



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO

JESSICA BEZERRA DOS SANTOS RODRIGUES

ATIVIDADE LIPOLÍTICA, PROTEOLÍTICA E RESISTOTIPAGEM DE
CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

João Pessoa

2013

JESSICA BEZERRA DOS SANTOS RODRIGUES

ATIVIDADE LIPOLÍTICA, PROTEOLÍTICA E RESISTOTIPAGEM DE
CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

João Pessoa

2013

R696a *Rodrigues, Jessica Bezerra dos Santos.*
 Atividade lipolítica, proteolítica e
 resistotipagem de cepas de staphylococcus aureus /
 Jessica Bezerra dos Santos Rodrigues.—João
 Pessoa, 2013.
 59f.
 Orientador: José Pinto de Siqueira Júnior
 Co-orientador: Evandro Leite de Souza
 Dissertação (Mestrado) – UFPB/CCS
 1. Nutrição. 2. Staphylococcus aureus. 3.
 Alimento - contaminação. 4. Lipase. 5. Protease.

JESSICA BEZERRA DOS SANTOS RODRIGUES

**ATIVIDADE LIPOLÍTICA, PROTEOLÍTICA E RESISTOTIPAGEM DE
CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Pinto de Siqueira Júnior

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Evandro Leite de Souza

João Pessoa

2013

JESSICA BEZERRA DOS SANTOS RODRIGUES

**ATIVIDADE LIPOLÍTICA, PROTEOLÍTICA E RESISTOTIPAGEM DE
CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Nutrição.

APROVADA EM ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof Dr José Pinto de Siqueira Júnior
Orientador
(Departamento de Biologia Molecular/CCEN/UFPB)

Prof Dr Evandro Leite de Souza
Co-Orientador
(Departamento de Nutrição/CCS/UFPB)

Prof. Dr^a Marciane Magnani
Examinador interno – Titular
(Departamento de Engenharia de Alimentos/CT/UFPB)

Prof^a Dr^a Rita de Cássia Ramos do Egypto Queiroga
Examinador interno – Suplente
(Departamento de Nutrição/CCS/UFPB)

Prof^a Dr^a. Maria do Socorro Vieira Pereira
Examinador externo – Titular
(Departamento de Biologia Molecular/CCEN/UFPB)

Prof Dr. Sávio Torres de Farias
Examinador externo – Suplente
(Departamento de Biologia Molecular/CCEN/UFPB)

**João Pessoa
2013**

Dedico este trabalho aos meus pais, Humberto Job dos Santos e Maurítânia Bezerra dos Santos. Não apenas este trabalho, mas todas as minhas conquistas profissionais e pessoais são dedicadas a vocês.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a *Deus* que me deu força e sabedoria para trilhar os caminhos da área acadêmica e concretizar mais este sonho.

Aos meus pais, *Humberto Job dos Santos* e *Mauritânia Bezerra dos Santos*, por terem fornecido condições para que eu me tornasse a pessoa que sou. Vocês sempre me deram força e incentivo para trilhar caminhos mais altos e são merecedores de toda a minha gratidão. Amo vocês!

Ao meu esposo, *Daniel Berg Araújo Rodrigues*, que no processo inquietador de elaboração de uma dissertação estive a todo tempo envolvido. Sempre a meu lado, me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Devido a seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, este trabalho pôde ser concretizado. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho! Amo você.

Ao meu irmão, *Humberto Júnior*, que sempre me deu forças.

Ao meu orientador Prof. Dr. *José Pinto de Siqueira Júnior* que é um exemplo de dedicação e amor à ciência. Obrigada pela sua confiança e amizade, por ouvir todas as minhas inquietações, certamente não conseguiria sozinha ordenar as ideias que borbulhavam na minha cabeça. Agradeço pela sua disponibilidade a qualquer hora e lugar e pelo carinho com que apresentaram suas valiosas e relevantes sugestões.

As minhas amigas *Raquel Patrícia*, *Myrella Cariry*, *Ynara Fádua*, *Dandara Felizardo* e *Sara Falcão* que estiveram sempre comigo em toda a caminhada.

Ao meu co-orientador *Evandro Leite de Souza* que sempre acreditou e confiou no meu trabalho. Nesses últimos momentos do mestrado (incluindo finais de semana e feriados) demonstrou disponibilidade e uma atenção generosa para que eu concluísse meus trabalhos.

A toda a minha família e amigos, em especial aos meus sogros *Justino* e *Josilva Rodrigues*, a minha cunhada *Noádia Priscila* que também é minha colega de profissão e minha também cunhada *Talytta Rebeca* e seu esposo *Deyvid Galdino*. É preciso destacar o

afeto, solidariedade e compreensão de todos vocês. Sem o apoio dessas pessoas, a execução desse trabalho teria sido impossível.

A todos do Laboratório de Genética de Microrganismos, seu *Bosco*, dona *Severina*, *Cybelle*, *Vivyanne*, *Nathalie*, *Suellen*, *Ísis* e *Ryldene* pelo aprendizado dentro e fora do laboratório.

Ao pessoal do *Laboratório de Microbiologia de Alimentos*, em especial a *Quênia Gramille* que me ensinou os primeiros passos da microbiologia.

Ao professor *Celso José Bruno de Oliveira* e a todos do *Laboratório de Análises de Produtos de Origem Animal* que me acolheram e ensinaram novas técnicas que levarei para o resto da vida.

A todos os professores e funcionários do *Programa de Pós-Graduação em Ciências da Nutrição*.

A todos os queridos amigos da turma de Pós-Graduação, *Amanda Gonçalves*, *Amanda Marques*, *Bruno Soares*, *Caio Victor*, *Carlos Vinícius*, *Carolina Leal*, *Caroline Cabral*, *Dandara Felizardo*, *Edna Samara*, *Fernanda Freitas*, *Jacieny Jane*, *Karla Gomes*, *Larissa Sousa*, *Mário Coutinho*, *Myrella Cariry*, *Nayara Massa*, *Paola Nunes*, *Raquel Patrícia* e *Whyara Almeida*.

Ao *Hospital Universitário Lauro Wanderley* e o *Hospital Santa Isabel* que me receberam de braços abertos para que eu realizasse as coletas das amostras a serem estudadas.

A *Capes* (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida durante todo o período de mestrado, o que possibilitou que eu me dedicasse exclusivamente à pesquisa e à escrita dessa dissertação.

“Pois o Senhor é quem dá sabedoria; de sua boca procedem o conhecimento e o discernimento”.

Provérbios 2:6

RESUMO

Staphylococcus aureus está disseminado na natureza de forma variável, e apresenta-se como a bactéria mais frequentemente encontrada em infecções de pele, todavia é capaz de colonizar quase todos os órgãos do corpo humano. Esse patógeno também pode contaminar alimentos. Intoxicação alimentar estafilocócica é uma das doenças veiculadas por alimentos mais comuns em todo o mundo. Este estudo teve como objetivo isolar e caracterizar amostras de *S. aureus* isolados de superfícies de preparo de carne e vegetais de hospitais públicos situados na cidade de João Pessoa – Paraíba – Brasil, quanto a produção de lipase, protease, perfil de resistência a antimicrobianos e detecção de gene *mecA*. Ainda, foi realizada a avaliação da produção de lipase de cepas de *S. aureus* isoladas de animais (úbere e fossas nasais), alimentos (queijo ricota) e de feridas humana infectadas (ambiente hospitalar). Foi observada a produção de lipase nos isolados de feridas humanas (43/50), animais (16/30), queijo (34/41), bancada de preparo de carne (24/24) e bancada de preparo de vegetais (22/24). Todas as cepas isoladas de bancada de corte de carne, vegetais e de queijo produziram protease com zonas de precipitação de diâmetros variando de < 0,5 a 4 mm. Dentre 48 *S. aureus* isolados de superfícies de processamento de alimentos testados, 100% foram sensíveis a clorafenicol, norfloxacin e metilicina. Doze isolados foram resistentes a eritromicina e tetraciclina, enquanto todos os isolados foram resistentes à estreptomicina e penicilina. Nas reações de amplificação não foi identificado o fragmento correspondente ao gene *mecA* entre os isolados avaliados. As atividades lipolítica e proteolítica, bem como resistência a antibióticos (mesmo para aqueles já sem valor terapêutico) se constituem em importantes marcadores genéticos e epidemiológicos podendo contribuir para a caracterização de amostras ambiente ou hospedeiro-específicas, bem como, se realizada periodicamente, para se distinguir novas linhagens daquelas endêmicas.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, alimento, lipase, protease, resistência.

ABSTRACT

Staphylococcus aureus is widespread in nature and is the bacteria most often found in skin infections, although it is able to colonize many organ in the human body. This pathogen can also to contaminate food and staphylococcal food poisoning is one of foodborne diseases more common around the world. This study aimed to isolate and characterize samples of *S. aureus* isolates from surface preparation of meat and vegetables in public hospitals located in the city of João Pessoa - Paraíba - Brazil, as the production of lipase, protease, antibiotic resistance profile and detection of *mecA*. Further, evaluation was made in the production of lipase strains of *S. aureus* isolated from animals (udder and nasal cavities), food (cottage cheese) and infected human wounds (hospital). It was observed lipase production in isolates from human wounds (43/50) animals (16/30), cheese (34/41), bench preparation of meat (24/24) and surface preparation plant (22 / 24). All isolates surface preparation of meat, vegetables and cheese produced protease precipitation with zones of diameters ranging from <0.5 to 4 mm. Among the 48 *S. aureus* isolates from food processing surfaces tested, 100% were sensitive to chloramphenicol, norfloxacin and methicillin. Twelve isolates were resistant to erythromycin and tetracycline, whereas all isolates were resistant to penicillin and streptomycin. The fragment corresponding t the *mecA* gene was not identified among isolates. The lipolytic and proteolytic activities, as well as antibiotic resistance (even those already with no therapeutic value) constitute important epidemiological and genetic markers may contribute to the characterization of samples environment or host-specific, and, if performed periodically to distinguish those new strains endemic.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, food, lipase, protease resistance.

