

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS, AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA AGROPECUÁRIA**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE LEITE PASTEURIZADO
COM INSPEÇÃO ESTADUAL PELA PESQUISA DE
ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA, RESISTÊNCIA
ANTIMICROBIANA E FORMAÇÃO DE BIOFILME**

Jana Kelly dos Santos

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
2017**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE LEITE PASTEURIZADO COM
INSPEÇÃO ESTADUAL PELA PESQUISA DE ESTAFILOCOCOS
COAGULASE POSITIVA, RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E
FORMAÇÃO DE BIOFILME**

Jana Kelly Dos Santos
Médica Veterinária
Universidade Federal de Alagoas, 2011

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós- Graduação Profissional em Defesa Agropecuária, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Defesa Agropecuária.

Orientadora: Profa. Dra. Ludmilla Santana Barros e Soares
Coorientadora: Profa. Dra. Elizabeth Sampaio de Medeiros

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
2017**

FICHA CATALOGRÁFICA

S2373a	<p>Santos, Jana Kelly dos. Avaliação da qualidade de leite pasteurizado com inspeção estadual pela pesquisa de estafilococos coagulase positiva, resistência antimicrobiana e formação de biofilme / Jane Kelly dos Santos._ Cruz das Almas, BA, 2017. 37f.; il.</p> <p>Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Ludmilla Santana Borros e Soares. Co-Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Elizabeth Sampaio de Medeiros</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrária, Ambientais e Biológicas, Mestrado em Defesa Agropecuária.</p> <p>1.Leite. 2. Leite – Contaminação 3. Cadeia Produtiva do Leite. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrária, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 637.1</p>
--------	--

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE MESTRADO PROFISSIONAL EM DEFESA AGROPECUÁRIA**

**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE LEITE PASTEURIZADO COM
INSPEÇÃO ESTADUAL PELA PESQUISA DE ESTAFILOCOCOS
COAGULASE POSITIVA, RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E
FORMAÇÃO DE BIOFILME**

Comissão Examinadora de Defesa de Dissertação de
Jana Kelly dos Santos

Aprovada em 27 de setembro de 2017.

Profª Dra. Ludmilla Santana Barros e Soares
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Orientadora

Profª Dra. Tatiana Pacheco Rodrigues
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Examinador Interno

Profª Dra. Isabella de Matos Mendes da Silva
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Examinador Externo

DEDICATÓRIA

À minha vó, pelo grande exemplo de vida em minha vida profissional e pessoal.

In memoriam

AGRADECIMENTOS

A Deus pela força e sabedoria sempre dado.

A minha amada mãe Helena pelo amor incondicional em todos os momentos.

Ao meu marido Artur pelo companheirismo e apoio nesse projeto.

A minha filha que incentiva a mamãe a sempre buscar o melhor.

A minha orientadora Prof^a Ludmilla Santana, pelos ensinamentos desde o início do mestrado, por ter sido compreensiva e incentivadora.

A minha coorientadora Prof^a Elizabeth Medeiros, que com muita paciência colaborou para que esse projeto fosse concluído.

À Prof^a Isabella Mendes e à Prof^a Tatiana Pacheco pela colaboração para versão final da dissertação.

Aos meus amigos da turma, que fizeram com que as dificuldades fossem superadas de maneira mais fácil, obrigada pelo apoio e amizade, em especial a Andrine, a minha procuradora.

Às orientadas da Prof^a Elizabeth, Thayná, Karla, Jessica, Fernanda, que me ajudaram no laboratório para que as análises fossem concluídas.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram de alguma forma.

EPÍGRAFE

Se não houver frutos, valeu a beleza das flores; se não houver flores, valeu a sombra das folhas; se não houver folhas, valeu a intenção da semente.

Henfil

AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE LEITE PASTEURIZADO COM INSPEÇÃO ESTADUAL PELA PESQUISA DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA, RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA E FORMAÇÃO DE BIOFILME

RESUMO: O leite é uma fonte alternativa de proteínas acessíveis à população de baixa renda, que geralmente é carente em proteína de origem animal, comprovando a importância socioeconômica deste alimento. Em saúde pública, em particular na área de vigilância sanitária de alimentos, o *Staphylococcus aureus*, o principal dos estafilococos coagulase positiva, é considerado um dos mais frequentes causadores de surtos de doenças transmitidas por alimentos. O leite e derivados estão entre os alimentos mais envolvidos nos surtos identificados e estudados. Objetivou-se com este estudo avaliar a qualidade de leite pasteurizado com inspeção estadual pela pesquisa de estafilococos coagulase positiva, sua resistência antimicrobiana e a capacidade de formar biofilme. O estudo foi realizado em Alagoas e foram colhidos 75L de leite pasteurizado, de cinco usinas de beneficiamento e de três lotes diferentes, nos municípios Maceió, Coruripe, Capela, Chã Preta e Quebrangulo. Realizou-se a pesquisa de estafilococos coagulase positiva (ECP) utilizando o meio Agar Baird-Parker, plasma de coelho e caldo infusão de cérebro-coração. Os ECP foram submetidos ao antibiograma por meio da inoculação em Caldo Müller Hinton e aplicados os discos com as drogas: gentamicina (5µg), amoxicilina (10mcg), polimixina (300mg), eritromicina (10µg), penicilina (10µg), ampicilina (10µg), tetraciclina (30µg), sulfazotrim (25µg) e cefalexina (30µg). Realizou-se também a caracterização fenotípica dos ECP pelo método de aderência em placa de ELISA para formação de biofilme. Das 75 amostras, foram identificadas 4(5,3%) amostras com ECP. A contagem variou de $1,2 \times 10^4$ a $2,6 \times 10^5$ UFC/mL⁻¹. Os ECP isolados apresentaram 100% sensibilidade a todos os antimicrobianos testados e nenhum foi formador de biofilme. A qualidade do leite pasteurizado com inspeção estadual do estudo com relação à presença de estafilococos coagulase positiva está inadequada para o consumo. A sensibilidade dos ECP a todos antimicrobianos e a não formação de biofilme diminui o risco que esses microrganismos poderiam ocasionar à saúde pública.

