUTH, B.E.C. Adhesion, biofilm and genotypic characteristics of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p.167-171, 2015.
- CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 25th Informational Supplement M100-S25, Wayne, PA. 2015a.
- CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard M02-A12. Twelfth Edition, Wayne, PA. 2015b.
- COOK, A.; REID-SMITH, R.J.; IRWIN, R.J.; MCEWEN, S.A.; YOUNG, V.; BUTT, K.; RIBBLE, C. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from retail milk-fed veal meat from Southern Ontario, Canada. **Journal of Food Protection**, v. 74, n. 8, p.1328-1333, 2011.
- CROXEN, M.A.; LAW, R.J.; SCHOLZ, R.; KEENEY, K.M.; WLODARSKA, M.; FINLAY, B.B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, p. 822-880, 2013.

DELBÈS-PAUS, C.; MISZCZYCHA, S.; GANET, S.; HELINCK, S.; VEISSEIRE, P.; POCHET, S.; THÉVENOT, D.; MONTELA, M.C. Behavior of *Escherichia coli* O26:H11 in the presence of *Hafnia alvei* in a model cheese ecosystem. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, p. 212–218, 2013.

DESIN, T.S.; TOWNSEND, H.G.; POTTER, A.A. Antibodies Directed against Shiga-Toxin Producing *Escherichia coli* Serotype O103 Type III Secreted Proteins Block Adherence of Heterologous STEC Serotypes to HEp-2 Cells. **PLoS One**, 2015, v. 10, n. 10, e0139803, 2015. Disponível em: DOI:10.1371/journal.pone.0139803. Acesso em: 17.04.2016.

ESHO, F. K., ENKHTUYA, B., KUSUMOTO, A., & KAWAMOTO, K. Microbial Assessment and Prevalence of Foodborne Pathogens in Natural Cheeses in Japan. **BioMed Research International**, v. 2013, e205801, 2013. Disponível em: <http://doi.org/10.1155/2013/205801>. Acesso em 17.04.2016.

ESTRADA-GARCIA, T.; NAVARRO-GARCIA, F. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 66, p. 281–298, 2012.

GOULD, L.H.; MUNGAI, E.; BEHAVESH, C.B. Outbreaks attributed to cheese: differences between outbreaks caused by unpasteurized and pasteurized dairy products, United States, 1998-2011. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 11, p. 545-551, 2014.

GUIMARÃES, A.G.; CARDOSO, R.C.V.; AZEVÊDO, P.F.; MENESES, R.B. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de queijos coalho. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 2, p. 259-265, 2012.

GUION, C. A.; OCHOA, T. J.; WALKER, C. M.; BARLETTA, F.; CLEARY, T. G. Detection of diarrheagenic *Escherichia coli* by use of melting-curve analysis and real-time multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 1752-1757, 2008.

HERNANDES, R.T.; DE LA CRUZ, M.A.; YAMAMOTO, D.; GIRÓN, J.A.; GOMES, T.A.T. Dissection of the Role of Pili and Type 2 and 3 Secretion Systems in Adherence and Biofilm Formation of an Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* Strain. **Infection and Immunity**, v. 81, p. 3793–3802, 2013.

IVBADE, A.; OJO, O.E.; DIPEOLU, M.A. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in milk and milk products in Ogun State, Nigeria. **Veterinaria Italiana**, v. 50, n. 3, p.185-191, 2014.

LE BOUGUÉNEC, C.; SERVIN, A.L. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. **FEMS Microbiology Letters**, v. 256, p. 185–194, 2006.

LEE, C.; CHO, I.H.; JEONG, B.C.; LEE, S.H. Strategies to Minimize Antibiotic Resistance. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, p. 4274-4305, 2013.

LOPEZ-SAUCEDO, C.; CERNA, J. F.; VILLEGAS-SEPULVEDA, N.; THOMPSON, R.; VELAZQUEZ, F. R.; TORRES, J. TARR, P. I.; ESTRADA-GARCIA, T. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p. 127–131, 2003.

MARTINS, J.M.; GALINARI, É; PIMENTEL-FILHO, N.J.; RIBEIRO-JUNIOR, J.I.; FURTADO, M.M.; FERREIRA, C.L. Determining the minimum ripening time of artisanal Minas cheese, a traditional Brazilian cheese. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p.219-230, 2015.

MELO, D.B.; MENEZES, A.P.O.; REIS, J.N.; GUIMARÃES, A.G. Antimicrobial resistance and genetic diversity of *Escherichia coli* isolated from humans and foods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 4, p. 1165-1170, 2015.

NATARO, J.P.; KAPER, J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p. 142-201, 1998.

NGUYEN, T.V.; LE, P.V.; LE, C.H.; WEINTRAUB, A. Antibiotic Resistance in Diarrheagenic *Escherichia coli* and *Shigella* Strains Isolated from Children in Hanoi, Vietnam. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 2, p. 816-819, 2005.

PUÑO-SARMIENTO, J.; GAZAL, L.E.; MEDEIROS, L.P.; NISHIO, E.K.; KOBAYASHI, R.K.; NAKAZATO, G. Identification of diarrheagenic *Escherichia coli* strains from avian organic fertilizers. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, p. 8924-8939, 2014.

QADRI, F.; SVENNERHOLM, A.M.; FARUQUE, A.S.G.; SACK, R.B. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, p. 465–483, 2005.

SATO, T.; OKUBO, T; USUI, M.; YOKOTA, S.; IZUMIYAMA, S.; TAMURA, Y. Association of veterinary third-generation cephalosporin use with the risk of emergence of extended-spectrum-cephalosporin resistance in *Escherichia coli* from dairy cattle in Japan. **PLoS One**, v. 9, n. 4, e96101, 2014. Disponível em: doi:10.1371/journal.pone.0096101. Acesso em: 17.04.2016.

SCALETSKY, I.C.; SILVA, M.L.; TRABULSI, L.R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infection and Immunity**, v. 45, p. 534–536, 1984.

SETHABUTR, O.; VENKATESAN, M.; MURPHY, G. S.; EAMPOKALAP, B.; HOGE, C. W.; ECHEVERRIA, P. Detection of Shigellae and enteroinvasive *Escherichia coli* by amplification of the invasion plasmid antigen H DNA sequence in patients with dysentery. **Journal of Infectious Diseases**, v. 167, p. 458–461, 1993.

SILVA, F.F.P.; HORVATH, M.B.; SILVEIRA, J.G.; PIETA, L.; TONDO, E.C. Occurrence of *Salmonella* spp. and generic *Escherichia coli* on beef carcasses sampled at a Brazilian slaughterhouse. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 17-23, 2014.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água**. Livraria Varela, São Paulo, 4<sup>a</sup> ed. 2010.

TOMA, C.; LU, Y.; HIGA, N.; NAKASONE, N.; CHINEN, I.; BASCHKIER, A.; RIVAS, M.; IWANAGA, M. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 2669–2671. 2003.

TRABULSI, L.R.; KELLER, R.; TARDELLI GOMES, T.A. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, p. 508–513, 2002.

VASCONCELOS, F.M. **Estudo do padrão de adesão agregativa de *Escherichia coli* do sorotipo O142:H34**. 63f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

VICENTE, V. A.; ATTILI-ANGELIS, D.; PIE, M. R.; QUEIROZ-TELLES, F.; CRUZ, L. M.; NAJAFZADEH, M. J.; de HOOG, G.S.; ZHAO, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Mycology**, v. 61, p. 137–144, 2008.

VIDOVIC, S.; TSOI, S.; MEDIHALA, P.; LIU, J.; WYLIE, J.L.; LEVETT, P.N.; KORBER, D.R. Molecular and antimicrobial susceptibility analyses distinguish clinical from bovine *Escherichia coli* O157 strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, p. 2082-2088, 2013.

XUE, T.; CHEN, X.; SHANG, F. Effects of lactose and milk on the expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from a dairy cow with mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 10, p. 6129–6134, 2014.

WAKIMOTO, N.; NISHI, J.; SHEIKH, J.; NATARO, J.P.; SARANTUYA, J.; IWASHITA, M.; MANAGO, K.; TOKUDA, K.; YOSHINAGA, M.; KAWANO, Y. Quantitative biofilm assay using a microtiter plate to screen for enteroaggregative *Escherichia coli*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, p. 687-690, 2004.

WANG, G.; CLARK, C. G.; RODGERS, F. G. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 Shiga toxin family by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, p. 3613–3619, 2002.