LISTA DE TABELAS

METODOLOGIA

Tabela 1 - CIM interpretativo padrão para <i>Staphylococcus</i> spp.	31
---	-----------

ARTIGO 1

Table 1. Lipase activity of isolates of <i>Staphylococcus aureus</i> from different sources in Brazil	54
--	-----------

RESULTADOS A SEREM PUBLICADOS

Tabela 1. Atividade proteolítica de isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> de diferentes origens no Brasil	55
Tabela 2. Produção de proteases por <i>Staphylococcus aureus</i> .	55
Tabela 3 - Prevalência de cepas de <i>S. aureus</i> resistentes a antibióticos segundo CIM (µg/mL).	56
Tabela 4 – Padrões e fenótipos de resistência a antibióticos em isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> de superfícies de contato com alimentos.	57
Tabela 5 - Concentração Inibitória Mínima de antibióticos frente a isolados de <i>Staphylococcus aureus</i> de superfícies de contato com alimentos.	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Aw – Atividade de Água

BAB – Blood Agar Base

BHI – Caldo Infusão Cérebro Coração

CIM – Concentração Inibitória Mínima

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

E. coli – *Escherichia coli*

EPS - Exopolissacarídeos

HACCP – Sistema de Análise de Perigos e Controle de Pontos Críticos

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

NHANES – The National Health and Nutrition

OMS – Organização Mundial da Saúde

pH – Potencial Hidrogeniônico

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

SAMP – *Staphylococcus aureus* metalloproteinase

SASP – *Staphylococcus aureus* serine proteinase

SEs – Enterotoxinas Estafilocócicas

UAN – Unidade de Alimentação e Nutrição

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

VLDL – Very Low Density Lipoprotein

CLO – Clorafenicol

ERI – Eritromicina

TET – Tetraciclina

ESTREP – Estreptomicina

PEN – Penicilina

NOR – Norfloxacin

MET – Meticilina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 Unidades de alimentação e qualidade microbiológica de alimentos.....	16
2.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	18
2.3 Lipases microbianas	20
2.4 Proteases microbianas	22
2.5 Resistência bacteriana a antibióticos.....	24
3 METODOLOGIA.....	27
3.1 Delineamento amostral.....	27
3.1.1 Coleta de amostras	27
3.1.2 Isolamento e confirmação de colônias típicas	27
3.1.3 Testes bioquímicos.....	28
3.1.3.1 Coloração de Gram.....	28
3.1.3.2 Teste de utilização de manitol	28
3.1.3.3 Teste de catalase	29
3.1.3.4 Teste de coagulase	29
3.1.3.5 Teste de DNase	29
3.2 Detecção da atividade lipolítica	29
3.3 Detecção da atividade proteolítica	30
3.4 Perfil de resistência a antimicrobianos	30
3.4.1 Teste de sensibilidade à meticilina	31
3.5 Identificação do genótipo	31
3.5.1 Reação de PCR.....	32
REFERÊNCIAS.....	34
APÊNDICES	41
ARTIGO 1.....	42
RESULTADOS A SEREM PUBLICADOS.....	55

1 INTRODUÇÃO

Doenças veiculadas por alimentos continuam sendo um problema de saúde pública, tanto nos países desenvolvidos como aqueles que ainda estão em desenvolvimento, sendo que a segurança e o controle de alimentos são reconhecidos como fatores importantes na prevenção dessas doenças (CAO et al., 2012). Os serviços de alimentação devem fornecer além de refeições nutricionalmente equilibradas, refeições seguras quanto à qualidade higiênico-sanitária (ANDRADE; SILVA; BRABES, 2003; DE SETA et al., 2010), entretanto figuram como locais frequentemente envolvidos em surtos de doenças veiculadas por alimentos (DAGNEW et al., 2012).

Práticas inadequadas de higiene em plantas de processamento de alimentos podem resultar em contaminação por bactérias patogênicas como *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Pseudomonas* (GUTIÉRREZ et al., 2012). Dentre estas, *Staphylococcus aureus* é um dos patógenos mais importantes encontrados em alimentos, e geralmente é associado a intoxicações leve e de baixa mortalidade. Contudo, no ambiente hospitalar, em pessoas imunocomprometidas, pode também causar desde abscessos e furúnculos até infecções mais graves e potencialmente fatais, como sépsis e endocardite (AYCICEK; CAKIROGLU; STEVENSON, 2005; SAXENA, S.; GOMBER, C., 2010).

Acredita-se que a incidência de casos de intoxicação alimentar estafilocócica é superior ao que é relatado, e tal fato pode estar relacionado ao número de casos que não são reportados ao serviço de saúde por ser uma doença autolimitante cujos sintomas normalmente desaparecem em intervalo de 24 a 48 horas. Esta intoxicação é resultado da ingestão de alimentos contendo enterotoxinas estafilocócicas pré-formadas nos alimentos por cepas enterotoxigênicas de *S. aureus* (VÁZQUEZ-SÁNCHEZ et al., 2012).

A patogenicidade de *S. aureus* é causada por diversos fatores de virulência que incluem proteínas adesivas de superfície, enzimas intracelulares, e um núcleo de secretado proteico ou proteínas extracelulares, responsáveis pela colonização e infecção, dentre as quais podem ser citadas as enzimas catalase, termonuclease, coagulase e lipase (IFESAN et al., 2009; PEREIRA et al., 2009; SAXENA, S.; GOMBER, C., 2010). As lipases produzidas por *S. aureus* podem interferir na fagocitose de granulócitos humanos, todavia podem ter aplicações na indústria, como por exemplo, na fabricação de detergentes, produção de ingredientes alimentares e produtos farmacêuticos (ROSENSTEIN; GÖTZ, 2000; JAEGER; EGGERT, 2002). Por sua vez, as proteases também estão envolvidas na aquisição de

nutrientes para o crescimento e proliferação de bactérias através da degradação do tecido hospedeiro e diminuição das defesas imunológicas, desempenhando papel essencial no mecanismo de patogenicidade.

Outro fator importante que deve ser considerado em relação a *S. aureus* é a resistência a antibióticos. O uso generalizado destes compostos evoluiu o surgimento de cepas bacterianas resistentes a múltiplas drogas, sendo que a multirresistência tem sido encontrada em cepas obtidas tanto de ambiente hospitalar, como de alimentos de ambientes de produção de alimentos (AYDIN et al., 2011). Contaminação de alimentos pode ocorrer em virtude da presença de cepas resistentes em animais utilizados para alimentação humana, bem como em decorrência da falta de higiene nos processos de produção e distribuição de alimentos (SUNDSFJORD et al., 2004; AYDIN et al., 2011; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ et al., 2012).

Considerando estes aspectos, o presente trabalho teve como objetivo isolar e caracterizar amostras de *S. aureus* isolados de superfícies de preparo de carne e vegetais de hospitais públicos situados na cidade de João Pessoa – Paraíba – Brasil, em relação à produção de lipase, protease e resistência a antibióticos. Ainda, foi verificada a produção de lipase e protease em amostras de *S. aureus* isolados de úbere e fossas nasais de animais, queijo ricota e de feridas humanas infectadas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 UNIDADES DE ALIMENTAÇÃO E QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS

A Unidade de Alimentação e Nutrição (UAN) é uma unidade de trabalho ou órgão de uma empresa que desempenha atividades relacionadas à alimentação e nutrição. Pode ser considerado um subsistema desempenhando atividades para fins ou meios. No primeiro caso, podem ser citados os serviços ligados a hospitais e centros de saúde, que colaboram diretamente com o objetivo final da instituição, uma vez que os bens e serviços são destinados a prevenir, melhorar e/ou recuperar a população que atendem. No segundo caso, podem ser citados os serviços ligados à indústria ou quaisquer outras que reúnem pessoas por um período de tempo que justifique o fornecimento de refeições (TEIXEIRA et al., 2004).

Os serviços de alimentação e nutrição devem fornecer refeições nutricionalmente equilibradas e seguras quanto à qualidade higiênico-sanitária. Quando a UAN se encontra em ambiente hospitalar o cuidado no controle higiênico-sanitário deve ser aumentado, pois será responsável pela manutenção ou recuperação da saúde do indivíduo (DE SETA et al., 2010).

O número de surtos de doenças de origem alimentar tem emergido nas últimas décadas e comumente a ocorrência destes surtos tem sido relacionada a serviços de alimentação que servem a grande número de comensais. Dessa forma, a segurança alimentar tem sido a maior preocupação nestes serviços de alimentação, para reduzir a ocorrência de doenças transmitidas por alimentos, bem como evitar gastos com estas (SOSPEDRA et al., 2013).