Palavras Chave: Alimento; Doença, Microrganismo

QUALITY EVALUATION OF PASTEURIZED MILK WITH STATE INSPECTION BY STAPHYLOCOCCUS POSITIVE COAGULASE, ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND BIOFILM

ABSTRACT: Milk is an alternative source of proteins accessible to the low income population, which is generally lacking in animal protein, proving the socioeconomic importance of this food. In public health, particularly in the area of sanitary food surveillance, *Staphylococcus aureus*, the main staphylococci of positive coagulase, is considered one of the most frequent cause of outbreaks of foodborne diseases. Milk and milk products are among the foods most involved in the outbreaks identified and studied. The objective of this study was to evaluate the quality of pasteurized milk with state inspection by the positive coagulase staphylococci, its antimicrobial resistance and the ability to form biofilm. The study was carried out in Alagoas and 75L of pasteurized milk were collected from five processing plants and three different lots in the municipalities of Maceió, Coruripe, Capela, Chã Preta and Quebrangulo. Positive coagulase staphylococci (PCS) was performed using Baird-Parker Agar medium, rabbit plasma and brain-heart infusion broth. The PCS were submitted to the antibiogram by means of inoculation in Müller Hinton broth and the discs were applied with the drugs: gentamicin (5µg), amoxicillin (10mcg), polymyxin (300mg), erythromycin (10µg), penicillin (10µg), ampicillin (10µg), tetracycline (30µg), sulfazotrim (25µg) and cephalexin (30µg). The phenotypic characterization of PCS was also performed by the ELISA plate adhesion method for biofilm formation. Of the 75 samples, 4 (5.3%) samples were identified with PCS. The count ranged from $1,2 \times 10^4$ a $2,6 \times 10^5$ CFU/mL⁻¹. Isolated PCS showed 100% sensitivity to all antimicrobials tested and none were biofilm forming. The quality of pasteurized milk with state inspection of the study in relation to the presence of coagulase positive staphylococci is inadequate for consumption. The sensitivity of PCS to all antimicrobials and non-biofilm formation reduces the risk that these microorganisms could cause to public health.

Keywords: Disease; Food; Microorganism

LISTA DE ABREVIATURAS

BHI – (Brain Heart Infusion)

ECP – Estafilococos coagulase positiva

ELISA – (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

IN – Instrução Normativa

ISO - International Organization for Standardization

MH - Müller Hinton

OD – Densidade óptica

OIE – Organização Mundial de Saúde Animal

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – Tampão fosfato com salina

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

TSB – Caldo Tripticase Soja

UFC – Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	16
2.1. OBJETIVO GERAL.....	16
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3. ESTADO DA ARTE.....	17
3.1. LEITE.....	17
3.2. ESTAFILOCOCCOS COAGULASE POSITIVA.....	17
3.3. RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA.....	19
3.4. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA PARA FORMAÇÃO DE BIOFILME.....	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	22
ARTIGO 1	26

1. INTRODUÇÃO

A produção de leite cru em 2016 foi de 33.624.653.000 litros no Brasil e 337.974.000 litros em Alagoas (IBGE, 2017).

Em 2011 o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento publicou a Instrução Normativa (IN) 62 que aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado para atualizar a IN 51, publicada em 2002, e continuar o programa de melhoria da qualidade do leite no país (BRASIL, 2011).

O leite é uma fonte alternativa de proteínas acessíveis à população de baixa renda, que geralmente é carente em proteína de origem animal, comprovando a importância socioeconômica deste alimento (BORTOLI et al., 2005).

O processo da pasteurização reduz, significativamente, as contagens de microrganismos do leite, sendo imprescindível para o produto destinado ao consumo, pois garante a qualidade do mesmo e a saúde do consumidor (MATA, 2012).

No entanto, diversos estudos demonstram que o leite pasteurizado pode se apresentar em desacordo com os padrões exigidos pela legislação vigente comprometendo a qualidade e colocando em risco a saúde do consumidor (SILVA et al., 2008, NASCENTES e ARAÚJO, 2012; OLIVEIRA e SANTOS, 2012).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são habitantes usuais da pele, das membranas mucosas, do trato respiratório superior e do intestino do homem, destacando-se entre elas *S. aureus*, o de maior patogenicidade, responsável por considerável proporção de infecções humanas, notadamente no âmbito hospitalar (GERMANO; GERMANO, 2008; VELAZQUEZ-GUADARRAMA et al., 2013).

Em saúde pública, em particular na área de vigilância sanitária de alimentos, *S. aureus* é considerado um dos mais frequentes causadores de surtos de doenças transmitidas por alimento, devido ao importante papel desempenhado pelos manipuladores durante as diferentes etapas de processamento dos alimentos somado aos riscos de contaminação das matérias-primas desde sua origem e às temperaturas abusivas de conservação pós-cozimento (GERMANO; GERMANO, 2008).

No caso das intoxicações alimentares causadas pela ingestão de toxinas pré-formadas produzidas por cepas de *Staphylococcus*, o leite e derivados estão entre os alimentos mais envolvidos nos surtos identificados e estudados (CENCIGOGA et al., 2003; FUEYO et al., 2005).

Três espécies de ECP, *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius* já estiveram envolvidas em vários surtos de intoxicação alimentar e são capazes de produzir enterotoxinas e coagulase (GANDRA et al., 2016).

Para verificar se o alimento em questão é uma fonte potencial de estafilococos coagulase positiva ou indicar contaminação pós processo é realizada a sua contagem em alimentos (SILVA et al., 2007).

A disseminação do uso de antimicrobianos fez com que as bactérias também desenvolvessem defesas relativas aos agentes antibacterianos, com o conseqüente aparecimento de resistência. O fenômeno da resistência bacteriana a diversos antimicrobianos impõe sérias limitações às opções para o tratamento de infecções bacterianas, representando uma ameaça para a saúde pública (GOLL; FARIA, 2014).

Enquanto que os antimicrobianos são essenciais para curar algumas infecções, o seu uso indevido ocorre, de forma significativa, em grande parte do mundo geralmente sob a forma do uso abusivo e desnecessário, o que aumenta a pressão seletiva sobre as bactérias para que desenvolvam resistência (OMS, 2012).

A Organização Mundial de Saúde Animal - OIE publicou diretrizes para o desenvolvimento de programas de monitoramento e vigilância em resistência antimicrobiana e o desenvolvimento de programas nacionais de monitoramento e vigilância da resistência antimicrobiana, harmonização dos programas nacionais de vigilância e monitoramento já existentes em animais e em produtos de origem animal destinados ao consumo humano (OIE, 2008).

O gênero *Staphylococcus* sp. é reconhecido como a causa mais frequente de infecções associadas ao biofilme (OTTO, 2008). Ao ser introduzido no processamento de alimentos, *S. aureus* pode persistir em biofilmes por longos períodos de tempo e pode ser transferido de um ponto para outro e causar contaminações (SHALE et al., 2005).