YAMANAKA, E.H.U.; COGO, L.L.; DALZOTO, P.; PIMENTEL, I.C. Microbial quality of Brazilian artisanal cheese and fermented sausages. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 2016 (In Press).

YOU, Y.; SILBERGELD, .E.K. Learning from agriculture: understanding low-dose antimicrobials as drivers of resistome expansion. **Front Microbiology**, v. 5, p. 284, 2014.

#### **4 *Staphylococcus* COAGULASE POSITIVA ISOLADO DE QUEIJOS E SALAMES ARTESANAIS EM CAPITALS BRASILEIRAS: ENTEROTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS, SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA, FORMAÇÃO DE BIOFILME E TESTE DE ADERÊNCIA.**

##### **Lista de autores e afiliação**

Elisa H. U. Yamanaka<sup>1\*</sup>, Laura L. Cogo<sup>2</sup>, Patrícia R. Dalzoto<sup>3</sup>, Mariana V. Porsani<sup>1</sup>, Ida C. Pimentel<sup>1</sup>

\*Endereço para correspondência: <sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia, Parasitologia e Patologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba. Tel: 55 (41) 3078.5833 / 9182.4575. Rua Professor Dário Veloso, 113 Ap. 401, Curitiba, PR. CEP 80320-050. Email: [elisauem@ufpr.br](mailto:elisauem@ufpr.br)

<sup>2</sup>Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR

<sup>3</sup>Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Patologia Básica. LabMicro, Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR

## RESUMO

*Staphylococcus* coagulase positiva está associado com intoxicação alimentar estafilocócica (SFP) em vários surtos alimentares de origem animal no mundo, envolvendo queijos e salames, demonstrando a relevância da origem deste micro-organismo em alimentos prontos para consumo. O presente trabalho teve como objetivo pesquisar genes codificadores de enterotoxina estafilocócica, avaliar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, capacidade de formação de biofilme bem como o perfil de aderência em células HeLa de *Staphylococcus* coagulase positiva isolados de queijos e salames, produzidos artesanalmente, nas regiões metropolitanas de capitais brasileiras. Foi observada resistência antimicrobiana à penicilina, tetraciclina, ciprofloxacina, teicoplanina e sulfametoxazol/trimetoprim. Resistência a dois ou mais antimicrobianos foi observada em 7/14 (50%) dos isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva. A pesquisa dos genes codificadores de enterotoxinas demonstrou a presença de genes *seg*, *sei*, *sen* e *seu*. A presença de *Staphylococcus* coagulase positiva produtores de enterotoxinas no presente trabalho demonstra o risco de ingestão de micro-organismos através de alimentos como queijos e salames.

**Palavras chave:** resistência antimicrobiana; estafilococoagulase; intoxicação alimentar estafilocócica.

## ABSTRACT

Coagulase positive staphylococci is associated with staphylococcal food poisoning (SFP) in various food outbreaks of animal origin in the world, involving cheeses and fermented sausages, demonstrating the relevance of the origin of this micro-organism in ready-to-eat foods. This study aimed to find genes encoding staphylococcal enterotoxin, evaluate the susceptibility profile to antimicrobials, ability to biofilm formation and the adhesion profile to HeLa cells of coagulase positive staphylococci isolated from artisanal cheeses and fermented sausages, from the metropolitan area of Brazilian capitals. It was observed antimicrobial resistance to penicillin, tetracycline, ciprofloxacin, teicoplanin, and sulfamethoxazole / trimethoprim. Resistance to two or more antibiotics was observed in 7/14 (50%) of coagulase positive staphylococci isolates. The research of the genes encoding enterotoxins showed the presence of *seg*, *sei*, *sen* and *seu* genes. The presence of enterotoxin producer coagulase positive staphylococci in this study shows the risk of ingesting microorganisms through foods such as cheeses and fermented sausages.

**Key words:** Antimicrobial resistance, staphylocoagulase; staphylococcal food poisoning.

## 4.1 INTRODUÇÃO

*Staphylococcus* coagulase positiva é um patógeno, que causa uma ampla variedade de doenças em humanos e animais, no entanto aproximadamente 30% dos humanos são portadores assintomáticos do micro-organismo. O potencial patogênico do micro-organismo deve-se à presença de genes de resistência antimicrobiana, enterotoxinas estafilocócicas, ou outros fatores de virulência incluindo adesinas, colagenases, proteína A, coagulases, hemolisinas e leucocidinas, e a capacidade de adaptar aos mais diversos arsenais ou hospedeiros (KRAKAUER e STYLES, 2013).

O patógeno está associado com intoxicação alimentar estafilocócica em vários surtos alimentares de origem animal no mundo, envolvendo leite, cremes, queijos, hambúrguer, salames e carnes cozidas sendo que a origem de *Staphylococcus* coagulase positiva são na maioria das vezes os animais infetados (ORTEGA *et al.*, 2010). Na pecuária *S. aureus* está associada à mastite bovina, que pode ser transmitida de animal para animal durante o processo de ordenha, trazendo efeitos negativos na produção e qualidade do leite, ocasionando grandes perdas econômicas aos laticínios (COSTA *et al.*, 2014), sendo a principal preocupação em seu controle, a resistência do agente etiológico aos antimicrobianos usados indiscriminadamente na medicina veterinária (MARTINS *et al.*, 2015).

Medidas de boas práticas higiênicas durante a ordenha e manuseio do animal são essenciais, pois *Staphylococcus* coagulase positiva é também comumente encontrada na superfície da pele, narinas e vulvas dos animais, bem como no meio ambiente (ZANARDI *et al.*, 2014). O uso de leite cru é comum para a produção de alguns queijos, como por exemplo queijo Suíço, visando manter as enzimas do leite para dar sabor ao queijo. Como consequência, a microbiota bacteriana presente no leite entregue pelos produtores rurais é crucial para a qualidade e segurança do queijo (HUMMERJOHANN *et al.*, 2014).

A SFP (intoxicação alimentar estafilocócica) resulta da ingestão de alimento contendo toxina estafilocócica enterotoxigênica produzida durante sua multiplicação e os efeitos ocorrem no trato gastrointestinal (GUIMARÃES *et al.*, 2013). A produção da toxina no alimento processado, principalmente cárneos e lácteos, se dá durante a sua

manipulação e a multiplicação durante estocagem em temperaturas elevadas. Os sintomas aparecem rapidamente e incluem náuseas, vômitos violentos, com ou sem diarreia (ARGUDIN, MENDOZA e RODICIO, 2010; OMOE *et al.*, 2013).

Enterotoxina A (SEA) e enterotoxina D (SED) são as SE (enterotoxinas estafilocócicas) mais comumente observadas nas SFP. SE, juntamente com as enterotoxinas B (SEB), C (SEC), E (SEE) são as mais conhecidas. Recentemente foram reportadas as toxinas SEG, SEH, SEI, SER, SES e SET, e as enterotoxinas-like (SEI) SEIJ, SEIK, SEIL, SEIM, SEIN, SEIO, SEIP, SEIQ, SEIU, e SEIV. Até agora, mais de 20 SE foram descritas (HENNEKINNE, 2010; ALIBAYOV, 2014). Enterotoxina A, seja sozinha ou associada a outras, é considerada como a principal causa de SFP, provavelmente devido à sua alta resistência a enzimas proteolíticas (ARGUDIN, MENDOZA e RODICIO, 2010; GUIMARÃES *et al.*, 2013; NAGARAJ *et al.*, 2014).

Genes codificadores de SE são variáveis, podendo ser elementos genéticos móveis, como plasmídeos, profagos, ilhas de patogenicidade de *S. aureus*, ilhas genômicas, ou próximas a um elemento genômico denominado cassete cromossômico estafilocócico (ARGUDIN, MENDOZA e RODICIO, 2010; GUIMARÃES *et al.*, 2013). Devido à mobilidade genética através dos *S. aureus*, podem modificar a habilidade destes em causar doenças e contribuir para a evolução deste importante patógeno (ARGUDIN, MENDOZA e RODICIO, 2010). O controle de produção de SE é complexo e envolve vários *loci*, incluindo o operon *quorum-sensing accessory gene regulator (agr)*. Este fato pode explicar a necessidade de crescimento relativamente denso de *S. aureus* para causar SFP (aproximadamente  $10^5$  UFC/g) (HUMMERJOHANN *et al.*, 2014).