Práticas inadequadas de higiene em plantas de processamento de alimentos podem resultar em contaminação por patógenos, sendo que os gêneros de bactérias mais comuns em superfícies de contato com alimentos são *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* e *Pseudomonas*. A presença destes microrganismos representa um risco para a saúde dos consumidores, visto que a sua eliminação destes ambientes torna-se muito difícil em decorrência da possibilidade de formação de biofilmes, onde podem sobreviver mesmo depois da limpeza e desinfecção do ambiente (GUTIÉRREZ et al., 2012). A adesão e formação de biofilme constitui-se um importante fator de virulência em *S. aureus*. Após as células se fixarem em uma determinada superfície, é iniciada a multiplicação e secreção de uma matriz consistente de substâncias poliméricas extracelulares (exopolissacarídeos - EPS) estabelecendo a formação do biofilme. As células bacterianas imersas na matriz do biofilme formado nas superfícies de contato com

alimentos apresentam-se mais resistentes à sanitização quando comparadas às células em suspensão (planctônicas) e, dessa forma, aumentam o risco de contaminação cruzada dos alimentos (GUTIÉRREZ et al., 2012).

Embora fungos, vírus e parasitas possam atuar como agentes etiológicos, bactérias são, sem dúvida, a principal causa de doenças de origem alimentar, incluindo *S. aureus*. Estudo prévio detectou a presença de *S. aureus* em uma frequência entre 10 a 20% das amostras de água, facas, alimentos servidos em bandejas, mãos e aventais dos manipuladores (YOON et al., 2008). *S. aureus* apresenta destacável sensibilidade à destruição por tratamento térmico e a quase todos os agentes de desinfecção. No entanto, a presença de *S. aureus* ou de suas enterotoxinas em alimentos processados ou em equipamentos e plantas de processamento são normalmente reconhecidas como indicação de higienização inadequada (DAGNEW et al., 2012).

O controle da contaminação por microrganismos deterioradores e patogênicos nos serviços de alimentação é difícil e complexo devido à grande variedade de alimentos preparados. Para evitar as doenças de origem alimentar, devem-se enfatizar as situações que visem à prevenção da contaminação por esses microrganismos e a garantia da segurança do consumidor (ALVES; UENO, 2010). Em estudo prévio, o treinamento de pessoal juntamente com a implantação do sistema HACCP (Sistema de Análise de Perigos e Controle de Pontos Críticos) foi eficaz na redução da contaminação global e detecção de marcadores de segurança bacteriológica em um restaurante universitário. Dessa forma, a formação do pessoal conjuntamente com a aplicação do HACCP contribuiu para a melhoria da qualidade microbiológica das refeições servidas e, conseqüentemente, da segurança dos alimentos produzidos (CENCI-GOGA et al., 2005).

Em estudo prévio foram analisadas 1213 amostras de saladas e 1208 amostras de molhos no Reino Unido, sendo constatado que 4,7% das amostras apresentaram-se insatisfatórios para consumo por conter *S. aureus* e *E. coli*. Apenas metade dos estabelecimentos (50,9%) onde foram coletadas as amostras satisfaziam os requisitos de HACCP, e 10% das amostras eram de instalações onde o pessoal não tinha recebido nenhuma formação em higiene de alimentos. Foram encontrados *S. aureus* em 2,7% das hortaliças e 1,0% dos molhos e isto pode ser um indicativo de uma incorreta higienização do ambiente e/ou manipulação inadequada do alimento (MELDRUM et al., 2009).

Nesse sentido, o controle higiênico-sanitário dos alimentos se constitui fator preponderante para prevenção das doenças de origem alimentar. Assim, como todos os componentes que fazem parte da produção, a citar ambientes de preparação, distribuição e

armazenamento, equipamentos, utensílios e manipuladores de alimentos, exigem cuidados especiais para que o alimento alcance o consumidor com condições higiênico-sanitárias satisfatórias (ALVES; UENO, 2010).

2.2 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são caracterizadas como cocos Gram-positivos e são geralmente encontradas em cadeias ou em cachos semelhantes a uvas. São bactérias mesófilas e aeróbias facultativas. Seu crescimento ótimo ocorre em torno de 35°C, entretanto algumas cepas podem crescer a temperaturas abaixo de 7°C. Em relação ao pH, *S. aureus* pode crescer entre 4,0 e 9,8, mas sua faixa ótima está entre 6,0 e 7,0. Tendo em consideração a Atividade de Água (A_w) 0,86, sendo o valor mínimo para crescimento (JAY, 2005). As espécies do gênero *Staphylococcus*, incluindo *S. aureus*, podem ser classificadas em cepas coagulase positiva e coagulase negativa. As cepas coagulase positiva são relacionadas à capacidade de causar intoxicação alimentar estafilocócica; embora, as cepas coagulase negativa não possam ser ignoradas, pois também têm sido relatadas como causadoras de intoxicações (MATTOS, 2005).

S. aureus é um patógeno oportunista que afeta tanto indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos, muitas vezes resultando em alta morbidade e complicações, que geram problemas para instituições de saúde (ONANUGA; AWHOWHO, 2012). A apresentação clínica das infecções causadas por *S. aureus* é muito variável. Infecções de pele são as mais frequentemente encontradas, entretanto esta bactéria é capaz de colonizar quase todos os órgãos do corpo humano. No ambiente hospitalar, é mais comum encontrar infecções estafilocócicas no pós-operatório, enquanto na comunidade, as infecções mais comuns são as de pele, que incluem: abscessos, impetigo bolhoso, foliculite, furunculose e fascíte necrosante. *S. aureus* também pode se disseminar, resultando em infecções graves e potencialmente fatais, incluindo sépsis, artrite séptica, osteomielite e endocardite. Toxinas produzidas por *S. aureus* podem causar doenças como síndrome do choque tóxico e gastroenterites (POPOWICZ et al., 2006; MORELL; BALKIN, 2010; SAXENA, S.; GOMBER, C., 2010).

O sucesso de *S. aureus* como patógeno humano é resultado da grande variedade de fatores virulência. A sua patogenicidade ocorre em decorrência da ação coordenada de aproximadamente quarenta fatores de virulência distintos, incluindo proteínas adesivas de superfície, as quais promovem a colonização do tecido hospedeiro, invasão e disseminação

bacteriana; enzimas intracelulares, que ajudam a superar o estresse oxidativo; e um núcleo de secretado protéico, responsável pela colonização e infecção (SAXENA, S.; GOMBER, C., 2010).

Por ter características ubiquitárias, a ocorrência de surtos é favorecida, já que *S. aureus* se encontra amplamente disseminado nos ambientes de circulação do ser humano, fazendo do homem seu principal reservatório por meio da colonização das vias nasais, garganta, pele e cabelos (SILVA et al., 2007), dessa forma, aqueles que manipulam alimentos podem ser uma importante fonte de contaminação alimentar (GUTIÉRREZ et al., 2012). Assim sendo, a transmissão de *S. aureus* aos alimentos se torna facilitada por meio de manipuladores assintomáticos ou não, animais portadores de mastite, especialmente o gado leiteiro (STAMFORD et al., 2006), e por equipamentos e plantas de processamento de trabalho, onde os alimentos podem ser contaminados originalmente durante ou após o processamento (FORSYTHE, 2002; GÜNDÜĞAN; DEVREN, 2010). Estas diferentes fontes de transmissão representam importante elo na cadeia epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimentos por este patógeno (FERNANDEZ et al., 2003).

Intoxicação alimentar estafilocócica é uma das doenças transmitidas por alimentos mais comuns e acredita-se que haja um sub-relato dessa doença devido a sua natureza autolimitante (NORMANNO et al., 2007; ZHANG; SHEN; DONG, 2013), tendo trabalhos que a cita como a terceira maior causa de envenenamento alimentar em todo o mundo (NOSTRO et al., 2004; BRAGA et al., 2005).

Normalmente, a intoxicação por *S. aureus* ocorre após a ingestão de alimentos contendo uma ou mais enterotoxinas estafilocócicas (SEs) por manuseio inadequado e posterior armazenamento a temperaturas também inadequadas. Quando isto acontece, células de *S. aureus* produzem uma ou mais SEs que podem provocar vômitos e diarreia em aproximadamente quatro horas (LAWRYNOWICZ-PACIOREK et al., 2007; LARKIN et al., 2009; ARGUDÍN et al., 2012).

Até o presente momento, vinte e três toxinas estafilocócicas distintas sorologicamente já foram identificadas (PERILLO et al., 2012). As enterotoxinas clássicas (SEA, SEB, SEC₁, SEC₂, SED, SEE) são classificadas de acordo com a sua antigenicidade e as enterotoxinas descritas recentemente são classificadas de acordo com seus genes codificadores (CHIANG et al., 2008). A enterotoxina estafilocócica A (SEA) é codificada por DNA fágico e é a mais frequentemente envolvida em intoxicações alimentares. A quantidade de SEA necessária para causar intoxicação é cerca de 100-200 ng (WALLIN-CARLQUIST et al., 2010). Alguns dos melhores parâmetros ambientais para produção de enterotoxinas são: temperatura de 35 a

40°C, pH 6,0 a 7,0 e A_w 0,99 (RAY, 2003). Além de funcionar como potentes toxinas gastrointestinais, enterotoxinas estafilocócicas (SEs) também atuam como superantígenos que estimulam a proliferação de células T não específicas, o que pode, potencialmente, causar choque tóxico (YAN et al., 2012).