Objetivou-se com este estudo avaliar a qualidade de leite pasteurizado com inspeção estadual pela pesquisa de estafilococos coagulase positiva, sua resistência antimicrobiana e a capacidade de formar biofilme.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a qualidade do leite pasteurizado com inspeção estadual pela pesquisa estafilococos coagulase positiva (ECP), a sua resistência antimicrobiana e a formação de biofilme

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar os microrganismos ECP no leite beneficiado sob inspeção estadual.
- Avaliar a resistência aos antimicrobianos dos ECP das amostras.
- Analisar a capacidade de formação de biofilme dos ECP.

3. ESTADO DA ARTE

3.1. LEITE

Entende-se por leite, sem outra especificação, o produto oriundo da ordenha completa e ininterrupta, em condições de higiene, de vacas saudáveis, bem alimentadas e descansadas (BRASIL, 2017).

O leite é o mais nobre dos produtos de origem animal, por ser fonte de carboidratos, vitaminas, sais minerais e proteínas, essenciais na dieta humana, bem como seus derivados que, igualmente, se constituem em iguarias de elevado valor nutricional e fonte de renda para os diferentes segmentos da cadeia produtiva do leite (RIBEIRO, 2008; ZOCCAL, 2009).

Por outro lado, a abundância de carboidratos, proteínas e lipídeos em associação com o pH neutro do leite bovino permite o desenvolvimento de uma comunidade microbiana que pode ser altamente variável (ALI; ABDELGADIR, 2011).

Durante o processamento do leite é realizada a pasteurização com o objetivo de evitar perigos à saúde pública decorrentes de microrganismos patogênicos eventualmente presentes e que promove mínimas modificações químicas, físicas, sensoriais e nutricionais (BRASIL, 2017).

A pasteurização promove o aumento da vida útil dos alimentos durante vários dias ou meses. A temperatura e o tempo de duração utilizados dependem da carga de contaminação do produto e das condições de transferência de calor. Pode ser realizada a pasteurização lenta – LTLT (62-65 °C / 30 min) e a pasteurização rápida – HTST (72-75 °C / 15-20 s) (SUCUPIRA; XEREZ; SOUZA, 2012).

3.2. ESTAFILOCOCOS COAGULASE POSITIVA

Os microrganismos do gênero *Staphylococcus* apresentam um diversificado arsenal de fatores de patogenicidade. Destaca-se dentre eles, a estafiloagulase, uma proteína que possui ação enzimática e reage com a protrombina, formando um complexo denominado estafilotrombina que converte o

fibrinogênio em fibrina e coagula o plasma. Esta enzima é um indicador de virulência e marcador fenotípico para a diferenciação destas espécies (COSTA et al., 2011).

Sete espécies de ECP foram identificadas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus lutrae*, *Staphylococcus delphini* e *Staphylococcus pseudintermedius* (FRENEY et al, 1999).

Os estafilococos são facilmente eliminados por tratamentos térmicos, como a pasteurização, mas suas enterotoxinas termoestáveis permanecem ativas nos alimentos, o que representa um risco potencial para a saúde do consumidor e um problema para a saúde pública. Essas enterotoxinas são responsáveis por quadros de intoxicação alimentar estafilocócica no homem, caracterizados por náusea, vômito, diarreia, dor de cabeça, cólica abdominal, cãibra muscular, queda de pressão sanguínea e prostração. Em casos graves, o indivíduo pode necessitar de cuidados médicos; crianças e idosos podem chegar ao óbito (RAPINI et al., 2005).

Estas toxinas são proteínas hidrossolúveis e termoresistentes, mantendo a sua atividade mesmo após a pasteurização. A destruição da enterotoxina obtém-se pelo tratamento a 100°C durante pelo menos 30 minutos (FRANCO; LANGRAF, 2003).

Dentre os microrganismos patogênicos destaca-se a bactéria *Staphylococcus aureus*, que são cocos gram-positivos pertencente à família Micrococcaceae, imóveis e apresentam-se frequentemente agrupados em cacho de uva (FRANCO; LANGRAF, 2003).

Usualmente é identificado apenas o grupo ECP, uma vez que a maioria das estirpes enterotoxigênicas de *S. aureus* produzem a enzima coagulase (DESMARCHELIER et al., 1999). A enumeração de ECP é reconhecida internacionalmente como um padrão microbiológico de segurança de alimentos e importante indicador das condições higiênico-sanitárias da sua produção e conservação (RESTA; OLIVEIRA, 2013).

O método de eleição para enumeração dos estafilococos em alimentos é o método de contagem em placas utilizando o ágar Baird - Parker. Este ágar combina o telurito de potássio (0,01%), glicina (1,2%) e cloreto de lítio (0,5%) como agentes seletivos e, a redução do telurito de potássio e a hidrólise da gema de ovo como características diferenciais das colônias típicas e atípicas de estafilococos.

Desta forma, as colônias típicas são aquelas negras, brilhantes, delimitadas e com dois halos, sendo associada estas características a capacidade do microrganismo em produzir a enzima coagulase, e conseqüentemente ser um potencial produtor de enterotoxina (SANTANA et al., 2006; SILVA et al., 2007).

A coagulase produzida por certos cocos gram-positivos, inclusive *S. aureus* em forma ligada (aderida à parede celular bacteriana) ou como enzima livre, converte fibrinogênio em fibrina insolúvel na presença de plasma, resultando em coagulação. Com este princípio é realizado o teste em tubo com suspensão bacteriana adicionada a plasma de coelho diluído e incubação a 37°C. A coagulase livre faz com que o plasma coagule, formando um gel, habitualmente dentro de 4 h (ZURITA et al., 2010).

3.3. RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A resistência de *S. aureus* aos antimicrobianos tem sido desenvolvida por mutações em seus genes ou pela aquisição de genes de resistência de outras bactérias da mesma espécie (ou até de outras). Geralmente, a resistência que ocorre por mutação gera uma alteração no sítio de ação, enquanto a resistência por aquisição de genes frequentemente envolve a inativação ou a destruição da droga, sendo transmitida por plasmídeos e transposons (SANTOS et al., 2007).

O monitoramento da resistência é importante, pois o uso incorreto e indiscriminado de antimicrobianos é um dos principais fatores que influenciam no incremento das taxas de resistência. Tal conduta minimiza falhas terapêuticas e os riscos de desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos, problemas bastante atuais nos campos da saúde humana e animal (COSTA et al., 2013).

A característica da resistência a determinado antimicrobiano pode se estender a outros, por isso torna-se importante estudar a susceptibilidade de estirpes a diversos antimicrobianos. A técnica de difusão em disco é a mais utilizada por ser de fácil execução e obtenção de resultados relativamente rápidos. A leitura é realizada medindo-se os diâmetros dos halos de inibição formados ao redor dos discos e a interpretação é feita de acordo com a tabela de halos padronizada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012).