A formação de biofilme é um potencial fator de virulência, especialmente para *S. aureus* em ambiente de processamento de leite devido à capacidade em se fixar a superfícies de aço inoxidável ou borracha (LEE *et al.*, 2014). *Staphylococcus* são conhecidos pela sua extraordinária habilidade em se aderir a superfícies plásticas (OTTO, 2008). Biofilmes são um conjunto de células bacterianas enclausuradas numa matriz polimérica e aderidas a uma superfície inerte ou viva, que se acumulam, amadurecem e que se destacam para disseminação e persistência dos micro-organismos (LEE *et al.*, 2014). Esta propriedade que *Staphylococcus* spp. possuem contribui para a aderência e colonização do epitélio da glândula mamária nas mastites bovinas. Infecções

intramamárias causadas por *S. aureus* podem trazer severas consequências à saúde do consumidor, pois as toxinas secretadas permanecem estáveis no leite e seus derivados, causando intoxicação alimentar (MARTINS *et al.*, 2015). A estrutura de biofilme protege a bactéria contra altas concentrações antimicrobianas e fagocitose, permitindo a sobrevivência em ambientes hostis no hospedeiro (OTTO, 2008; XUE, CHEN e SHANG, 2014).

Aderência de *S. aureus* a várias heparans sulfonatadas é importante na sua interação com células epiteliais. O uso de células HeLa em testes de aderência tem a vantagem em demonstrar a interação com receptores celulares superficiais microbianos com a expressão de fibronectina (PLOTKIN *et al.*, 2016).

A cada dia se observa uma crescente resistência de *S. aureus* a antimicrobianos como meticilina e vancomicina, representando uma séria preocupação à sociedade (KRAKAUER e STYLES, 2013). Alguns antimicrobianos tem sido proibidos nos Estados Unidos para uso veterinário com o objetivo de preservar a utilidade clínica humana (LEE *et al.*, 2013; VERRAES *et al.*, 2013).

*S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA) contém o gene *mecA*, codificando para a variante da proteína ligadora de penicilina (PBP), chamada PBP2A, que possui baixa afinidade para  $\beta$ -lactâmicos. Assim, na presença de  $\beta$ -lactâmicos, a única PBP que permanece viável é a de baixa afinidade PBP2A (PINHO *et al.*, 2001).

O risco de intoxicação alimentar pelo consumo de produtos crus contaminados por *Staphylococcus* coagulase positiva é bem reconhecido. A avaliação dos genes codificadores de toxinas nos alimentos estudados ajuda na determinação do potencial toxigênico dessas cepas. Por outro lado, o perfil de susceptibilidade, apesar de não ter risco bem esclarecido, alerta para disseminação das cepas resistentes através dos alimentos de origem animal. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo pesquisar a ocorrência dos genes codificadores de enterotoxina estafilocócica, bem como avaliar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, a capacidade de formação de biofilme e aderência em células HeLa de *Staphylococcus* coagulase positiva isolados de queijos com alto teor de umidade e salames, produzidos artesanalmente, os quais foram adquiridos comercialmente nas regiões metropolitanas de capitais brasileiras.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

No período de janeiro a dezembro de 2013 foram coletadas amostras de queijos produzidas artesanalmente na região metropolitana de Porto Alegre, Curitiba, São Paulo, Salvador, Belo Horizonte, Recife, Natal, Fortaleza, Manaus e Brasília, totalizando 32 amostras de queijo e 13 amostras de salame. Ao término da etapa de isolamento primário (YAMANAKA *et al.*, 2016) foi realizada purificação de colônias com diferentes morfotipos, semeando-se em ágar nutriente contendo substrato cromogênico, Cromoclin US (Laborclin). Subsequentemente foram suspensas em solução crio protetora contendo pérolas de porcelana, Cryobank® (Copan, Brescia, Itália), e mantidas a -80°C, para as pesquisas subsequentes.

Foram selecionados 10 isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva, com diferentes morfotipos, a partir de 8 amostras de queijos e uma amostra de salame para a pesquisa de genes de virulência, avaliação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, formação de biofilme e teste de aderência em células HeLa.

### 4.2.1 Extração de ácido desoxirribonucléico (DNA)

O DNA utilizado para análise do PCR foi extraído através da adaptação do método de extração descrito por Vicente *et al.* (2008). Os isolados foram repicados em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) a 33-37°C por 24 horas, a suspensão bacteriana foi centrifugada por 12.000xg por 10 min, e ressuspensa em 500µL de tampão brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) contendo sílica-celite (2:1), realizando-se maceração por 1 a 5 minutos. Subsequentemente, foi incubado em banho maria a 65°C por 10 min. O DNA foi extraído em CIA (Clorofórmio-álcool isoamílico - 24:1, v/v), e precipitação em etanol 96% gelado. O pellet de DNA foi lavado com etanol 70% gelado, seco ao ar e ressuspensa em água estéril ultrafiltrada. A qualidade do DNA foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 0,8% (Invitrogen®). O DNA foi quantificado através de leitura em espectrofotômetro NanoDrop® 1000 (NanoDrop Technologies, Inc. Wilmington, DE, EUA), padronizado em 30ng/µL com água estéril ultrafiltrada e armazenado a -20°C até a realização do PCR.

#### 4.2.2 Pesquisa de Genes de Virulência por PCR

Utilizou-se oligonucleotídeos iniciadores específicos, codificadores de genes de enterotoxinas, Invitrogen (Thermo Fischer Scientific, EUA). Para cada gene, a sequência do oligonucleotídeo iniciador, o tamanho do fragmento de DNA produzido usada está descrito no Quadro 02. Como controle positivo e negativo foram utilizadas as cepas de referência: *S. aureus* ATCC 6538P (*coa+*), ATCC 9144 (*coa+*), ATCC 9801 (*seg+*, *sei+*, *sen+* *seu+*). A amplificação do DNA bacteriano foi realizada utilizando-se 90ng de DNA em 20 µL de mistura reativa contendo 1,25 U de *Taq* polymerase (Invitrogen®), 0,20 mM de cada *deoxynucleoside triphosphate* (dNTP) (Invitrogen®), 2 mM de cloreto de magnésio (Invitrogen®), 1 mM de PCR buffer 10x (Invitrogen®), 0,6 mM de cada oligonucleotídeo iniciador (Invitrogen®), e completando-se o volume com água estéril ultrapurificada. As condições do termociclador (Termociclador Bioer Lifepro - Thermal cycler Bioer Servis Life) foram padronizadas com um ciclo de desnaturação inicial de 94°C por 3 min e 30 ciclos 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min e elongação final de 72°C por 8 min. Para seleção de temperatura de anelamento foi realizado gradiente de temperatura entre 52 e 58°C. A qualidade da amplificação foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1,6% (Invitrogen®) em tampão TBE 1X (Tris-borate EDTA buffer). As amostras foram aplicadas após misturar 8µL do DNA extraído com 2µL de tampão de corrida Gel Red 50x. As corridas eletroforéticas foram realizadas utilizando fonte de eletroforese horizontal a 100V durante 50 minutos (Locus Biotecnologia, modelo LCH-12X14. Fonte: Life Technologies, modelo 250). Os géis de agarose foram visualizados e as imagens registradas em transluminador ultravioleta Fluor Chem FC2 (Cell Biosciences Inc, Santa Clara, EUA), Marcador de DNA 1 kb (Invitrogen®) foi incluído em cada corrida.

**QUADRO 02** – Oligonucleotídeos iniciadores para prova de PCR para genes de *Staphylococcus* coagulase positiva Enterotoxigênicas

Gene	Orien- tação	Sequência do iniciador (5'→ 3')	Toxina	Tamanho do produto (pb)	Referência
<i>seg</i>	F R	GGT TCA TTG TCA AAT AGA CTG (F) CTA TTG TCG ATT GTT ACC TG (R)	SEG	520	Nagaraj <i>et al.</i> (2012)
<i>sei</i>	F R	GGT GAT ATT GGT GTA GGT AA (F) CAT ATT CTT TGC CTT TAC CAG (R)	SEI	451	Nagaraj <i>et al.</i> (2012)
<i>sen</i>	F R	TAA ACG GAG GAG TTA CGA TA (F) AAC TCT GCT CCT ACT GAA CC (R)	SEN	301	Tang <i>et al.</i> (2012)
<i>seu</i>	F R	AAA CAT TAA AGC CCA AGA G (F) ACA CCG CCA TAC ATA CAC (R)	SEU	243	Tang <i>et al.</i> (2012)
<i>coa</i>	F R	CGT TAC AAG GTG AAA TCG TT (F) CCA TAT TGA GAA GCT TCT GTT G (R)	coagulase	247	Nagaraj <i>et al.</i> (2012)

Legenda: F - Senso R – Antisenso; SEG: enterotoxina G; SEI: enterotoxina I; SEN: enterotoxina N; SEU: enterotoxina U

#### 4.2.3 Avaliação do Perfil de Susceptibilidade a Antimicrobianos

Com o objetivo de avaliar o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva foi utilizado o método de disco difusão em ágar, Kirby-Bauer (CLSI, 2015a).