Em estudo prévio, envolvendo cento e seis amostras de alimentos prontos para consumo de dois centros de alimentação (cafeteria e hospital), foi observado que aproximadamente 70% apresentaram-se contaminados com *S. aureus*. Dezesete amostras de bolo (73,9%), e vinte e oito (93,3%) amostras de carne, enquanto que apenas dez (45,4%) amostras de linguiça de frango apresentaram-se contaminadas por *S. aureus* (IFESAN et al., 2009). Gündğan e Devren (2010) encontraram uma alta prevalência de *S. aureus* em amostras de carne de vitela picada (60%), carcaça de frango (53,3%) e almôndegas (51,1%). Esse tipo de contaminação pode ser diretamente introduzido no alimento por parte dos manipuladores que apresentam lesões de pele ou falta de cuidados como tossir ou espirrar próximo ao alimento.

2.3 LIPASES MICROBIANAS

Lipases são enzimas que hidrolisam as emulsões de lipídios de cadeias longas. As lipases microbianas têm importância no metabolismo lipídico bacteriano, no envolvimento em processos patogênicos e são ferramentas valiosas na biotecnologia (XIE et al., 2012). A maioria das lipases conhecidas é produzida por *S. aureus* e *S. epidermidis* (ROSENSTEIN; GÖTZ, 2000), sendo a primeira atividade lipolítica em *S. aureus* descrita por Eijkman em 1901, porém somente na década de 1980 as lipases de *S. aureus* foram purificadas e algumas delas caracterizadas. Sabe-se que a atividade lipolítica de *S. aureus* aumenta na presença de Ca^{2+} , que o EDTA atua como um inibidor, o seu pH ótimo de atuação está em torno de 6, bem como que o Cálcio é necessário para a estabilização da estrutura tridimensional da lipase. (HASAN et al., 2009).

O uso comercial de lipase ocorre para a produção de detergentes, ingredientes alimentares e produtos farmacêuticos. As lipases são também utilizadas na produção de herbicidas, para controle de ervas daninhas. Também são utilizadas na fabricação de biodiesel, mas sua produção em escala industrial apresentou limitações em decorrência dos elevados custos de produção (JAEGER; EGGERT, 2002). Podem ser citadas outras aplicações industriais da lipase como a maturação acelerada de queijos, panificação, produção de óleos e gorduras estruturados, produção de margarina e síntese de aromas como, por

exemplo, o butirato de etila (aroma de morango) e acetato de isoamila (aroma de banana) (KOBLITZ, 2010).

A produção de lipases pode ser reprimida ou aumentada para melhoria da eficiência do processo sem, contudo, aumentar o custo de obtenção. Aspectos como pH, temperatura, idade e tamanho do inóculo da cepa produtora, agitação e tempo de incubação são importantes fatores de influência na produção de lipases em *S. aureus* (HASAN et al., 2009).

Funções normais granulocíticas em humanos são fundamentais para a defesa contra *S. aureus*. Lipases estafilocócicas interagem diretamente nos granulócitos alterando suas funções, bem como se apresentam ativas frente a substratos fisiológicos como VLDL do plasma humano e os ácidos graxos, exercendo efeito inibitório contra a proliferação de células T. Dessa forma, os efeitos combinados da lipase podem facilitar a disseminação de bactérias e facilitar o estabelecimento dos processos infecciosos (ROLLOF et al., 1988).

Estudo prévio isolou *Staphylococcus* produtores de lipase da pele da face de humanos, e detectaram temperatura ótima para a ação das lipases das cepas isoladas entre 31 e 32°C, as quais são compatíveis com a temperatura da pele de um adulto normal, sendo ainda observado que a lipase foi mais ativa em pH 8,5 e estável até um pH de 10. A lipase de *S. aureus* apresentou-se estável em um amplo pH, incluindo o valores de pH alcalino, o que sugere ainda o uso da enzima em produtos detergentes para remover a sujidade de gorduras (XIE et al., 2012).

Hu et al. (2012) induziram a perda da atividade enzimática em isolados de *S. aureus*, tornando-os mutantes não produtores de lipase, sendo verificado como resultado uma diminuição da formação de biofilme por parte das cepas mutantes. Além disso, foi observado o efeito da lipase na formação de abscessos em ratos, sendo detectadas infecções mais graves em ratos infectados com isolados de *S. aureus* que possuíam atividade lipolítica normal. Foram também encontradas elevadas cargas microbianas no rim, fígado e baço dos ratos infectados (10^4 - 10^7 UFC/g), apresentando cepas lipase positivas, em contraste com os ratos infectados com as cepas mutantes (lipase negativa). Dessa forma, os autores concluíram que a lipase é necessária para a patogênese do processo infeccioso, sendo a enzima envolvida na formação do abscesso e invasão dos órgãos.

Em estudo prévio foi avaliado a atividade lipolítica de 148 isolados de *S. aureus* obtidos de carne bovina (54), frango (48) e almôndegas (46), sendo observado que apenas poucos isolados obtidos de carne de frango (22,9%) apresentaram produção de lipase (GÜNDÖĞAN; DEVREN, 2010). Também em estudo com 46 cepas de bactérias lácticas isoladas de salames comerciais não foi observada atividade lipolítica (CARPINÉ et al., 2010).

Outro estudo com 76 isolados de *S. aureus* obtidos de diversos substratos (bolos, carnes, linguiça de frango e sobremesas lácteas) observou que a maioria dos isolados (81,1%) foi produtora de lipase (IFESAN, et al., 2009), sendo que os autores relataram que a lipase foi a enzima com maior frequência de produção nos isolados ensaiados, quando comparada as enzimas protease, lecitinase e hemolisina.

2.4 PROTEASES MICROBIANAS

As proteases, também chamadas de peptidases ou enzimas proteolíticas, constituem um grande grupo de enzimas que hidrolisam ligações peptídicas. As proteinases dividem-se em endopeptidases e exopeptidases de acordo com a posição da ligação peptídica a ser cindida na cadeia peptídica. Assim, as endopeptidases atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica, enquanto que as exopeptidases atuam no final das cadeias polipeptídicas (HUGHES et al., 2002; SABOTIC; KOS, 2012).

O interesse no estudo das proteinases produzidas por *S. aureus* é crescente, visto que tais enzimas podem atuar como fatores de virulência nas doenças causadas por esta bactéria, sendo observado que proteinases também podem ter atividade de modulação sobre outras proteínas secretadas por *S. aureus* (SHAW et al., 2004).

As proteases são indispensáveis à vida, pois estão envolvidas na aquisição de nutrientes para o crescimento e proliferação através da degradação do tecido hospedeiro e diminuição das defesas imunológicas, além de desempenharem um papel vital no mecanismo de defesa bacteriana (SABOTIC; KOS, 2012).

Apesar de existir um grande número de microrganismos que produzem proteases, o interesse é limitado àqueles que produzem enzimas com propriedades desejadas, as quais sejam não tóxicas e não patogênicas. Não existe um meio de cultura para produção de proteases exclusiva para cada tipo de microrganismo, de modo que as condições de cultura para a produção de proteases é diferente das condições para o crescimento celular. A detecção de protease pode ser realizada utilizando-se de diferentes substratos protéicos, podendo ser monitorado o desaparecimento do substrato (hidrólise) para a enzima e/ou o aparecimento dos produtos (peptídeos ou aminoácidos) (KASANA; SALWAN; YADAV, 2011).

A desvantagem das proteases é que algumas são importantes fatores de virulência em bactérias patogênicas. As proteínas estafilocócicas podem clivar e degradar um número importante de proteínas do hospedeiro, incluindo todas as classes de imunoglobulinas humanas de cadeia pesada e elastina (KARLSSON; ARVIDSON, 2002). A infecção

estafilocócica, com consequente disseminação das bactérias e absorção de nutrientes, ocorre quando há destruição do tecido do hospedeiro pela ação sinérgica de proteases extracelulares e outras enzimas e toxinas (SAXENA; GOMBER, 2010).

Staphylococcus produzem três principais proteinases extracelulares, as quais são: metaloproteinase (SAMP; aureolisina), serina proteinase (SASP; protease V8; glutamil endopeptidase) e cisteína proteinase (staphylopain). Enzimas proteolíticas contribuem para danos na pele, observados em dermatite atópica de fase aguda, sendo que o potencial proteolítico pode contribuir para os sintomas da doença (MIEDZOBRODZKI et al., 2002; KARLSSON; ARVIDSON, 2002). Proteases também constituem um importante grupo de enzimas relevantes para a indústria de alimentos e farmacêutica. Na maioria dos casos, as proteases são essenciais para modificação intencional das proteínas dos alimentos, assim a indústria oferece uma gama de aplicações, dentre elas: clarificação de cerveja, amaciamento da carne (tenderização enzimática), coagulação do leite, maturação acelerada de queijos e panificação. Juntas, as indústrias farmacêuticas e de alimentos vêm mostrando interesse em peptídios obtidos da hidrólise enzimática para uso como alimentos funcionais, sendo que vários peptídios bioativos podem ser obtidos pela hidrólise da caseína, glúten, soja e outras fontes protéicas (KOBELITZ, 2010; SABOTIC; KOS, 2012).