Peixoto et al. (2015) observaram a ação insatisfatória de desinfetantes sobre biofilme consolidado de *Staphylococcus* spp., especialmente frente ECP, ressaltando a importância do estabelecimento de programas sanitários a fim de prevenir a formação de biofilmes e a diminuição das fontes de contaminação da glândula mamária nos diferentes sistemas de produção leiteira.

3.4. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA PARA FORMAÇÃO DE BIOFILME

O biofilme é uma estrutura comunitária de células bacterianas protegida por uma matriz polissacarídica ou proteica, auto-fabricada pelas cepas e aderente tanto a superfícies inertes como as vivas. As bactérias se comunicam dentro desta estrutura por meio da elaboração e do reconhecimento de pequenas moléculas (SAGINUR et al., 2006).

O biofilme auxilia na fixação do *S. aureus* no úbere da vaca, agravando o desenvolvimento da mastite (FRANCO e LANGRAF, 2003). Um dos efeitos prejudiciais de biofilmes é que eles podem provocar, biocorrosão em superfícies metálicas e contaminação de alimentos industrializados (BRYERS, 2000).

Os biofilmes estão envolvidos em uma multiplicidade de infecções diferentes e muitas vezes contribuem significativamente para as dificuldades encontradas no tratamento. O desenvolvimento de fármacos anti-biofilme visa combinar esses medicamentos com antimicrobianos convencionais, restaurando assim a eficácia que estes mostram para bactérias em um estado não biofilme (OTTO, 2008).

O método de detecção de biofilme na placa de poliestireno foi considerado o padrão de ouro mais recomendado para a produção de análises de rotina de biofilme em estirpes de *S. aureus* isolado a partir de leite (PENA; UFFO, 2013).

Stepanovic et al. (2000) notaram que o teste de Aderência em Placas é um dos métodos utilizados com maior frequência para quantificar a formação dos biofilmes produzidos por *Staphylococcus* spp., além de funcionar como um indicador de patogenicidade dos microrganismos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, A.A.; ABDELGADIR, W.A. Incidência de *Escherichia coli* em leite de vaca cru no Estado de Cartum. **British Journal of Sciences lácteos**, Birmingham, v. 2, n. 1, p. 23-26, 2011.

BORTOLI, A; GABBI, A. M, VIEGAS, J; ROSSAROLLA, G; ENGELMANN, A. L; SCKONIESKI, F.R. Caracterização dos produtores de leite conveniados à Escola Federal de São Vicente do Sul-RS. 42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, julho de 2005, Goiânia. Sociedade Brasileira de Zootecnia-Viçosa. p. 115-7. [Anais].

BRASIL. Instrução Normativa 62 de 29 de dezembro de 2011. Aprovar o Regulamento Técnico de Produção, Identidade e Qualidade do Leite tipo A o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Cru Refrigerado, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite Pasteurizado e o Regulamento Técnico da Coleta de Leite Cru Refrigerado e seu Transporte a Granel. Diário Oficial da União 30 12 2011; 1 (1): 6-11.

BRASIL. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Diário Oficial da União 30 03 2017; 1 (1):3-27.

BRYERS, J. D. Formação de biofilme e persistência. In: Bryers, JD (eds). **Biofilmes II: Análise de Processos e Aplicações**. Wiley-Liss Inc., Nova Iorque, 2000, 432p.

CENCI-GOGA, B.T.; KARAMA, M.; ROSSITTO, P.V.; et al. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* isolated from mastitis cows. **Journal of Food Protection**, v.66, p.1693-1696, 2003.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 22st informational supplement M100-S22. Wayne, PA: CLSI; 2012.

COSTA, M.G.; PEREIRA, U.P.; CUSTÓDIO, D.A.C.; SILVA, N. Caracterização de *Staphylococcus coagulase-positiva* utilizando plasmas de diferentes espécies animais. **Rev Inst Adolfo Lutz**. São Paulo, v. 70, n. 4, p. 584-8, 2011.

COSTA, G.M.; BARROS, R.A.; CUSTÓDIO, D.A.C; et al. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v. 80, n. 3, p. 297-302, 2013.

DESMARCHELIER, P.M.; HIGGS, G.M.; MILLS, L.; et al. Incidence of coagulase positive *Staphylococcus* on beef carcasses in three Australian abattoirs. **International Journal of Food Microbiology**, v.47, p.221–229, 1999.

FRANCO, B.D.G.M., LANDGRAF, M. Microbiologia dos Alimentos. ATHENEU: São Paulo. 182p. 2003.

FRENEY, J., KLOOS, W.E., HAJEK, V., WEBST, J.A. Recomendado padrões mínimos para a descrição de novas espécies de estafilococos. **Int J Syst Bacteriol**, v. 49, p. 489-502, 1999.

FUEYO, J.M.; MENDOZA, M.C.; MARTIN, M.C. Enterotoxins and toxic shock syndrome toxin in *Staphylococcus aureus* recovered from human nasal carriers and manually handled foods: epidemiological and genetic findings. **Microbes and Infections**, v.7, p.187-194, 2005.

GANDRA, E. A.; FERNANDEZ, M. A.; SILVA, J. A.; et al. Detection by multiplex PCR of *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* in artificially contaminated milk. **Cienc. Rural, Santa Maria**, v. 46, n. 8, p. 1418-1423, 2016.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 3 ed. rev. e ampl. Barueri: Manole, 2008.

GOLL, A. S.; FARIA, M. G. I. Resistência bacteriana como consequência do uso inadequado de antibióticos. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v.5, n.1, p. 69-72, dez 2013 - fev 2014.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatística da Produção Pecuária, 2017. Produção de origem animal do Brasil, das Grandes Regiões e das Unidades da Federação, segundo o tipo de produto de origem animal. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html?edicao=16984&t=resultados> Acesso em 10 de outubro de 2017.

MATA, N. F.; TOLEDO, P. S., PAVIA, P. C. A importância da pasteurização: comparação microbiológica entre leite cru e pasteurizado, do tipo B. **Rev. Inst. Latic. “Cândido Tostes”**, v. 67, nº 384, p. 66-70, 2012.

NASCENTES, R. M.; ARAÚJO, B. C. Comparação da qualidade microbiológica de leite cru, pasteurizado e UHT comercializados na cidade de Patos de Minas, MG. **Perquirere**, v. 9, n. 1, p. 212-223, 2012.

OIE. Organização Mundial de Saúde Animal. Harmonização dos programas nacionais de vigilância e monitoramento da resistência antimicrobiana, p.1-7. Em: Organização Mundial para a Saúde Animal (Ed.), Código Sanitário Animal Terrestre. OIE, Paris. 2008.