Foram utilizados 10 discos de antimicrobianos (Laborclin, Pinhais, Brasil)), incluindo gentamicina (GEN) 10µg, ciprofloxacina (CIP) 5µg, sulfametoxazol/trimetoprim (SUT) 1,25/23,75µg, cloranfenicol (CLO) 30µg, penicilina (PEN) 10U, rifampicina (RIF) 5µg, tetraciclina (TET) 30µg, teicoplanina (TEC) 30µg, nitrofurantoína (NIT) 300µg, tobramicina (TOB) 10µg. A placa foi incubada por 24 horas a 35±2°C e o halo medido em mm para avaliar susceptibilidade ou resistência da cepa, através de dados disponíveis em tabela CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), (2015b). Os foram definidos como susceptível (S), resistência intermediária (I) e resistente (R), de acordo com os critérios do CLSI (2015b). Multirresistência (MDR) foi definida como resistência a pelo menos duas classes de antimicrobianos usados neste estudo (WAN *et al.*, 2011).

Para triagem com a suplementação de vancomicina no meio ágar BHI, uma placa de triagem de ágar BHI suplementado com 2 µg/mL vancomicina foi inoculada para aumentar a sensibilidade de detecção de cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva com resistência intermediária e ou alto grau de resistência à vancomicina (CLSI, 2015). Com a mesma suspensão utilizada para o antibiograma foi semeada na superfície do ágar BHI e em seguida as placas foram incubadas por 24 horas a 33-37°C. Havendo

crescimento, foram reportados como vancomicina resistente, ou não havendo crescimento, reportou-se como vancomicina sensível.

Para teste fenotípico primário para resistência à meticilina ou oxacilina em *Staphylococcus* foi realizado o método de disco difusão Kirby-Bauer, usando disco de cefoxitina (30 µg). Havendo formação de halo maior do que 22 mm, foram reportados como oxacilina sensível ou *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA), ou halo menor ou igual a 21 mm, reporta-se como oxacilina resistente (R) ou MRSA (CLSI, 2015).

#### 4.2.4 Formação de Biofilme

A determinação quantitativa de produção de biofilme foi realizada em placas para microtitulação de poliestireno, adaptada da técnica descrita por Stepanovic *et al.* (2000). Culturas de 18 horas foram diluídas até a concentração de  $10^8$  células/mL (escala 0,5 de MacFarland) em TSB (*Tryptic Soy Broth*), e 200 µL desta suspensão foi usada para inocular e 3 poços de placas planas de microtitulação com 96 poços. Após incubação de 24 horas a 37°C, o conteúdo das placas foi descartado. Os poços foram lavados 3 vezes com Tampão Salina Fosfatada (PBS - pH 7,2), e secas ao ar. Células foram fixadas pelo calor através da exposição ao ar quente a 60°C por 60 min. O biofilme aderido foi corado com cristal violeta 0,5% por 1 minuto e o excesso de corante foi removido pelo enxágue com água corrente. Após secagem foi resolubilizado com etanol 95% (v/v), a densidade ótica do biofilme foi avaliada com leitor de microplaca de ELISA num comprimento de onda de 570 nm. A densidade ótica para os 3 poços foi obtida para cada isolado e a média foi determinada. A cepa *S. aureus* ATCC 6538 foi usada como produtor de biofilme. O meio não inoculado foi utilizado como controle negativo ( $DO_{NC}$ ). A classificação dos isolados capazes de produzir biofilme foi fraco ( $DO_{NC} < DO < 2 \times DO_{NC}$ ), moderado ( $2 \times DO_{NC} < DO < 4 \times DO_{NC}$ ) ou forte produtor de biofilme ( $DO > 4 \times DO_{NC}$ ) (PRENAFETA, 2014; XUE; CHEN; SHANG, 2014; STEPANOVIC, 2007).

#### 4.2.5 Teste de Aderência às células teciduais

Aderência em células HeLa foi realizado como descrito por Nataro *et al.* (1998). As células foram cultivadas em microplacas para cultura de tecidos de 24 poços a qual foram inseridas lamínulas redondas estéreis, antes da inoculação. O meio de crescimento em cada poço da microplaca consistiu de 0,9 ml de meio mínimo essencial de Eagle (MEM) suplementado com soro fetal bovino a 10% e 1% de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina 100.000 UI e 100 µg/mL). A monocamada de células HeLa foi cultivada durante 18 a 24 horas a 37°C com tensão de CO<sub>2</sub> a 5% para se obter, pelo menos, 70% de confluência. As lâminas foram lavadas três vezes com solução estéril de PBS a 0,05 M, pH 7,4. Quarenta microlitros da cultura bacteriana inoculada durante 18 a 24 horas em caldo TSB a 37°C e foi adicionado 0,96 mL de MEM contendo 2% de soro fetal bovino. Após 3 h de incubação a 37°C com tensão de CO<sub>2</sub> a 5%, as monocamadas foram lavadas com PBS estéril e incubada por um período adicional de 3 h. Em seguida, as lâminas foram lavadas cinco vezes com PBS, fixadas com metanol absoluto durante 10 minutos e coradas com May-Grunwald e Giemsa. As lâminas foram examinadas em microscópio ótico, aumento 1000x, em objetiva de imersão.

#### 4.3 RESULTADOS

O perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, fenótipo de virulência, formação de biofilme e teste de aderência em células HeLa das amostras estão apresentados na Tabela 03. Não foram detectadas cepas de *Staphylococcus* coagulase-positiva com resistência à vancomicina. Todos os isolados selecionados foram negativos para a pesquisa de MRSA.

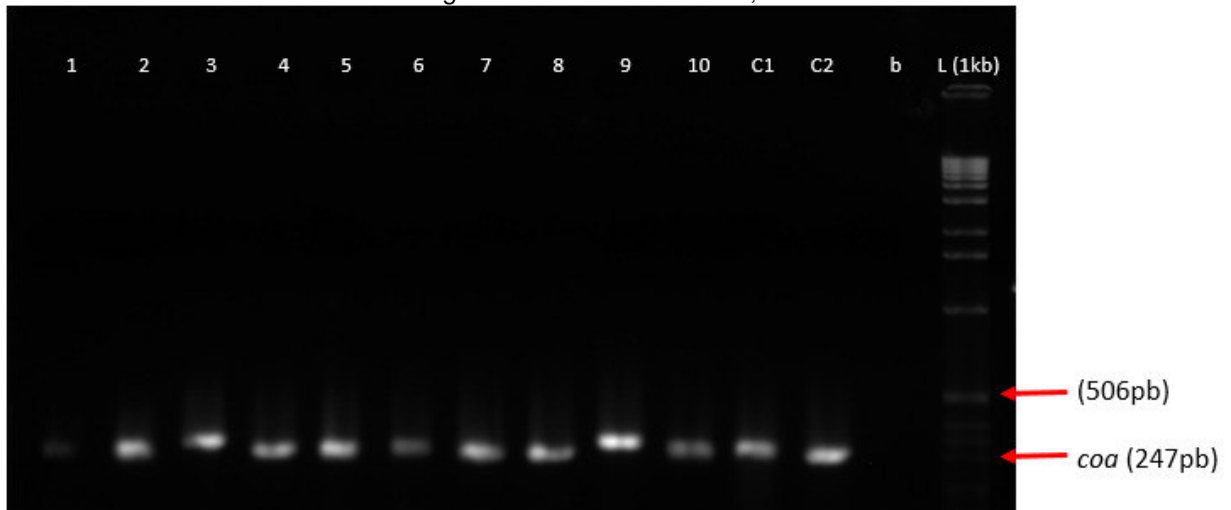
Tabela 03 – Resultado do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, genótipos de virulência, formação de biofilme e aderência em células HeLa de *Staphylococcus coagulase-positiva*.