A proteólise nos embutidos tem sido atribuída principalmente às enzimas endógenas ou exógenas de origem microbiana, as quais são influenciadas por algumas variáveis como a formulação do produto, condições de processo e a cultura *starter* (de arranque) utilizada (HUGHES et al., 2002). As peptidases e proteases bacterianas contribuem de modo significativo para a degradação inicial das proteínas e a consequente liberação dos aminoácidos (MARTIN et al., 2007). Bactérias psicotróficas proteolíticas são as principais responsáveis pela deterioração de carne e produtos derivados devido a sua capacidade de produzir proteases (GÜNDÖGAN; DEVREN, 2010).

Em estudo prévio foram isoladas sessenta e sete cepas de *S. aureus* de lesões de pele e avaliado o potencial de digestão da caseína, de modo que foi verificada que a maioria (> 60%) das cepas apresentava potencial proteolítico (MIEDZOBRODZKI et al., 2002). Os pesquisadores também relataram que em 24 horas, dez cepas não apresentaram atividade proteolítica, entretanto após 72 horas apenas dois isolados não apresentaram características de atividade proteolítica quando observada a digestão do leite desnatado. Karlsson e Arvidson (2002) analisaram os genes *agr* (ativador) e *sarA* (repressor) em cepas de *S. aureus* e verificaram que a produção da enzima é determinada pelo nível de expressão de *sarA*. Foi

observado também que a inativação de *sarA* resultou em transcrição aumentada dos genes da protease, enquanto que a superexpressão desse gene diminuiu a produção de protease.

Em outro estudo foram analisados cento e quarenta e oito cepas de *S. aureus* obtidos de amostras de carne (n:=54), frango (n:=48) e almôndegas (n:=46) e foi observada uma alta prevalência dessas cepas com atividade proteolítica nas amostras de carne (96,2%), frango (75%) e almôndegas (89,1%) (GÜNDĞAN; DEVREN, 2010). Carpiné et al. (2010) observaram uma elevada frequência de atividade proteolítica (80%) em cepas de bactérias lácticas obtidas de salame. Por sua vez, Ifesan et al. (2009) verificaram atividade proteolítica em menor frequência (35,8%) em isolados de *S. aureus* obtidos de produtos prontos para o consumo.

2.5 RESISTÊNCIA BACTERIANA A ANTIBIÓTICOS

A resistência bacteriana a antibióticos está se tornando um dos principais problemas de saúde em todo o mundo (NIWA et al., 2012). Na última década há um acúmulo de evidências ligando os níveis de antibióticos prescritos à resistência antimicrobiana (CHUNG et al., 2013).

A resistência à antimicrobiana pode ser intrínseca (quando faz parte das características naturais, fenotípicas do microrganismo) ou adquirida [ocorre quando há o aparecimento de resistência em uma espécie bacteriana anteriormente sensível à droga em questão, e esta nova propriedade é resultado de alterações estruturais ou bioquímicas da célula bacteriana, determinada por alterações genéticas cromossômicas ou extra-cromossômicas (plasmídios)]. A resistência antimicrobiana pode se manifestar como uma resistência clínica ao tratamento com agentes antimicrobianos, uma resistência fenotípica demonstrada pelo aumento na concentração mínima do agente antimicrobiano necessário para inibir o crescimento de um microrganismo, ou uma resistência genotípica, onde os genes específicos de resistência aos antimicrobianos são demonstráveis através de técnicas moleculares (BHATTACHARYA, 2013).

S. aureus é um patógeno capaz de ultrapassar barreiras do sistema de defesa do hospedeiro, uma vez que possui um amplo espectro de fatores de virulência, o que torna difícil a prevenção e tratamento das infecções estafilocócicas (KURLENDA; GRINHOLC, 2012).

A meticilina foi descoberta na década de 1960 e anos depois o primeiro caso de *S. aureus* resistente a meticilina (MRSA) já havia se propagado por vários países

(APPELBAUM, 2007). A resistência à meticilina em *S. aureus* é mediada pelo gene *mecA* que codifica uma proteína de ligação à penicilina com baixa afinidade por β -lactâmicos. Este gene reside em um elemento genético móvel (SCCmec) (WANG et al., 2012). Até a década de 1990, *S. aureus* resistente à meticilina era apenas associado a infecções hospitalares, depois dos anos de 1990 a presença de MRSA passou a ser detectada em infecções tanto no meio hospitalar como na comunidade (YUCEL; CITAK; BAYHÜN, 2011). Em estudo recente foi encontrado uma prevalência de 18,4% de MRSA de um total de 79 cepas isoladas de pacientes em um hospital (ZRIOUIL; BEKKALI; ZEROUALI, 2012).

A infecção estafilocócica pode se dar de pessoa para pessoa, no ambiente ou através de alimentos (LEE, 2003). Existem dados para diferentes países sobre infecções de *S. aureus* ou MRSA, entretanto nos países em desenvolvimento apenas alguns relatórios estão disponíveis (ZRIOUIL; BEKKALI; ZEROUALI, 2012). Poucos casos de MRSA na produção de alimentos são relatos. Kitai et al (2005) isolaram *S. aureus* de carne de frango crua e encontraram duas cepas de MRSA de biovar humano, sugerindo que os alimentos tinham sido contaminados por manipuladores de alimentos. Animais comumente utilizados na alimentação, como suínos, gado, caprinos, podem ser portadores de MRSA na cavidade nasal ou sobre a pele. Os alimentos derivados a partir desses animais como a carne e o leite, podem vir a serem contaminados durante o abate, transporte e processamento (WANG et al., 2012).

Resistência a antibióticos provavelmente nunca poderá ser totalmente evitada, visto que muitos microrganismos carregam mecanismos de resistência intrínseca, mesmo com uso adequado de agentes antimicrobianos (LARSON, 2007; LEE, 2003; MORELL; BALKIN, 2010; SANTOS et al., 2007; SILVEIRA et al., 2006). O uso de antibióticos e a ingestão de patógenos podem levar a uma interação com bactérias da flora normal do intestino humano, pois pode haver uma transferência direta de bactérias resistentes ao corpo humano, como também uma transferência indireta de genes de resistência a drogas de bactérias da flora normal para as bactérias ingeridas (SØRUM; L'ABÉE-LUND, 2002). O amplo uso de antibióticos no cultivo de vegetais e o uso de água contaminada por fertilizantes selecionam bactérias resistentes a antibióticos que podem colonizar os vegetais. Dessa forma, pode haver a propagação dessa resistência para bactérias do solo através da resistência horizontal e levar a proliferação da resistência a antibióticos em animais ou humanos (HASSAN et al., 2011).

Segundo Kuehnert et al. (2006), estima-se que a prevalência de pessoas colonizadas por *S. aureus* nos EUA seja de aproximadamente 32,4%. Com base em amostras representativas do *The National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES), um terço da população dos EUA, entre 2000-2001, apresentaram-se colonizadas por *S. aureus*;

sendo a colonização por (MRSA) de apenas 0,8%, sugerindo uma baixa colonização na população não hospitalar.

Hassan et al. (2011) isolaram 128 cepas de bactérias de doze diferentes vegetais frescos, destas oito (11,8%) eram *S. aureus*. Os autores relataram que 76,5% das cepas isoladas mostraram-se resistentes ao menos a um antibiótico, sendo que as cepas de *S. aureus* foram resistentes a ampicilina, tetraciclina, ciprofloxacina e cefoxitina.

Algumas cepas isoladas de gado no Brasil foram resistentes à penicilina e estreptomicina, que são antibióticos amplamente utilizados no controle da mastite bovina, e tetraciclina que é frequentemente utilizada no controle de anaplasmoses. Dessa forma, a frequência de recuperação de cepas resistentes a cada antibiótico, bem como os padrões e fenótipos de resistência, aparentemente refletem as pressões ambientais locais (PEREIRA; SIQUEIRA-JÚNIOR, 1995).

Para detecção de resistência à meticilina, é preferível usar a oxacilina por causa de sua estabilidade, confiabilidade e padronização de métodos de difusão em disco (CHAMBERS, 1988). Estudo envolvendo 154 cepas isoladas de carne (16), produtos derivados de carne (8), leite cru (64), derivados de leite (54), produtos de padaria (10) e alimentos prontos para consumo (2), detectou que nenhuma cepa foi resistente à vancomicina e oxacilina, contudo, 28 foram resistentes à eritromicina (18,2%), 110 à penicilina G (71,4%), 24 à tetraciclina (15,6%), 12 ao clorafenicol (7,8%) e 13 à clindamicina (8,4%), sendo que a maior proporção de cepas resistentes foi encontrada no leite cru e nos derivados de leite (AYDIN et al., 2011).

Outro estudo envolvendo 584 cepas de *S. aureus*, sendo 300 cepas de origem clínicas e 284 cepas de alimentos, foi detectada resistência para clindamicina em 20% e 8,1%; para penicilina em 98,3% e 92%; e para tetraciclina em 56,3% e 9,5% das cepas de origem clínica e de alimentos, respectivamente (YUCEL; CITAK; BAYHÜN, 2011).

3 METODOLOGIA

3.1 DELINEAMENTO AMOSTRAL

3.1.1 Coleta de amostras

Um conjunto de quarenta e oito amostras de superfícies de contato com alimentos, dentre as quais vinte e quatro foram de bancadas de preparo de vegetais e vinte e quatro de bancada de preparo de carne foram isolados de duas Unidades de Alimentação e Nutrição hospitalares de João Pessoa – Paraíba – Brasil.