OLIVEIRA, E. N. A.; SANTOS, D. C. Evaluation of physicochemical quality of pasteurized milk. **Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)**, São Paulo, v. 71, n. 1, 2012.

OMS. Organização Mundial de Saúde. A crescente ameaça da resistência antimicrobiana Opções de ação. Sumário Executivo. 2012.

OTTO, M. Staphylococcal Biofilms. **Curr Top Microbiol Immunol**. 2008; 322: 207–228.

PEIXOTO, M.M.R.; GRESSLER, L.T.; SUTILI, F.J.; et al. Ação dos desinfetantes sobre a adesão e biofilme consolidado de *Staphylococcus* spp. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 35, n. 2, p. 105-109, 2015.

PENA, J; UFFO, O. Producción de biofilme en genotipos de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina en Cuba. **Rev Salud Anim.**, La Habana, v. 35, n. 3, p. 189-196, 2013.

RAPINI, L.S.; CERQUEIRA, M.M.O.P.; CARMO, L.S.; et al. Presença de *Staphylococcus* spp. produtores de enterotoxinas e da toxina do choque tóxico em manipuladores de queijo de cabra. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.6, p.825-829, 2005.

RESTA, M.S.A.; OLIVEIRA, T.C.R.M. de. Avaliação do padrão estafilococos coagulase positiva estabelecido pela legislação brasileira para massas

alimentícias. **Braz. J. Food Technol.**, Campinas, v. 16, n. 4, p. 319-325, 2013.

RIBEIRO, M.G. **Princípios terapêuticos na mastite em animais de produção e de companhia**. In: Andrade S.F. (Ed.), Manual de Terapêutica Veterinária. 3ª ed. Roca, São Paulo. 936p. 2008.

SAGINUR, R.; STDENIS, M.; FERRIS, W.; et al. Multiple Combination Bactericidal Testing of Staphylococcal Biofilms from Implant-Associated Infections. **Antimicrobial. Ag. Chemother.**, v. 50, n. 1, p. 55–61, 2006.

SANTANA, E. H. W. de; BELOTI, V.; OLIVEIRA, T.C.R.M de; et al. Estafilococos: morfologia das colônias, produção de coagulase e enterotoxina a, em amostras isoladas de leite cru refrigerado. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 4, p. 639-646, 2006.

SANTOS, A.L.; SANTOS, D.O.; FREITAS, C.C.; et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p. 413-423, Dec. 2007.

SHALE, K.; LUES, J.F.R.; VENTER, P.; et al. The distribution of *Staphylococcus* sp. on bovine meat from abattoir deboning rooms. **Food Microbiology**, v.22, p.433-438, 2005.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A; SILVEIRA, N.F.A.; et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3ªed. Livraria Varela Ltda, São Paulo, 2007, n.536 p- 87,89,138.

SILVA, M. C. D.; SILVA, J. V. L.; RAMOS, A. C. S.; et al. Caracterização microbiológica e físico-química de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no Estado de Alagoas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 28, n.1, p. 226-230, 2008.

STEPANOVIC, S; VUKOVIC D; DAKIC I; et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiology Methods.**, v. 40, p.175-179, 2000.

SUCUPIRA, N. R; XEREZ, A. C. P; SOUSA, P. H. S. Perdas Vitamínicas Durante o Tratamento Térmico de Alimentos. **Cient Ciênc Biol Saúde.**; v. 14, n. 2, p.121-8, 2012.

VELAZQUEZ-GUADARRAMA, N., OLIVARES-CERVANTES, A.L., SALINAS, E., et al. Presence of environmental coagulase-positive staphylococci, their clonal relationship, resistance factors and ability to form biofilm. **Rev. argent. microbiol.**, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, v. 49, n. 1, p. 15-23, 2017.

ZOCCAL, R. **O leite que o Brasil precisa**. Brasília: EMBRAPA, 2009. Disponível em: < <http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2009/o-leite-de-que-o-brasilprecisa/>>

ZURITA, J., MEJÍA, C.; GUZMÁN-BLANCO, M. Diagnóstico de MRSA na América Latina. **Braz J Infect Dis.**, v.14 (Suppl 2), p. S97-S107, 2010.

ARTIGO 1

PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

Caracterização fenotípica de biofilme e resistência antimicrobiana de estafilococos coagulase positiva presentes em leite pasteurizado sob inspeção estadual¹

²Jana Kelly dos Santos,³Ludmilla Santana Soares e Barros, ⁴Elizabeth Sampaio Medeiros, ⁴Thayná Milena Siqueira Silva, ⁴Karla Danielle Almeida Soares, ⁵Artur Eustáquio da Silva

ABSTRACT. - SANTOS, J.K.; BARROS, L.S.S.; MEDEIROS, E.S.; SILVA, T.M.S.; SOARES, K.D.A.; SILVA, A.E. 2017. [Phenotypic characterization of biofilm and antimicrobial resistance of coagulase positive staphylococci present in pasteurized milk under state inspection] Caracterização fenotípica de biofilme e resistência antimicrobiana de estafilococos coagulase positiva presentes em leite pasteurizado sob inspeção estadual. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):0000. Veterinária Brasileira 00(0):00-00. Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900, Brazil. E-mail: jana.santos@ifal.edu.br

Milk is an alternative source of proteins accessible to the low income population, which is generally lacking in animal protein, proving the socioeconomic importance of this food. In public health, particularly in the area of sanitary food surveillance, *Staphylococcus aureus*, the main staphylococci of positive coagulase, is considered one of the most frequent cause of outbreaks of foodborne diseases. Milk and milk products are among the foods most involved in the outbreaks identified and studied. The objective of this study was to evaluate the quality of pasteurized milk with state inspection by the positive coagulase staphylococci, its antimicrobial resistance and the ability to form biofilm. The study was carried out in Alagoas and 75L of pasteurized milk were collected from five processing plants and three different lots in the municipalities of Maceió, Coruripe, Capela, Chã Preta and Quebrangulo. Positive coagulase staphylococci (PCS) was performed using Baird-Parker Agar medium, rabbit plasma and brain-heart infusion broth. The PCS were submitted to the antibiogram by means of inoculation in Müller Hinton broth and the discs were applied with the drugs: gentamicin (5µg), amoxicillin (10mcg), polymyxin (300mg), erythromycin (10µg), penicillin (10µg), ampicillin (10µg), tetracycline (30µg), sulfazotrim (25µg) and cephalexin (30µg). The phenotypic characterization of PCS was also performed by the ELISA plate adhesion method for biofilm formation. Of the 75 samples, 4 (5.3%) samples were identified with PCS. The count ranged from $1,2 \times 10^4$ a $2,6 \times 10^5$ CFU/mL⁻¹. Isolated PCS showed 100% sensitivity to all

antimicrobials tested and none were biofilm forming. The quality of pasteurized milk with state inspection of the study in relation to the presence of coagulase positive staphylococci is inadequate for consumption. The sensitivity of PCS to all antimicrobials and non-biofilm formation reduces the risk that these microorganisms could cause to public health.