Nº amostra	Nº cidade	Nº isolado	Nº de antibióticos R / I	Fenótipo de resistência	Genótipo SE	Formação de Biofilme	Aderência células HeLa
<b>Queijo</b>							
5	2	1	0/0	Susceptível	-	Moderado	-
6	2	2	0/0	Susceptível	<i>seg+sei</i>	Moderado	-
19	6	3	2/0	PEN+TET	-	Moderado	Aderência
21	7	4	0/0	Susceptível	-	Moderado	Aderência
22	7	5	1/0	PEN	-	Fraco	Aderência
24	8	6	1/0	PEN	-	Fraco	Aderência
26	8	7	1/1	PEN/TEC	-	Fraco	Aderência
29	9	8	3/1	PEN+SUT+TOB/TET	<i>seg+sen+seu</i>	Moderado	Aderência
<b>Salame</b>							
37	2	9	2/0	PEN+TET	-	Moderado	Aderência
37	2	10	2/0	PEN+TET	-	Moderado	Aderência

Legenda: R – resistente; I – sensibilidade intermediária; SE - enterotoxina estafilocócica; PEN - Penicilina (10U); TET - Tetraciclina (30µg); TEC - Teicoplanina (30µg); SUT -Sulfametoxazol/Trimetoprim (1,25/23,75µg); TOB - Tobramicina (10µg).

Todos os isolados de *Staphylococcus coagulase-positiva* apresentaram o gene de virulência *coa*, conforme apresentado na Figura 06.

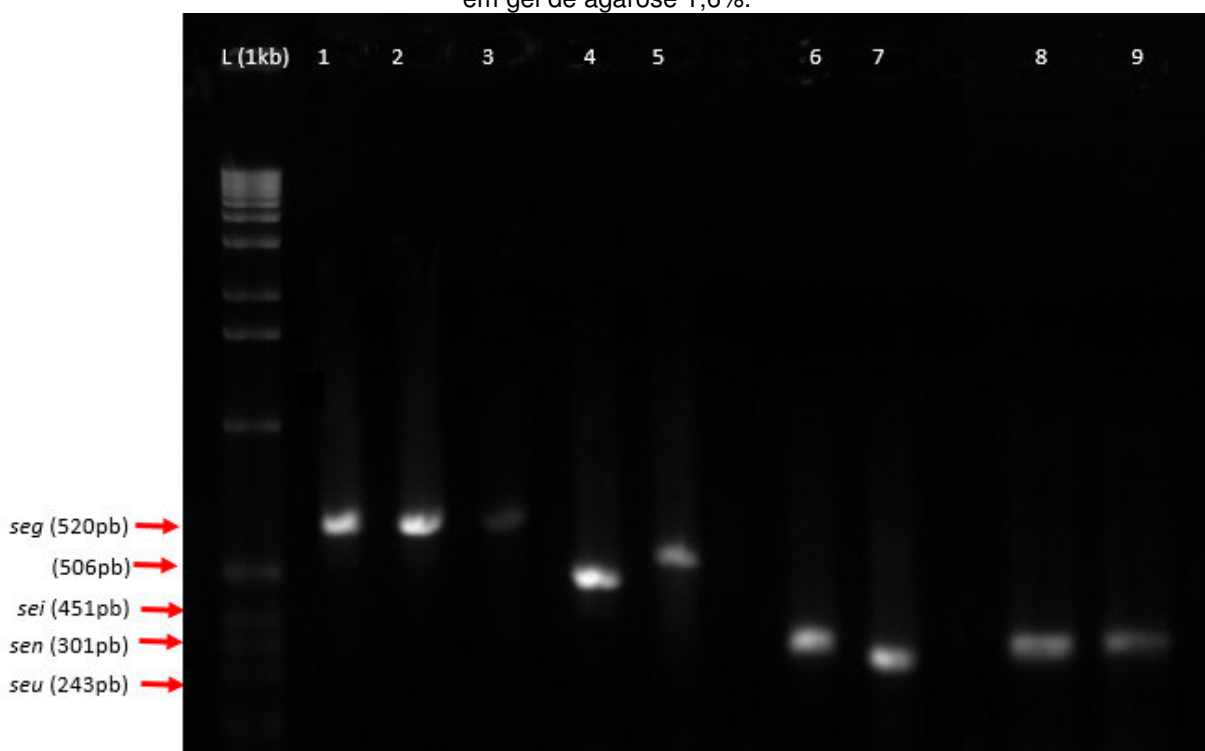
**FIGURA 06:** Gel de agarose 1,6% mostrando a amplificação das amostras para os genes *coa*, utilizando oligonucleotídeos iniciadores, *coa*.



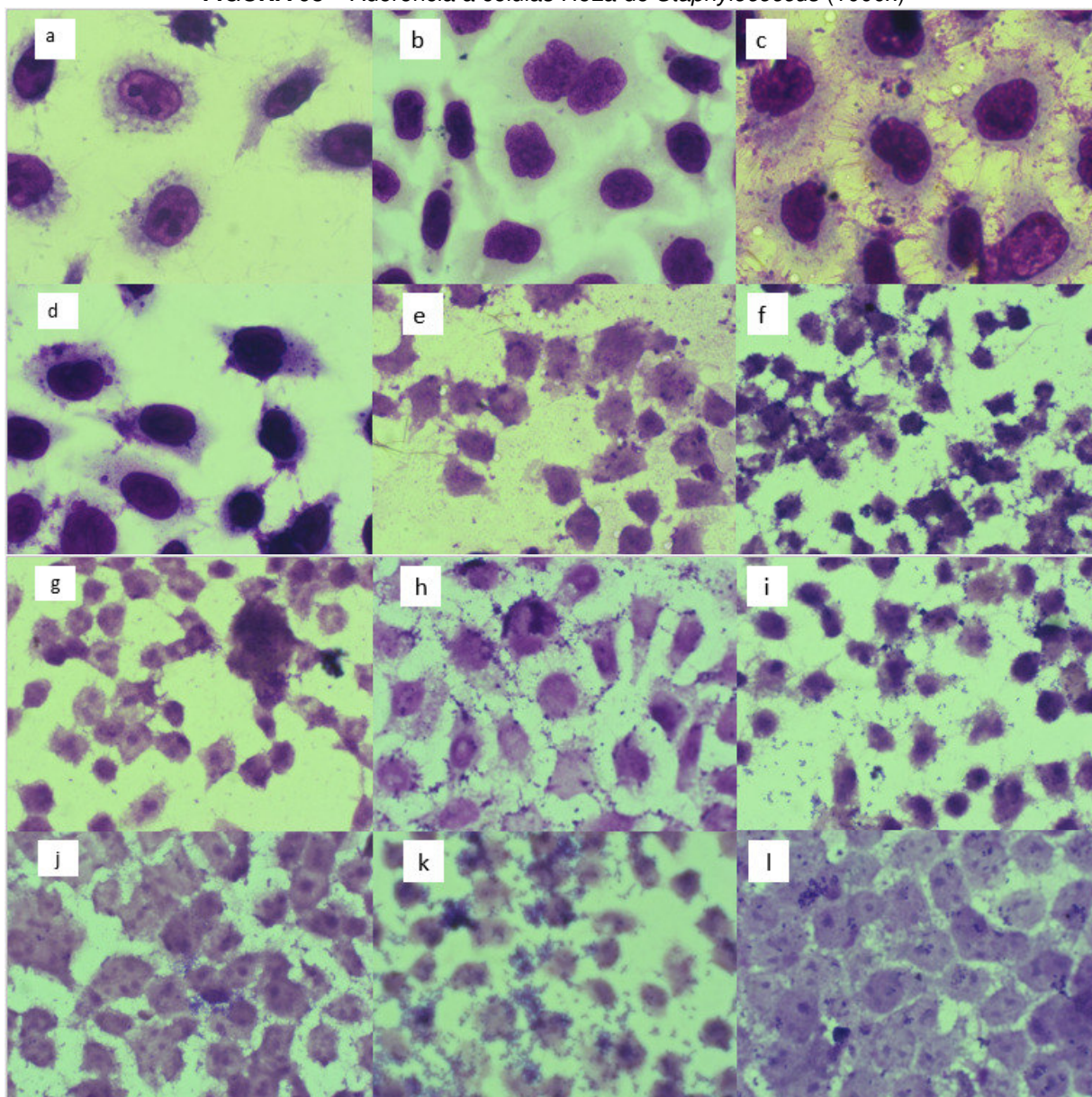
Legenda: isolados 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10; C1 e C2 = *S. aureus* ATCC 6538P e 9144 (controle positivo para o gene *coa*); b = branco da reação de amplificação; L(1kb) = marcador molecular DNA 1kb.