As coletas nas superfícies de preparo de alimentos e equipamentos foram realizadas no período da manhã, antes e após o uso pelos manipuladores. Foram utilizados *swabs* (dois *swabs* por superfície) estéreis, umidificados em tubos de ensaio contendo caldo BHI (Caldo Infusão Cérebro Coração) com NaCl PA (cloreto de sódio) a 7,5%, sendo friccionados em dois pontos distintos e delimitados de cada superfície ou equipamento. Após esta etapa, as porções finais dos *swabs* que entraram em contato com as superfícies e equipamentos foram assepticamente cortados, com bisturi estéril, e acondicionados em tubos de ensaio contendo 10 mL de caldo BHI com cloreto de sódio a 7,5%. Após a coleta, o sistema foi transportado em recipientes isotérmicos até o local de realização das análises microbiológicas, onde foram incubados em estufa a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

Foram também analisadas amostras obtidas do banco de cepas do Laboratório de Genética de Microrganismos da Universidade Federal da Paraíba – João Pessoa – Brasil. Isolados de feridas de humanos hospitalizados em um Hospital Universitário Público da cidade de João Pessoa – Paraíba – Brasil (50 isolados); de animais (úbere: 30 isolados; fossas nasais: 13 isolados) de uma fazenda localizada na Cidade de Patos – Paraíba – Brasil; e de queijos ricota bovinos de diferentes marcas comercializadas em supermercados da cidade de João Pessoa – Paraíba – Brasil (41 isolados).

3.1.2 Isolamento e confirmação de colônias típicas

Após 24 horas de incubação das amostras em BHI adicionado de NaCl a 37°C , foi realizado o plaqueamento por esgotamento (com alça bacteriológica) em Ágar Baird-Parker adicionado de telurito de potássio a 1% e emulsão de gema de ovo (50 mL/ 1000 mL de ágar) que constitui-se em um meio seletivo diferencial para o gênero *Staphylococcus*. Foram

isoladas dez colônias características do gênero *Staphylococcus* com as seguintes características: colônias circulares, pretas ou cinza escuras, com 2-3 mm de diâmetro (em placas cheias são menores, com cerca de 1,5 mm), lisas, convexas, com bordas perfeitas, apresentando massa de células esbranquiçada nas bordas, rodeadas por uma zona opaca e/ou halo transparente se estendendo para além da zona opaca). As colônias típicas foram isoladas em ágar BHI (37°C), sendo em seguida submetidas aos testes de identificação de *S. aureus* através de provas bioquímicas. Cada colônia característica de *S. aureus*, com o auxílio de uma alça bacteriológica, foi transferida para placas de Petri contendo Ágar BHI salgado a 7,5% (Ágar Infusão Cérebro Coração adicionado de cloreto de sódio PA); emulsionando-se bem a massa de células. Foram friccionadas cinco colônias devidamente numeradas em cada placa, em seguida, foram incubadas a 37°C por 24 horas. As culturas em Ágar BHI foram reservadas sob temperatura de refrigeração para testes adicionais de coloração de Gram, manitol, catalase, coagulase e DNase, para os quais *S. aureus* apresenta-se positivo ou negativo (Adaptado de SILVA, 2007).

3.1.3 Testes bioquímicos

3.1.3.1 Coloração de Gram

Para confirmação das cepas de *Staphylococcus aureus* foi aplicada a metodologia de coloração de Gram seguindo metodologia descrita por Bier (1985) e que consiste nos seguintes procedimentos: esfregaço da cultura em uma lâmina, seguido de fixação do esfregaço ao ar em superfície plana e seca, coloração com violeta cristal por cerca de um (1) minuto, seguido de coloração com solução de lugol por um minuto, a lâmina foi em seguida descorada com álcool a 95°GL até o descorante fluir límpido, após este processo foi utilizada a solução de fucsina básica por 30 segundos seguido de lavagem com água destilada e secagem ao ar em superfície seca e plana. Após este procedimento as lâminas foram examinadas ao microscópio.

3.1.3.2 Teste de utilização de manitol

A partir das placas de Ágar BHI incubadas por 24 horas, foram transferidas, utilizando-se alça bacteriológica, parte dos inóculos das culturas para uma placa contendo Ágar Manitol Salgado, seguindo a mesma metodologia empregada no item 3.1.3, com cinco

colônias por placa, em seguida, foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Após este período foi observada a ocorrência de viragem ácida amarela com halo de utilização de manitol caracterizando teste positivo.

3.1.3.3 *Teste de catalase*

A partir das placas de Ágar BHI, foram emulsionadas uma alçada de cada cultura, obtidas do BHI e confirmadas em Manitol, em uma alíquota (cerca de 2,5 ml) de peróxido de hidrogênio a 3% (água oxigenada), em um tubo de ensaio, observando-se a ocorrência “borbulhamento” imediato (teste positivo).

3.1.3.4 *Teste de coagulase*

Foi adicionado em um tubo estéril de hemólise 0,5 mL de Coagu-Plasma-EDTA (plasma de coelho com EDTA). Em seguida, com o auxílio de uma alça de platina (bacteriológica), flambada e esfriada, foi transferida, para o tubo contendo o Coagu-Plasma, uma “alçada” da cultura de *Staphylococcus aureus* obtida em BHI, dissolvendo-se bem o crescimento coletado (atritando a ponta da alça nas paredes do tubo). Os tubos foram incubados a 37°C ± 1°C durante quatro horas (ou até no máximo de 24 horas) observando-se a provável formação de coágulo a cada 30 minutos. Ao final houve a coagulação completa (coagulação 4+) de todo o conteúdo do tubo, formando um coágulo firme que não se rompe quando o tubo é virado para baixo. Foram considerados como reações positivas, aqueles tubos cujas cepas coagularem 4+, sendo então confirmada a presença de *S. aureus*.

3.1.3.5 *Teste de DNase*

Para confirmação dos isolados de *S. aureus* foi feito o teste de DNase, utilizando o Agar DNase com azul de toluidina (Himedia). O meio foi dissolvido em água destilada e autoclavado a 121°C por 15 minutos. Após esfriado a 45°C foi colocados em placas de Petri e os isolados foram semeados e incubados posteriormente a 37°C por 24 horas. Foram confirmadas como *S. aureus* aquelas cepas que apresentaram mudança de cor do azul para púrpura rosado ao redor do crescimento.

3.2 DETECÇÃO DA ATIVIDADE LIPOLÍTICA

Para detecção da atividade lipolítica dos isolados de *S. aureus* foi utilizado o ágar Tweem-cálcio composto de peptona, 10g/1000 mL; cloreto de sódio, 5g/1000 mL; cloreto de cálcio, 0,1g/1000 mL; Agar, 15g/1000 mL; Tweem 80, 10ml/1000 mL (autoclavado separadamente e adicionado no meio a 45°C com rigorosa agitação) (pH 7,4) (SIERRA, 1957). As amostras foram inicialmente semeadas em Blood Agar Base (BAB) e incubadas a 37°C, por 24 horas. Após o crescimento microbiano, as colônias foram incubadas (100 µL; técnica de esgotamento) em ágar Tweem-cálcio (por placa) a 37°C, por 48 horas, e ao término do período de incubação foi observada a formação do halo com o precipitado formado pelos sais de cálcio, pois o Tweem 80 é um éster do ácido oléico, substrato para lipase, e ao redor de colônias de isolados bacterianos com atividade lipolítica, torna-se visível a formação de um halo constituído de cristais de sais de cálcio do ácido graxo liberado pela lipólise mediada pela lipase.

3.3 DETECÇÃO DA ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

Para detecção da atividade proteolítica as amostras foram inicialmente semeadas em Blood Agar Base (BAB) e incubadas a 37°C, por 24 horas. Após o crescimento microbiano, as colônias foram incubadas em Blood Agar Base (BAB) adicionado de 10% de leite desnatado sem lactose (Piracanjuba-Brasil) para avaliação dos isolados de *S. aureus*. O BAB e o leite foram autoclavados em frascos separados a 121°C durante 15 minutos e só depois foram homogeneizados e plaqueados para posterior incubação a 37°C por 48 horas. Foi utilizado o leite desnatado sem lactose para evitar falsos positivos (MORRIS; EVANS; MARCHESI, 2012). A leitura do ensaio foi feita considerando como positivas as linhagens que apresentaram um halo em volta do crescimento.

3.4 PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Os valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de cada antibiótico foram determinadas em caldo nutritivo (BHI) através da técnica de microdiluição, usando uma suspensão de *c.a.* 10^5 ufc/mL e com concentrações variando de 256 mg/mL a 0,25 mg/mL para clorafenicol, eritromicina, estreptomicina, mercúrio; 128 mg/mL a 0,125mg/mL para tetraciclina, penicilina e norfloxacin; 512 mg/mL a 0,5 mg/mL para cádmio; e 2048 mg/mL a 2 mg/mL para arsênio (diluições seriadas) (SMITH et al., 2005). A CIM foi definida como a

menor concentração que inibiu completamente o crescimento bacteriano. Para a melhor visualização do crescimento bacteriano após 24 horas foi utilizada uma solução (0,01%) do corante resazurina (Sigma-Aldrich).

Quadro 1. Padrão interpretativo para CIM de antibióticos frente a *Staphylococcus* spp.