INDEX TERMS: food; disease; microorganism

² Instituto Federal de Alagoas (IFAL), Rua 17 de Agosto s/n, Centro, Satuba, AL 57120-000, Brasil. Pesquisa de mestrado. *Autor para correspondência: jana.santos@ifal.edu.br.

³ Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), Av. Rui Barbosa 710, Centro, Cruz das Almas, BA 44.380-000

⁴ Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, Recife, PE 52171-900

⁵ Centro Universitário (CESMAC), Rodovia Divaldo Suruagy s/n, Quadra 4, Lote Marechal Deodoro, AL 57160-000

RESUMO. - O leite é uma fonte alternativa de proteínas acessíveis à população de baixa renda, que geralmente é carente em proteína de origem animal, comprovando a importância socioeconômica deste alimento. Em saúde pública, em particular na área de vigilância sanitária de alimentos, o *S. aureus*, o principal dos estafilococos coagulase positiva, é considerado um dos mais frequentes causadores de surtos de doenças transmitidas por alimentos. O leite e derivados estão entre os alimentos mais envolvidos nos surtos identificados e estudados. Objetivou-se com este estudo avaliar a qualidade de leite pasteurizado com inspeção estadual pela pesquisa de estafilococos coagulase positiva, sua resistência antimicrobiana e a capacidade de formar biofilme. O estudo foi realizado em Alagoas e foram colhidos 75L de leite pasteurizado, de três estabelecimentos e de três lotes diferentes, nos municípios Maceió, Coruripe, Capela, Chã Preta e Quebrangulo. Realizou-se a pesquisa de estafilococos coagulase positiva (ECP) utilizando o meio Agar Baird-Parker e BHI. Das 75 amostras, foram identificadas 4(5,3%) amostras com ECP. A contagem

variou de $1,2 \times 10^4$ a $2,6 \times 10^5$ UFC/mL⁻¹. Os ECP foram submetidos ao antibiograma por meio da inoculação em Caldo Müeller Hinton e aplicados os discos com as drogas: gentamicina (5µg), amoxicilina (10mcg), polimixina (300mg), eritromicina (10µg), penicilina (10µg), ampicilina (10 µg), tetraciclina (30µg), sulfazotrim (25µg) e cefalexina (30µg). Realizou-se também a caracterização fenotípica dos ECP pelo método de aderência em placa de ELISA para formação de biofilme. Os estafilococos coagulase positiva isolados apresentaram 100% sensibilidade a todos os antimicrobianos testados e nenhum foi formador de biofilme. A qualidade do leite pasteurizado com inspeção estadual do estudo com relação à presença de estafilococos coagulase positiva não é adequada para o consumo. A sensibilidade dos estafilococos a todos antimicrobianos e a não formação de biofilme diminui o risco que esses microrganismos poderiam ocasionar à saúde pública.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: alimento; doença, microrganismo

INTRODUÇÃO

Durante o processamento do leite é realizada a pasteurização com o objetivo de eliminar os microrganismos patogênicos que possam contaminá-lo tornando-o um produto inócuo ao consumo humano e diminuir sua carga bacteriana a limites aceitáveis, de acordo com normatização específica (Brasil 2017).

Apesar de a legislação brasileira não exigir para o leite a enumeração de estafilococos coagulase positiva (ECP), sua pesquisa é reconhecida internacionalmente como um padrão microbiológico de segurança de alimentos e importante indicador das condições higiênico-sanitárias da sua produção e conservação (Resta e Oliveira 2013).

Entre as espécies coagulase positiva, destaca-se a bactéria patogênica *Staphylococcus aureus*, que são cocos gram-positivos pertencente à família Micrococcaceae, imóveis e apresentam-se frequentemente agrupados em cacho de uva (Sabioni et al.1988; Cerqueira 1994, Câmara 2001; Franco e Langraf 2003; Jay 2005).

Usualmente é identificado apenas o grupo estafilococos coagulase positiva, uma vez que a maioria das estirpes enterotoxigênicas de *S. aureus* produzem a enzima coagulase (Desmarchelier et al. 1999). Por isso tem por objetivo substituir a determinação de *Staphylococcus aureus* (Brasil 2001).

O método de eleição para enumeração dos estafilococos em alimentos é o método de contagem em placas utilizando o ágar Baird - Parker. Este ágar combina o telurito de potássio (0,01%), glicina (1,2%) e cloreto de lítio (0,5%) como agentes seletivos e, a redução do telurito de potássio e a hidrólise da gema de ovo como características diferenciais das colônias típicas e atípicas de estafilococos. Desta forma, as colônias típicas são aquelas negras, brilhantes, delimitadas e com dois halos, sendo associada estas características a capacidade do microrganismo em produzir a enzima coagulase, e conseqüentemente ser um potencial produtor de enterotoxina (Santana et al. 2006, Silva et al. 2007).

Os mecanismos de aquisição de resistência podem ser classificados em dois grupos: mutação em genes presentes no cromossomo bacteriano ou aquisição de genes de resistência de outros microrganismos, através dos processos de transdução, transformação ou conjugação (Ito et al., 2003).

Objetivou-se com este trabalho avaliar qualidade de leite pasteurizado com inspeção estadual pela pesquisa de estafilococos coagulase positiva, sua resistência antimicrobiana e a capacidade de formar biofilme.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de estudo. O estudo foi realizado na região Nordeste do Brasil, no estado de Alagoas. Foram colhidas amostras em usinas de beneficiamento localizadas em Maceió, Coruripe, Capela, Chã Preta e Quebrangulo, no período de outubro de 2016 a maio de 2017.

Amostragem. Em Alagoas há oito usinas de beneficiamento produtores de leite pasteurizado com inspeção estadual. Em três destes estabelecimentos não foi possível realizar as colheitas devido à suspensão da produção ocasionada por longo período de seca na região. Foram coletados 15 litros de leite pasteurizado em cada um dos 5 estabelecimentos, divididos em três lotes de 5L, com intervalo de no máximo 21 dias entre coletas, totalizando 75 amostras $[(5+5+5) \times 5]$. As amostras

foram colhidas no setor de expedição de cada estabelecimento, no dia de sua produção.

As amostras foram transportadas em caixas isotérmicas para o Laboratório de Inspeção de Alimentos da Universidade Federal Rural de Pernambuco e analisadas em no máximo 24h após serem processadas nos estabelecimentos.