A pesquisa dos genes codificadores de enterotoxinas SEG, SEI, SEN e SEU demonstrou a presença de genes *seg*, *sen* e *seu* para o isolado número 8, e *seg* e *sei* para o isolado número 2, conforme apresentado na Figura 07.

**FIGURA 07:** Produtos de amplificação de diferentes genes de enterotoxinas analisadas por eletroforese em gel de agarose 1,6%.



Legenda: L (1kb) = marcador molecular DNA 1kb; 1 = *seg*, isolado 8; 2 = *seg*, isolado 2; 3 = *seg*, *S. aureus* ATCC 9801; 4 = *sei*, isolado 2; 5 = *sei*, *S. aureus* ATCC 9801; 6 = *sen*, isolado 8; 7 = *sen*, *S. aureus* ATCC 9801; 8 = *seu*, isolado 8; 9 = *seu*, *S. aureus* ATCC 9801.

**FIGURA 08 – Aderência à células HeLa de *Staphylococcus* (1000x)**

Legenda: (a) = *S. aureus* ATCC 6538; (b) = *S. aureus* ATCC 25923; (c) = *S. epidermidis* ATCC 35984; (d) = amostra 5; (e) = amostra 6; (f) = amostra 19; (g) = amostra 21; (h) = amostra 22; (i) = amostra 24; (j) = amostra 26; (k) = amostra 29; (l) = amostra 37.

#### 4.4 DISCUSSÃO

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) estima que 240.000 casos de intoxicação alimentar estafilocócica ocorrem todos os anos nos Estados Unidos (OMOE *et al.*, 2013; JOHLER *et al.* 2015; SUZUKI *et al.*, 2015). No presente estudo foram identificados 28,1% (9/32) de amostras de queijos e 23,1% (3/13) de amostras de salames coletadas em dez capitais brasileiras, impróprios para consumo humano por conterem *Staphylococcus* coagulase positiva acima da permitida na legislação vigente (BRASIL, 2001). Na Suíça, 63,6% (7/11) dos surtos alimentares de SFP ocorridos entre 1996 e 2006 foram associados ao consumo de queijo (HUMMERJOHANN *et al.*, 2014).

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos obtido no presente estudo podem sugerir a origem dos *Staphylococcus* coagulase positiva a partir do leite. Pois, o tratamento da mastite bovina é geralmente realizada com antimicrobianos, e que o aumento da administração destes no controle e tratamento de vacas leiteiras podem ser uma das principais causas de resistência a antimicrobianos (JAMALI, RADMEHR e ISMAIL, 2014). No presente trabalho, foi observada resistência à penicilina em 62,5% (5/8) das amostras de queijo e resistência à tetraciclina em 25,0% (2/8). Shi *et al.* (2010), Gao *et al.* (2012) e Rola *et al.* (2015) atribuíram a alta resistência à penicilina G e tetraciclina ao uso destes no tratamento de mastite bovina. Jagielski *et al.* (2014) reportaram que o percentual de resistência à penicilina entre os isolados de *S. aureus* varia nos diferentes países, sendo de 87% na China, 62% na Turquia, 61% na Estônia, 40% na Argentina, 30% na França, 30% na Hungria. Em contraste, na Alemanha, Estados Unidos e Noruega, a prevalência de *S. aureus* penicilina resistente foi baixo, 17, 10 e 6% respectivamente. Guimarães *et al.* (2012) não observaram resistência tetraciclina nos isolados do queijo coalho comercializados na orla de Salvador (BA).

Neste estudo, observou-se multirresistência aos antimicrobianos penicilina, sulfametoxazol/trimetoprim, tobramicina e tetraciclina no isolado proveniente da amostra 29. Na Polônia está havendo um decréscimo no percentual de resistência à penicilina onde, por muito anos esteve em 70%, e recentemente Szweda *et al.* (2014) reportaram 24%, no entanto há uma preocupação devido ao isolamento de linhagens MDR.

Apesar da resistência a oxacilina não ter sido observada no presente estudo, Oliveira *et al.* (2012) reportaram que MRSA tem sido isolado de amostras de leite nos Estados Unidos. Recentes relatórios sobre antimicrobianos importantes para a terapia humana tem mostrado a presença de linhagens resistentes em alimentos de origem animal, tais como MRSA (LEE *et al.*, 2013). Esta representa uma causa bastante significativa de infecções hospitalares em muitas partes do mundo. (JAMALI, RADMEHR e ISMAIL, 2014).

Enterotoxinas secretadas durante infecções intramamárias causadas por *S. aureus* permanecem estáveis no leite causando intoxicação alimentar estafilocócica (MARTINS *et al.*, 2015). Diversos subtipos de *Staphylococcus* coagulase positiva com diferentes propriedades patogênicas e epidemiológicas tem sido encontrados no queijo suíço feito com leite cru, onde destes subtipos, linhagens associadas à mastite são mais frequentemente encontradas (HUMMERJOHANN *et al.*, 2014). No presente estudo foram detectados genes produtores de enterotoxinas considerados novos, *seg*, *sei*, *sen* e *seu*, no entanto genes clássicos, *sea* a *see*, não foram detectados. Hummerjohann *et al.* (2014) obtiveram 75,6% (58/78) das amostras de queijos contaminados com *Staphylococcus* coagulase positiva contendo genes clássicos de SE *sea* a *see*, e 7 isolados que continham exclusivamente novos SE genes: *seg*, *seh*, *sei*, *sej*, *ser* e *sep*. Linhagens associadas à mastite carregam genes SE *seb*, *sed*, *sej*, *ser* e metade destes *sea* também, e estes podem estar associados à produção de toxinas em queijos e surtos de intoxicação alimentar (HUMMERJOHANN *et al.*, 2014). Mello *et al.* (2014) avaliaram as condições sanitárias de serviços de alimentação e encontraram o gene *seb* como o mais comum, no entanto apresentou-se mais prevalente em *Staphylococcus* coagulase negativa (70,8%) do que em coagulase positiva (29,2%). Rall *et al.* (2010) demonstraram que os manipuladores de alimentos também representam um importante fator de qualidade dos alimentos onde 95% (19/20) das amostras de *Staphylococcus* coagulase positiva foram positivas para um ou mais genes. Este autores avaliaram também a presença dos genes em *Staphylococcus* coagulase negativa e o gene mais comumente isolado foi *sea*. Os marcadores de SEs mais comumente detectados por Rola *et al.* (2015) foram *sed*, *sej* e *ser*, e não encontraram genes *seb* e *see* em amostra de leite bovino.

Estafilo-coagulase (SC), uma proteína extracelular de *S. aureus*, codificada pelo gene *coa*, é um fator de virulência que causa plasma coagulação e é o maior determinante fenotípico de *S. aureus* (WAN *et al.*, 2012; NAGARAJ *et al.*, 2013). No presente estudo, todos os isolados coagulase positiva em tubo apresentaram o gene *coa*.

A qualidade microbiológica do leite deve ter especial atenção, visto que é a principal origem de micro-organismos que formam biofilme sobre os utensílios e direcionam seu uso seguro (GALINARI *et al.*, 2014). Neste trabalho todos os isolados apresentaram capacidade de formação de biofilme, variando de fraco a moderado produtor. Superfícies de materiais comumente utilizados no processamento de alimentos, como aço inoxidável, tornam-se potenciais fontes de contaminação que podem levar à deterioração de alimentos, transmissão de doenças, danos a equipamentos e comprometer a sanitização de superfícies de alimentos e ambientes pelo espalhamento de micro-organismos para outras áreas de processamento (CABEÇA *et al.*, 2012).

*S. aureus* são capazes de aderir a células HeLa com grau variado (MERGHNI *et al.*, 2014). No presente estudo, 80% (8/10) dos isolados apresentaram um certo grau de aderência a células HeLa.

#### 4.5 CONCLUSÃO

Os resultados indicam presença de *Staphylococcus* coagulase positiva enterotoxigênicos, multirresistentes, com capacidade de formação de biofilme e de se aderir em células teciduais humanas, em alimentos prontos para consumo, artesanalmente produzidos, como queijos e salames, podendo trazer risco à saúde do consumidor.