Antibiótico	Resistente	Sensível	Referência
Clorafenicol	≥ 32	≤ 8	(CLSI, 2011)
Eritromicina	≥ 8	$\leq 0,5$	(CLSI, 2011)
Estreptomicina	≥ 16	-	(GILLESPIE et al., 1990)
Minociclina	≥ 16	≤ 4	(CLSI, 2011)
Norfloxacin	≥ 16	≤ 4	(CLSI, 2011)
Penicilina	$\geq 0,25$	$\leq 0,12$	(CLSI, 2011)
Tetraciclina	≥ 16	≤ 4	(CLSI, 2011)

3.4.1 Teste de sensibilidade à meticilina

O teste de sensibilidade à meticilina foi realizado pela técnica de difusão em disco. As colônias foram inicialmente semeadas em ágar Trypticase de soja com extrato de levedura (TSAYE) e incubadas a 37°C por 24 horas. A quantidade de células inoculadas no Agar Mueller Hinton foi ajustada com a diluição de 2 a 3 colônias em 2 mL de solução salina a 0,85% e a turbidez ajustada para a concentração de 10^8 UFC/mL que corresponde ao tubo 0,5 da escala de Mc-Farland (CLSI, 2012).

A suspensão bacteriana foi espalhada em toda a extensão na superfície do ágar Mueller-Hinton com um *swab* estéril e os isolados confrontados na placa com meticilina. A cepa *S. aureus* ATCC (25923) foi utilizada como controle positivo.

Os discos de antibióticos foram retirados da geladeira 30 minutos antes do uso e distribuídos nas placas cinco minutos após ser feita a inoculação com as cepas bacterianas testadas. As zonas de inibição em torno de cada disco foram aferidas com paquímetro digital após 18-24 horas de incubação a 37°C, sendo que cada isolado foi classificado individualmente como sensível, de resistência intermediária e resistente pela avaliação do diâmetro do halo de inibição do crescimento segundo CLSI (2011).

3.5 IDENTIFICAÇÃO DO GENÓTIPO

O DNA dos isolados de *Staphylococcus aureus* foi extraído pelo método de Fenol: Clorofórmio: Álcool isoamílico, descrito por Fritsch, Maniatis e Sambrook (1989). Foi retirada uma alíquota de 1,4 mL da cultura bacteriana em caldo TSB incubado a 37°C por 18 a 24 horas e centrifugado sob refrigeração por 15 minutos a 4°C e 14000 rpm. Após centrifugar o caldo em centrífuga refrigerada por 15 minutos as células bacterianas foram diluídas em 500 µL de tampão TE 10:1 juntamente com 10 µL lisozima (10mg/mL) e 10 µL de proteinase K (5mg/mL) foram incubadas *overnight* a 60°C em estufa de agitação orbital para que ocorra a lise celular. Posteriormente foi acrescentada a mistura 100 µL de tampão STE (2,5% de SDS; 10mM Tris-HCl; pH 8,0; 0,25M EDTA), incubada por 15 minutos a 60°C, 5 minutos na temperatura ambiente e 5 minutos no gelo. Após neutralizar a reação com acetato de amônia a 7,5M, as amostras foram mantidas no gelo por 15 minutos e centrifugadas por 5 minutos. O DNA foi extraído pela mistura de 700 µL do sobrenadante com volume igual de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (invitrogen). Após centrifugar a mistura por 5 minutos a 14000 rpm, em centrífuga refrigerada, um volume de 400 µL do sobrenadante foi transferido para outro tubo com 420 µL de etanol absoluto e armazenado em freezer a – 20°C. Decorrido 24 horas de precipitação, a solução foi centrifugada novamente, o sobrenadante descartado e o DNA ressuspendido em 30 µL de água deionizada autoclavada.

A leitura da qualidade e quantidade de DNA foi realizada no espectrofotômetro (epENDORF).

3.5.1 Reação de PCR

As reações de PCR foram preparadas em um volume final de 25 µL e tampão 1x concentrado a partir da mistura de 200 µM de DNTP, 2,5 mM de MgCl₂, 0,8 µM do primer MEC A1 (5'-GTAGAAATGACTGAACGTCCGATAA-3'), 0,8 µM do primer MEC A2 (3'-CCAATTCCACATTGTTTCGGTCTAAA-5'), 2U de taq polimerase (Invitrogen) e 100 ng de DNA.

A escolha do primer foi realizada conforme Jonas et al. (1999) com modificações, e os amplificadores obtidos em termociclador TC -3000 (Techne) de acordo com as condições de PCR. O aparelho obedeceu a uma programação de desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos seguidos por 30 ciclos com desnaturação de 94° por 30 segundos, 56°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Uma extensão final de 72°C por 10 minutos finalizou a amplificação.

A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 2%, pela mistura de 10 μ L do amplificado com 2 μ L de tampão de corrida Azul de Bromofenol. Os géis foram visualizados em transiluminador, após coloração em uma solução de Gel Red (Uniscience) submetida à agitação por 30 minutos.

REFERÊNCIAS

- ALVES, M. G.; UENO, M. Restaurantes self-service: segurança e qualidade sanitária dos alimentos servidos. **Revista de Nutrição**. v. 23, n. 4, p. 573-580, 2010.
- ANDRADE, N. J.; SILVA, R. M. M.; BRABES, K. C. S. Avaliação das condições microbiológicas em unidades de alimentação e nutrição. **Ciência e Agrotecnologia**. v. 27, n. 3, p. 590-596, 2003.
- APPELBAUM, P. C. Microbiology of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **Clinical Infectious Diseases**. v. 45, n. 3, p. 165-170, 2007.
- ARGUDÍN, M. A.; MENDOZA, M. C.; GONZÁLEZ-HEVIA, M. A.; BANCES, M.; GUERRA, B.; RODICIO, M. R. Genotypes, exotoxin gene content, and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* strains recovered from foods and food handlers. **Applied Environmental Microbiology**. v. 78, n. 8, p. 2930-2935, 2012.
- AYCICEK, H.; CAKIROGLU, S.; STEVENSON, T. H. Incidence of *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat meals from military cafeterias in Ankara, Turkey. **Food Control**. v. 16, n. 6, p. 531-534, 2005.
- AYDIN, A.; MURATOGLU, K.; SUDAGIDAN, M.; BOSTAN, K.; OKUKLU, B.; HARSA, S. Prevalence and antibiotic resistance of foodborne *Staphylococcus aureus* isolates in Turkey. **Foodborne Pathogens and Disease**. v. 8, n. 1, p. 63-69, 2011.
- BHATTACHARYA, S. Early diagnosis of resistant pathogens. How can it improve antimicrobial treatment? **Virulence**. v. 4, n. 2, p. 1-13, 2013.
- BIER, O. G. **Microbiologia e imunologia**. 24.ed. São Paulo: Melhoramentos, 1985. 1234p.
- BRAGA, S. S.; VIK, A.; FRIEDMAN, L.; KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited. **TRENDS in Microbiology**. v. 13, n. 1, p. 20-26, 2005.
- CAO, R.; ZEAKI, N.; WALLIN-CARLQUIST, N.; SKANDAMIS, P. N.; SCHELIN, J.; RÅDSTRÖM, P. Elevated enterotoxin A expression and formation in *Staphylococcus aureus* and its association with prophage induction. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 78, n. 14, p. 4942-4948, 2012.
- CARPINÉ, D.; DAGOSTIN, J. L. A.; SANTA, H. S. D.; ALVAREZ, D. C.; TERRA, N. N.; SANTA, O. R. D. Atividade proteolítica e lipolítica de bactérias lácticas isoladas de salames artesanais. **Ambiência**. v. 6, n. 1, p. 125-132, 2010.
- CENCI-GOGA, B. T.; ORTENZI, R.; BARTOCCI, E.; CODEGA DE OLIVEIRA A.; CLEMENTI, F.; VIZZANI, A. Effect of the implementation of HACCP on the microbiological quality of meals at a university restaurant. **Foodborne Pathogens and Disease**. v. 2, n. 2, p. 138-145, 2005.
- CHAMBERS, H. F. Methicillin-resistant staphylococci. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 1, n. 2, p. 173-186, 1988.

CHIANG, Y. C.; LIAO, W. W.; FAN, C. M.; PAI, W. Y.; CHIOU, C. S.; TSEN, H. Y. PCR detection of Staphylococcal enterotoxins (SEs) N, O, P, Q, R, U, and survey of SE types in *Staphylococcus aureus* isolates from food-poisoning cases in Taiwan. **International Journal of Food Microbiology**. v. 121, n. 1, p. 66–73, 2008.

CHUNG, G. W.; WU, J. E.; YEO, C. L.; CHAN, D.; HSU, L. Y. Antimicrobial stewardship: a review of prospective audit and feedback systems and an objective evaluation of outcomes. **Virulence**. v. 4, n. 2, p. 1-7, 2013.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; seventeenth informational supplement. v. 31, n.1, 2011.

CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard—ninth edition. **CLSI document M07-A9**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

DAGNEW, M.; TIRUNEH, M.; MOGES, F.; TEKESTE, Z. Survey of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* and intestinal parasites among food handlers working at Gondar University, Northwest Ethiopia. **BMC Public Health**. v. 12, n. 837, p. 1-7, 2012.

DE SETA, M. H.; O'DWYER, G.; HENRIQUES, P.; SALES, G. L. P. Cuidado nutricional em hospitais públicos de quatro estados brasileiros: contribuições da avaliação em saúde à vigilância sanitária de serviços. **Ciência & Saúde Coletiva**. v. 15, n. 3, p. 3413-3422, 2010.