Pesquisa de *Staphylococcus coagulase positiva*. A metodologia utilizada para a pesquisa de SCP foi a preconizada pela ISO 6888-2 (1999) por meio do método horizontal de estafilococos coagulase positiva.

Avaliação da resistência antimicrobiana. Os quatro ECP isolados foram submetidos ao antibiograma por meio da inoculação em Caldo Müeller Hinton seguindo a metodologia descrita pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (2012). Logo após, foram aplicados os discos impregnados com os seguintes antimicrobianas: gentamicina (5µg), amoxicilina (10mcg), polimixina (300mg), eritromicina (10µg), penicilina (10µg), ampicilina (10 µg), tetraciclina (30µg), sulfazotrim (25µg) e cefalexina (30µg). As amostras foram classificadas, de acordo com a susceptibilidade, em resistentes, sensíveis e de sensibilidade intermediária.

Caracterização fenotípica de *Staphylococcus spp.* para a capacidade de formar biofilme. A avaliação fenotípica de produção de biofilme foi avaliada de acordo com o procedimento descrito por Stepanovic et al. (2000). Foi realizada a leitura a 620nm em um equipamento de ELISA.

RESULTADOS

Das 75 amostras de leite analisadas, foram identificadas 4(5,3%) amostras com estafilococos coagulase positiva, de três estabelecimentos e lotes diferentes. Observou-se que apenas dois estabelecimentos apresentaram todas as 15 amostras negativas para ECP (Tabela 1).

Tabela 1 – Frequência de amostras positivas e contagem de ECP (UFC/mL⁻¹) por lote e estabelecimento.

Usina de Beneficiamento	Lote 1	Lote 2	Lote 3
A	<100	<100	<100

B	<100	<100	1/5 (20%) 1,6x10 ⁵
C	1/5 (20%) 1,9x10 ⁵	1/5 (20%) 2,6x10 ⁵	<100
D	<100	1/5 (20%) 1,2x10 ⁴	<100
E	<100	<100	<100

Os quatro estafilococos coagulase positiva isolados apresentaram 100% sensibilidade a todos os antimicrobianos testados.

Na caracterização fenotípica todos ECP apresentaram a densidade óptica maior ou igual ao controle negativo no leitor de ELISA. Portanto, nenhum isolado foi formador de biofilme.

DISCUSSÃO

Os estafilococos coagulase positiva encontrados nas amostras indicam falhas do binômio tempo/temperatura durante a pasteurização industrial; matéria-prima excessivamente contaminada, sanificação deficiente das linhas de produção, transporte e armazenamento em temperaturas inadequadas, e/ou contaminação pós-pasteurização (Oliveira 2005).

O leite cru obtido de animais com infecção estafilocócica nas glândulas mamárias (mastite) tem sido considerado a principal fonte de cepas *S. aureus*, podendo contaminar excessivamente a matéria-prima. Mota et al (2012) isolaram de 1080 amostras de leite bovino bactérias do gênero *Staphylococcus* em 291(39,3%), sendo destes isolados 37(12,7%) como ECP.

A presença de ECP é preocupante considerando que o leite já havia passado por tratamento térmico e estava pronto para o consumo. Estima-se ser necessário a ingestão de 10⁵ UFC de *Staphylococcus* spp. por grama ou mililitro de alimento para provocar sinais de toxi-infecção (Cardoso 1985; Bergdoll 1989;

Gandra et al. 2016). Neste estudo entre as 4 amostras positivas, 3 estavam acima deste valor.

A RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, da ANVISA, estabelece os padrões microbiológicos para os alimentos e exige para alimentos em geral que o limite permitido para ECP seja de 10^3 UFC/mL⁻¹. Porém, para o leite não há esta exigência, o que poderia ser reavaliado considerando que mesmo no produto pronto para consumo é encontrado o microrganismo.

É importante ressaltar também que a ausência de células viáveis de *Staphylococcus* spp. no momento da análise de amostras não assegura que o produto esteja livre de enterotoxinas estafilocócicas, devido à sua termoestabilidade. Entretanto, a detecção de enterotoxinas diretamente nos alimentos é difícil de ser utilizada na rotina laboratorial devido ao seu alto custo (Resta e Oliveira 2013).

No Brasil, conforme Ataíde et al. (2008), a média das contagens de *Staphylococcus* coagulase positiva no leite cru foi $3,9 \times 10^4$ UFC/mL⁻¹, valor menor que o encontrado nesta pesquisa com leite pasteurizado.

Estudos demonstram que três espécies de ECP, *S. aureus*, *S. hyicus* e *S. intermedius* já estiveram envolvidas em vários surtos de intoxicação alimentar e são capazes de produzir enterotoxinas e coagulase (Gandra et al. 2016). Segundo de Freitas Guimarães et al. (2013), as espécies de ECP com maior potencial enterotoxigênico foram *S. aureus* (32,2%) e *S. hyicus* (47,4%).

Como agravante, o consumidor desse leite pasteurizado com inspeção estadual é, em sua maioria, a população carente, abrangida pelo programa de governo do estado, que tem menos recursos para cuidar da saúde.

Todos os isolados de ECP foram sensíveis a todos os antimicrobianos, permitindo o tratamento eficaz com qualquer uma dessas drogas que fosse utilizada em caso de infecção estafilocócica.

Resultados diferentes foram encontrados por Medeiros et al. (2009), que encontraram 35% dos ECP sensíveis a todos os antimicrobianos. Costa et al. (2013) observaram que apenas 4,54% dos isolados testados, distribuídos entre oito rebanhos, foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Em outra pesquisa, a resistência dos ECP à penicilina G foi de 36,0%; à ampicilina de 34,0% e à oxacilina de 16,7% (De Freitas Guimarães 2015).

Com relação a virulência, nenhum ECP apresentou capacidade de formar biofilme. Em contrapartida, Peixoto et al. (2015) caracterizaram todos os isolados de ECP em leite como produtores de biofilme, classificados fortes formadores de biofilme, uma vez que, apresentaram DO acima de no mínimo quatro vezes a DO do seu respectivo controle. Corroborando com os 98% (96/98) dos isolados de *S. aureus* produtores de biofilmes com o método Ágar Vermelho Congo encontrados por Pena e Uffo (2013).

Convém destacar que essas amostras são destinadas ao Programa do Leite no Estado de Alagoas e, portanto, seus fornecedores têm o dever de produzir alimento seguro e com qualidade, não somente pelo valor nutricional, como também no aspecto de higiene. Este fato é de particular importância, pois o público-alvo deste programa é bastante susceptível a enfermidades transmitidas por alimentos (Silva et al. 2008).