## **Agradecimentos**

À empresa Laborclin, que através do programa PLTIP (Programa Laborclin de Treinamento e Incentivo à Pesquisa) realizou a doação dos meios de cultura e reagentes utilizados. Ao Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Paraná, Labmicro por ter permitido a realização da pesquisa. Ao Laboratório de Neurobiologia da Universidade Federal do Paraná, por ter doado células HeLa para a realização da pesquisa. À Prof. Dra. Juliana de Moura da Universidade Federal do Paraná, por ter orientado na realização da pesquisa com células HeLa. Ao Prof. Dr. Nelson Nakazato da Universidade Estadual de Londrina, por ter doado linhagens de *E. coli* para realização da pesquisa com oligonucleotídeos iniciadores específicos e com células HeLa.

## **Contribuição dos autores**

Elisa H. U. Yamanaka e Mariana V. Porsani tiveram contribuição substancial na concepção, aquisição e análise dos dados. Laura L. Cogo, Patrícia R. Dalzoto e Ida C. Pimentel revisaram criticamente o conteúdo.

## **Conflito de interesse**

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

## REFERÊNCIAS

- ALIBAYOV, B.; ZDENKOVA, K.; SYKOROVA, H.; DEMNEROVA, K. Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands (SaPI) and their superantigens combination of food samples. **Journal of Microbiological Methods**, v. 107, p. 197–204, 2014.
- ARGUDÍN, M.Á.; MENDOZA, M.C.; RODICIO, M.R. Food poisoning and *Staphylococcus aureus* enterotoxins. **Toxins**, v. 2, n.7, p. 1751-1773, 2010.
- BRASIL, Ministério da Saúde. ANVISA. RDC 12. **Regulamento Técnico Sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**. 02 de janeiro de 2001.
- CABEÇA, T.K.; PIZZOLITTO, A.C.; PIZZOLITTO, E.L. Activity of disinfectants against foodborne pathogens in suspension and adhered to stainless steel surfaces. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 3, p.1112-1119, 2012.
- CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 25th Informational Supplement M100-S25, Wayne, PA, 2015.
- COSTA, L.B.; RAJALA-SCHULTZ, P.J.; HOET, A. SEO, K.S.; FOGT, K.; MOON, B.S. Genetic relatedness and virulence factors of bovine *Staphylococcus aureus* isolated from teat skin and milk. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 11, p. 6907–6916, 2014.
- GAO, J.; FERRERI, M.; YU, F.; LIU, X.; CHEN, L.; SU, J.; HAN, B. Molecular types and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in a single herd in China. **Veterinary Journal**, v. 192, p. 550-552, 2012.
- GUIMARÃES, A.G.; CARDOSO, R.C.V.; AZEVÊDO, P.F.; MENESES, R.B. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de queijos coalho. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 2, p. 259-265, 2012.
- GUIMARÃES, F.F.; NÓBREGA, D.B.; RICHINI-PEREIRA, V.B.; MARSON, P.M.; PANTOJA, J.C.F.; LANGONI, H. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 5, p.2866–2872, 2013.
- HENNEKINNE, J.A.; OSTYN, A.; GUILLIER, F.; HERBIN, S.; PRUFER, A.L.; DRAGACCI, S. How Should Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks Be Characterized? **Toxins**, v. 2, n. 8, p. 2106–2116, 2010.
- HUMMERJOHANN, J.; NASKOVA, J; BAUMGARTNER, A; GRABER, H.U. Enterotoxin-producing *Staphylococcus aureus* genotype B as a major contaminant in Swiss raw milk cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 3, p. 1305–1312, 2014.

JAGIELSKI, T.; PUACZ, E.; LISOWSKI, A.; SIEDLECKI, P.; DUDZIAK, W.; MIĘDZOBRODZKI, J.; KRUKOWSKI, H. Antimicrobial susceptibility profiling and genotyping of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Poland. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 10, p. 6122–6128, 2014.

JAMALI, H.; RADMEHR, B.; ISMAIL, S. Prevalence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 4, p.2226–2230, 2014.

JOHLER, S.; GIANNINI, P.; JERMINI, M.; HUMMERJOHANN, J.; BAUMGARTNER, A.; STEPHAN, R. Further Evidence for Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks Caused by egc-Encoded Enterotoxins. **Toxins**, v. 7, n. 3, p 997–1004, 2015.

KRAKAUER T.; STILES, B.G. The staphylococcal enterotoxin (SE) family – SEB and siblings. **Virulence**, v.4, n. 8, p. 759-773, 2013.

LEE, C.R.; CHO, I. H.; JEONG, B. C.; LEE, S. H. Strategies to Minimize Antibiotic Resistance. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 9, p. 4274–4305, 2013.

MARTINS, K. B.; FACCIOLI-MARTINS, P.Y., RIBOLI, D.M.R.; PEREIRA, V.C.; FERNANDES, S.; OLIVEIRA, A.A.; DANTAS, A.; ZAFALON, L.F.; CUNHA, M.L.R.S. Clonal profile, virulence and resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from sheep milk. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 2, p.535-543, 2015.

MELLO, J.F.; ROCHA, L.B.; LOPES, E.S.; FRAZZON, J. COSTA, M. Sanitary quality, occurrence and identification of *Staphylococcus* sp: in food services. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.45, n.3, p.1031-1037, 2014.

MERGHNI, A.; NEJMA, M.B.; HENTATI, H.; MAHJOUB, A.; MASTOURI, M. Adhesive properties and extracellular enzymatic activity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from oral cavity. **Microbial Pathogenesis**, v. 73, p. 7-12, 2014.

MERGHNI, A.; NEJMA, M.B.; HELALI, I.; HENTATI, H.; BONGIOVANNI, A.; LAFONT, F.; MAHJOUB, A.; MASTOURI, M. Assessment of adhesion, invasion and cytotoxicity potential of oral *Staphylococcus aureus* strains. **Microbial Pathogenesis**, v. 86, p. 1-9, 2015.

NAGARAJ, S.; RAMLAL, S.; SRIPATHY, M.H.; BATRA, H.V. Development and evaluation of a novel combinatorial selective enrichment and multiplex PCR technique for molecular detection of major virulence-associated genes of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in food samples. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 2, p.435-446, 2014.

OLIVEIRA, L.; LANGONI, H.; HULLAND, C.; RUEGG, P.L. Minimum inhibitory concentrations of *Staphylococcus aureus* recovered from clinical and subclinical cases of bovine mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 95, p. 1913–1920, 2012.

OMOE, K.; HU, D.L.; ONO, H.K.; SHIMIZU, S.; TAKAHASHI-OMOE, H.; NAKANE, A.; UCHIYAMA, T.; SHINAGAWA, K.; OMANISHI, K. Emetic potentials of newly identified staphylococcal enterotoxin-like toxins. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 10, p. 3627-3631, 2013.

ORTEGA, E.; ABRIOUEL, H.; LUCAS, L.; GÁLVEZ, A. Multiple Roles of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins: Pathogenicity, Superantigenic Activity, and Correlation to Antibiotic Resistance. **Toxins**, v. 2, p. 2117-2131, 2010.

OTTO, M. Staphylococcal Biofilms. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 322, p. 207–228, 2008.

PINHO, M. G.; FILIPE, S. R.; DE LENCASTRE, H.; TOMASZ, A. Complementation of the Essential Peptidoglycan Transpeptidase Function of Penicillin-Binding Protein 2 (PBP2) by the Drug Resistance Protein PBP2A in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 22, p. 6525–6531, 2001.

PLOTKIN, B.J.; SIGAR, I.M.; TIWARI, V.; HALKYARD, S. Herpes Simplex Virus (HSV) Modulation of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* Initiation of HeLa 299 Cell-Associated Biofilm. **Current Microbiology**, p. 1-9, First online: 13 January 2016.

RALL, V.L.M.; SFORCIN, J.M.; AUGUSTINI, V.C.M.; WATANABE, M.T.; FERNANDES JR., A.; RALL, R.; SILVA, M.G.; ARAÚJO JR., J.P. Detection of enterotoxin genes of *Staphylococcus* sp isolated from nasal cavities and hands of food handlers. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 1, p.59-65, 2010.

ROLA, J.G.; KORPYSA-DZIRBA, W.; CZUBKOWSKA, A.; OSEK, J. Prevalence of enterotoxin genes and antimicrobial resistance of coagulase-positive staphylococci recovered from raw cow milk. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 7, p. 4273–4278, 2015.

SUZUKI, Y.; KOBAYASHI, M.; MATSUSHITA, S.; UEHARA, S.; KATO, R.; SATO'O, Y.; ONO, H. K.; SADAMASU, K.; KAI, A.; KAMATA, Y. Detection of the staphylococcal enterotoxin D-like gene from staphylococcal food poisoning isolates over the last two decades in Tokyo. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 77, n. 8, p. 905–911, 2015.

VERRAES, C.; BOXSTAEL, S.V.; MEERYENNE, E.V.; COILLE, E.V.; BUTAYE, P.; CATRY, B.; SCHAETZEN, M.A.; HUFFEL, X.V.; IMBERECHTS, H.; DIERICK, K. DAUBE, G.; SAEGERMAN, C. DE BLOCK, J.; DEWULF, J. HERMAN, L. Antimicrobial Resistance in the Food Chain: A Review. **International Journal of Environmental Research Public Health**, v. 10, p. 2643-2669, 2013.

VICENTE, V. A.; ATTILI-ANGELIS, D.; PIE, M. R.; QUEIROZ-TELLES, F.; CRUZ, L. M.; NAJAFZADEH, M. J.; de HOOG, G.S.; ZHAO, J.; PIZZIRANI-KLEINER, A. Environmental isolation of black yeast-like fungi involved in human infection. **Studies in Mycology**, v. 61, p. 137–144, 2008.

XUE, T.; CHEN, X.; SHANG, F. Effects of lactose and milk on the expression of biofilm-associated genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from a dairy cow with mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 10, p. 6129–6134, 2014.

WAN, M.T.; FU, S.Y.; LO, Y.P.; HUANG, T.M.; CHENG, M.M.; CHOU, C.C. Heterogeneity and phylogenetic relationships of community-associated methicillin-sensitive/resistant *Staphylococcus aureus* isolates in healthy dogs, cats and their owners. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, p. 205–213, 2012.

YAMANAKA, E.H.U.; COGO, L.L.; DALZOTO, P.; PIMENTEL, I.C. Microbial quality of Brazilian artisanal cheese and fermented sausages. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, 2016 (In Press).

ZANARDI, G.; CAMINITI, A.; DELLE DONNE, G.; MORONI, P.; SANTI, A.; GALLETI, G.; TAMBA, M.; BOLZONI, G.; BERTOCHI, L. Comparing real-time PCR and bacteriological cultures for *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* in bulk-tank milk samples. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 9, p. 5592–5598, 2014.

## 5 CONCLUSÕES GERAIS

- Salames e queijos com alto teor de umidade produzidos artesanalmente em regiões metropolitanas das capitais brasileiras apresentaram coliformes totais, *E. coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva em valores acima dos tolerados pela legislação brasileira, bem como patógenos *Listeria* spp. e *Salmonella* spp. representando um risco potencial para a saúde dos consumidores.
- *E. coli* isoladas de salames e queijos com alto teor de umidade produzidos artesanalmente em regiões metropolitanas das capitais brasileiras não carregam genes diarreiogênicos, no entanto o perfil de susceptibilidade das amostras podem representar um risco à saúde de seus consumidores por indicarem a contaminação fecal e disseminação de resistência a antimicrobianos, bem como a capacidade de formação de biofilme e de aderência em células HeLa.
- Foram isolados *Staphylococcus* coagulase positiva enterotoxigênicos, multirresistentes, com capacidade de formação de biofilme e de se aderir em células teciduais humanas, em alimentos prontos para consumo, artesanalmente produzidos, como queijos e salames, podendo trazer risco à saúde do consumidor.
- Salames e queijos produzidos artesanalmente em regiões metropolitanas de capitais brasileiras trazem potencial risco patogênico, veiculando patógenos com *Salmonella* spp e *Listeria* spp, bem como *E. coli* e *Staphylococcus* coagulase positiva desempenhando não somente papel de indicador de contaminação microbiana, como também apresentando resistência a antimicrobianos e/ou fatores de virulência.

## APENDICE 1

TABELA 04 - Populações de *E. coli*, *Staphylococcus* coagulase-positiva, *Salmonella* spp. e *Listeria* spp. de amostras de queijos e salames artesanais adquiridos comercialmente em área metropolitana de dez cidades brasileiras, e potencial risco patogênico

Continua

Nº amostra	Nº cidade	Identificação	(log·UFC·g <sup>-1</sup> ) ou P/A	Nº isolado	Nº de antibióticos R/I	Fenótipo de resistência	Fenótipo de virulência	Genótipo de virulência	Formação de Biofilme	Padrão de aderência	Potencial risco patogênico
<b>Queijos</b>											
2	1	<i>E. coli</i>	6,30	1	0/0	Susceptível	-	-	Moderado	AL	P1
2	1	<i>Listeria</i> spp.	Presença	-	-	-	-	-	-	-	-
3	1	<i>E. coli</i>	6,08	2	0/0	Susceptível	-	-	Moderado	-	P0
4	2	<i>E. coli</i>	2,48	3	2/0	SUT+AMP	-	-	Moderado	-	P2
5	2	<i>E. coli</i>	5,69	4	0/0	Susceptível	-	-	Moderado	-	P3
5	2	SCP	5,59	SA1	0/0	Susceptível	-	-	Moderado	-	-
6	2	<i>E. coli</i>	3,85	5	1/0	SUT	-	-	Moderado	-	P4
6	2	<i>E. coli</i>	3,85	6	1/0	SUT	-	-	Moderado	-	-
6	2	<i>E. coli</i>	3,85	7	1/1	SUT/CFL	EPEC B	-	Moderado	AD	-
6	2	SCP	3,95	SA2	0/0	Susceptível	-	<i>seg+sei</i>	Moderado	-	-
11	4	<i>E. coli</i>	4,00	8	0/0	Susceptível	-	-	Moderado	-	P0
11	4	<i>E. coli</i>	4,00	9	0/0	Susceptível	-	-	Moderado	-	-
11	4	<i>E. coli</i>	4,00	10	0/0	Susceptível	-	-	Moderado	AL	-
13	4	SCP	6,58	-	-	-	-	-	-	-	P3
17	5	SCP	5,31	-	-	-	-	-	-	-	P3
18	6	<i>E. coli</i>	3,78	11	2/1	AMC+AMP/CFL	-	-	Moderado	-	P2
18	6	<i>E. coli</i>	3,78	12	1/0	AMP	-	-	Moderado	AD	-
18	6	<i>E. coli</i>	3,78	13	0/1	CFL	-	-	Moderado	-	-





**LEGENDA:** R – resistente; I – sensibilidade intermediária; SUT - Sulfametoxazol/Trimetoprim (1,25/23,75µg); AMP - Ampicilina (10µg); CFL - Cefalotina (30µg); AMC - Amoxicilina/Ácido Clavulânico (20/10µg); CRX - Cefuroxima 30µg; PEN - Penicilina (10U); TET - Tetraciclina (30µg); TEC - Teicoplanina (30µg); TOB - Tobramicina (10µg); EPEC B – *E. coli* enteropatogênica clássica sorotipo B; EPEC C – *E. coli* enteropatogênica clássica sorotipo C; EIEC A – *E. coli* enteroinvasora sorotipo A; AD – aderência difusa; AA – aderência agregativa; AL – aderência localizada; P/A – Presença; UFC – Unidades Formadoras de Colônias; P0 - Presença de indicadores de contaminação, sem potencial risco patogênico; P1 - Presença de *Listeria* spp.; P2 - Fenótipo de resistência; P3 – *Staphylococcus* coagulase positiva em contagem superior a  $5 \log \cdot \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ ; P4 - Fenótipo de resistência+Fenótipo de virulência+Genótipo de virulência; P5 - Fenótipo de resistência+Fenótipo de virulência+ *Staphylococcus* coagulase positiva em contagem superior a  $5 \log \cdot \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ ; P6 - Presença de *Salmonella* spp.+ *Staphylococcus* coagulase positiva em contagem superior a  $5 \log \cdot \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ ; P7 - Presença de *Salmonella* spp.+Fenótipo de resistência; P8 - Fenótipo de resistência+Genótipo de virulência; P9 - Fenótipo de resistência+Fenótipo de virulência; P10 - Fenótipo de resistência+ *Staphylococcus* coagulase positiva em contagem superior a  $5 \log \cdot \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ +Presença de *Listeria* spp.+Presença de *Salmonella* spp.