A realização de análises, incluindo a enumeração de estafilococos coagulase positiva, antes de o produto processado ir para o consumo, pode evitar riscos à saúde pública.

E, além das autoridades sanitárias, os produtores rurais, indústrias de beneficiamento e estabelecimentos de comercialização de produtos alimentícios, ou seja, todos os envolvidos na cadeia alimentar, têm a responsabilidade em fornecer alimentos seguros à população (Giova 1997).

CONCLUSÕES

A qualidade do leite pasteurizado com inspeção estadual do estudo com relação à presença de estafilococos coagulase positiva não foi adequada para o consumo. A sensibilidade dos estafilococos a todos antimicrobianos e a não formação de biofilme diminui o risco que esses microrganismos poderiam ocasionar à saúde pública.

REFERÊNCIAS

Ataíde W.S.; Maciel J.F., Lima P.L.A.; et al. 2008. Avaliação microbiológica e físico-química durante o processamento do leite pasteurizado. Revista do Instituto Adolfo Lutz, 67(1): 73-77.

Bergdoll, M.S. *Staphylococcus aureus*. In: Foodborne bacterial pathogens. New York: Marcel Dekker, p.463-523, 1989.

- Brasil. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Aprova o “Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos”. Órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- Brasil. Decreto nº 9.013, de 29 de março de 2017. Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. Diário Oficial da União 30 03 2017; 1(1):3-27.
- Cardoso, V.M.; Silva, G.G.; Cano, V. Contagem de microrganismos. In: Análise Microbiológica de Alimentos. Rio de Janeiro, Quimitra, p. 20-27. 1985.
- Câmara, S.A.V. Surtos de Toxinfecções Alimentares no Estado de Mato Grosso do Sul, 1998-2001. 2001, 79f. Monografia (Especialização em Saúde Pública) - Escola de Saúde Pública Dr. Jorge David Nasser, Campo Grande.
- Cerqueira, M.M.O.P.; Souza, M.R.; Fonseca, L.M.; Rodrigues, R.; Rubinich, J. 1994. Surto epidêmico de toxinfecção alimentar envolvendo queijo tipo Minas Frescal em Pará de Minas. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. Belo Horizonte, 46 (6): 723-728.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 22st informational supplement M100-S22. Wayne, PA: CLSI; 2012.
- Costa, G.M.; Barros, R.A.; Custódio, D.A.C; *et al.* 2013. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 80(3): 297-302.
- Desmarchelier, P.M.; Higgs, G.M.; Mills, L.; Sullivan, A.M.; Vanderlinde, P.B. 1999. Incidence of coagulase positive *Staphylococcus* on beef carcasses in three Australian abattoirs. International Journal of Food Microbiology, 47:221–229.
- de Freitas Guimarães F; Nóbrega D.B, Richini-Pereira V.B.; *et al.* 2013. Enterotoxin genes in coagulase-negative and coagulase-positive staphylococci isolated from bovine milk. J Dairy Sci. 96(5): 2866-72.
- Franco, B.D.G.M., Landgraf, M. Microbiologia dos Alimentos. ATHENEU: São Paulo. 182p. 2003.
- Gandra, E. A.; Fernandez, M.A.; Silva, J.A.; *et al.* 2016. Detection by multiplex PCR of *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius* and *S. hyicus* in artificially contaminated milk. Cienc. Rural, Santa Maria, 46(8):1418-1423.
- Giova, A.T (trad.). APPCC na qualidade e segurança microbiológica de alimentos. São Paulo: Varela, 1997.

International Organization for Standardization (ISO). ISO 6888-2:1999. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species). First edition, 1999-02-15. Geneve: ISO; 1999.

Ito, T.; Okuma K.; Ma X.X.; Yuzawa H.; Hiramatsu K. 2003. Insights on antibiotics resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island. Drug Resistance Updates 6(1):41-52.

Jay, J. Microbiologia de alimentos. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 52-55, 471- 485.

Medeiros, E. S.; Mota, R.A; Santos, M.V; et al. 2009. Perfil de sensibilidade microbiana in vitro de linhagens de *Staphylococcus* spp. isoladas de vacas com mastite subclínica. Pesq. Vet. Bras., Rio de Janeiro, 29(7): 569-574.

Mota, R. A.; de Medeiros, E.S.; dos Santos, M. V; Júnior, J.W.P.; Moura, A.P.B.L; Coutinho, L.C.A. 2012. Participação dos *Staphylococcus* spp na etiologia das mastites em bovinos leiteiros no estado de Pernambuco (Brasil). Ci. Anim. Bras., Goiânia, 13(1):124-130.

Oliveira, R. P. S. Condições microbiológicas e avaliação da pasteurização em amostras de leite comercializadas no município de Piracicaba-SP. 2005. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos), Universidade de São Paulo, São Paulo. 2005.

Peixoto, M.M.R.; Gressler, L.T; Sutili, F.J; et al. 2015. Ação dos desinfetantes sobre a adesão e biofilme consolidado de *Staphylococcus* spp. Pesq. Vet. Bras., Rio de Janeiro, 35(2): 105-109.

Pena, J; Uffo, O. 2013. Producción de biofilme en genotipos de *Staphylococcus aureus* aislados de mastitis bovina en Cuba. Rev Salud Anim., La Habana, 35(3):189-196.

Resta, M.S.A.; Oliveira, T.C.R.M. de. 2013. Avaliação do padrão estafilococos coagulase positiva estabelecido pela legislação brasileira para massas alimentícias. Braz. J. Food Technol., Campinas,16(4): 319-325.

Sabioni, J.G.; Hirooka, E.Y.; Souza, M.L.R. 1988. Intoxicação alimentar por queijo minas contaminado com *Staphylococcus aureus*. Revista de Saúde Pública. São Paulo, 22(5): 458-461.

Santana, E. H. W. de; Beloti, V.; Oliveira, T.C.R.M de; et al. 2006. Estafilococos: morfologia das colônias, produção de coagulase e enterotoxina a, em amostras isoladas de leite cru refrigerado. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, 27(4): 639-646.

Silva, N.; Junqueira, V.C.A; Silveira, N.F.A.; et al. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. 3ªed. Livraria Varela Ltda, São Paulo, 2007, n.536 p-87,89,138.

Silva, M.C.D.; Silva, J. V. L.; Ramos, A.C.S.; et al. 2008. Caracterização microbiológica e físico-química de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no Estado de Alagoas. Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas, 28(1): 226-230.

Stepanovic, S; Vukovic D; Dakic I; et al. 2000. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. Journal of Microbiology Methods, 40:175-179.