FERNANDEZ, A. T.; FORTES, M. L. M.; ALEXANDRE, M. H. S.; BASTOS, C. S. P.; VIANA, E. P. L. Ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos na cidade do Rio de Janeiro. **Higiene Alimentar**, v. 17, n. 111, p. 58-63, 2003.

FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T.; SAMBROOK, J. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 235 p.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

GILLESPIE, M. T.; LYON, B. R.; SKURRAY, R. A. Typing of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* by antibiotic resistance phenotypes. **Journal of Medical Microbiology**. v. 31, n. 1, p. 57-64, 1990.

GÜNDĞAN, N.; DEVREN, A. Protease and lipase activity of *Staphylococcus aureus* obtained from meat, chicken and meatball samples. **Gazi University Journal of Science**. v. 23, n. 4, p. 381-384, 2010.

GUTIÉRREZ, D.; DELGADO, S.; VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; MARTÍNEZ, B.; CABO, M. L.; RODRÍGUEZ, A.; HERRERA, J. J.; GARCÍA, P. Incidence of *Staphylococcus aureus* and analysis of associated bacterial communities on food industry surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 78, n. 24, p. 8547-8554, 2012.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**. v. 27, n. 6, p. 782-798, 2009.

- HASSAN, S. A.; ALTALHI, A. D.; GHERBAWY, Y. A.; EL-DEEB, B. A. Bacterial load of fresh vegetables and their resistance to the currently used antibiotics in Saudi Arabia. **Foodborne Pathogens and Disease**. v. 8, n. 9, p. 1011-1018, 2011.
- HU, C; XIONG, N.; ZHANG, Y.; RAYNER, S.; CHEN, S. Functional characterization of lipase in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 419, n. 4, p. 617-620, 2012.
- HUGHES, M. C.; KERRY, J. P.; ARENDT, E. K.; KENNEALLY, P. M., MCSWEENEY, P. L. H.; O'NEIL, E. E. Characterization of proteolysis during the ripening of semidry fermented sausages. **Meat Science**. v. 62, n. 2, p. 205-216, 2002.
- IFESAN, B. O. T.; HAMTASIN, C.; MAHABUSARAKAM, W.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Inhibitory effect of *Eleutherine Americana* merr. extract on *Staphylococcus aureus* isolated from food. **Journal of Food Science**. v. 74, n. 1, p. 31-36, 2009.
- JAEGER, K.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 13, n. 4, p. 390-397, 2002.
- JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2005.
- JONAS, D.; GRUNDMANN, H.; HARTUNG, D.; DASCHNER, F. D.; TOWNER. Evaluation of the *mecA* *femB* duplex polymerase chain reaction for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Clinical Microbiology Infections Diseases**. v. 18, n. 9, p. 643-647, 1999.
- KARLSSON, A.; ARVIDSON, S. Variation in extracellular protease production among clinical isolates of *Staphylococcus aureus* due to different levels of expression of the protease repressor *sarA*. **Infection and Immunity**. v. 70, n. 8, p. 4239-4246, 2002.
- KASANA, R. C.; SALWAN, R. YADAV, K. Microbial proteases: Detection, production, and genetic improvement. **Critical Reviews in Microbiology**. v. 37, n. 3, p. 262-276, 2011.
- KITAI, S.; SHIMIZU, A.; KAWANO, J.; SATO, E.; NAKANO, C.; UJI, T.; KITAGAWA, H. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from retail raw chicken meat in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**. v. 67, n. 1, p. 107-110, 2005.
- KOBLITZ, M. G. B. **Bioquímica de Alimentos – Teoria e Aplicações Práticas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- KUEHNERT, M. J.; KRUSZON-MORAN, D.; HILL, H. A.; MCQUILLAN, G.; MCALLISTER, S. K.; FOSHEIM, G.; MCDOUGAL, L. K.; CHAITRAM, J.; JENSEN, B.; FRIDKIN, S. K.; KILLGORE, G.; TENOVER, F. C. Prevalence of *Staphylococcus aureus* nasal colonization in the United States, 2001–2002. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 193, n. 2, p. 172-179, 2006.
- KURLEND, J.; GRINHOLC, M. Alternative therapies in *Staphylococcus aureus* diseases. **Acta Biochimica Polonica**. v. 59, n. 2, p. 171-184, 2012.

LARKIN, E. A.; CARMAN, R. J.; KRAKAUER, T.; STILES, B. G. *Staphylococcus aureus*: The toxic presence of a pathogen extraordinaire. **Current Medicinal Chemistry**. v. 16, n. 30, p. 4003-4019, 2009.

LARSON, E. Community Factors in the development of antibiotic resistance. **Annual Review of Public Health**. v. 28, n. 1, p. 435-447, 2007.

LAWRYNOWICZ-PACIOREK, M.; KOCHMAN, M.; PIEKARSKA, K.; GROCHOWSKA, A.; WINDYGA, B. The distribution of enterotoxin and enterotoxin-like genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from nasal carriers and food samples. **Internacional Journal of Food Microbiol.** v. 117, n. 3, p. 319-323, 2007.

LEE, J. H. Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 69, n. 11, p. 6489-6494, 2003.

MARTIN, A.; COLIN, B.; ARANDA, E.; BENITO, M. J.; CORDOBA, M. G. Characterization of Micrococacceae isolated from iberian dry cured sausages. **Meat Science**. v. 75, n. 4, p. 696-708, 2007.

MATTOS, E. C. **Caracterização Genotípica de Cepas de *Staphylococcus aureus* Recuperadas de Alimentos, Mãos de Manipuladores de Alimentos e Veiculadas por Formigas**. 2005, 74f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MELDRUM, R. J.; LITTLE, C. L.; SAGOO, S.; MITHANI, V.; MCLAUCHLIN, J.; PINNA, E. Assessment of the microbiological safety of salad vegetables and sauces from kebab take away restaurants in the United Kingdom. **Food Microbiology**. v. 26, n. 6, p. 573-577, 2009.

MIEDZOBRODZKI, J.; KASZYCKI, P.; BIALECKA, A.; KASPROWICZ, A. Proteolytic activity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from the colonized skin of patients with acute-phase atopic dermatitis. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v. 21, n. 4, p. 269-276, 2002.

MORELL, E. A.; BALKIN, D. M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A pervasive pathogen highlights the need for new antimicrobial development. **Yale Journal of Biology and Medicine**. v. 83, n. 4, p. 223-233, 2010.

NORMANNO, G.; LA SALANDRA, G.; DAMBROSIO, A.; QUAGLIA, N. C.; CORRENTE, M.; PARISI, A.; SANTAGADA, G.; FIRINU, A.; CRISSETTI, E. CELANO, G. V. Occurrence, characterization and antimicrobial resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* isolated from meat and dairy products. **International Journal of Food Microbiology**. v. 115, n. 3, p. 290-296, 2007.

NIWA, T.; SHINODA, Y.; SUZUKI, A.; OHMORI, T.; YASUDA, M.; OHTA, H.; FUKAO, A.; KITAICHI, K.; MATSUURA, K.; SUGIYAMA, T.; MURAKAMI, N.; ITOH, Y. Outcome measurement of extensive implementation of antimicrobial stewardship in patients receiving intravenous antibiotics in a Japanese university hospital. **The International Journal of Clinical Practice**. v. 66, n. 10, p. 999-1008, 2012.

NOSTRO, A.; BLANCO, A. R.; CANNATELLI, M. A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; ROCCARO, A. S.; ALONZO, V. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**. v. 230, n. 2, p. 191-195, 2004.

ONANUGA, A.; AWHOWHO, G. O. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* strains from patients with urinary tract infections in Yenagoa, Nigeria. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**. v. 4, n. 3, p. 226-230, 2012.

PEREIRA, M. S. V.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.P. Antimicrobial drug resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from cattle in Brazil. **Letters in Applied Microbiology**. v. 20, n. 6, p. 391-395, 1995.

PEREIRA, V.; LOPES, C.; CASTRO, A.; SILVA, J.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. **Food Microbiology**. v. 26, n. 3, p. 278–282, 2009.

PERILLO, J.; CECCARELLI, D.; SPAGNOLETTI, M.; LOLLAI, S.; CAPPUCCINELLI, P.; COLOMBO, M. M. Molecular characterization of enterotoxigenic and borderline oxacillin resistant *Staphylococcus* strains from ovine milk. **Food Microbiology**. v. 32, n. 2, p. 265-273, 2012.

POPOWICZ, G. M.; DUBIN, G.; STEC-NIEMCZYK, J.; ANNA CZARNY, A.; DUBIN, A.; POTEPA, J.; HOLAK, T. A. Functional and structural characterization of Spl proteases from *Staphylococcus aureus*. **Journal of Molecular Biology**. v. 358, n. 1, p. 270-279, 2006.

RAY, B. **Fundamental Food Microbiology**. 3^a ed. Crc Press, 2003.

ROLLOF, J.; BRACONIER, J. H.; SÖDERSTRÖM, C.; NILSSON-EHLE, P. Interference of *Staphylococcus aureus* lipase with human granulocyte function. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v. 7, n. 4, p. 505-510, 1988.

ROSENSTEIN, R.; GÖTZ, F. Staphylococcal lipases: Biochemical and molecular characterization. **Biochimie**. v. 82, n. 11, p. 1005-1014, 2000.

SABOTIC, J.; KOS, J. Microbial and fungal protease inhibitors – current and potential applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 93, n. 4, p. 1351-1375, 2012.

SANTOS, A. L.; SANTOS, D. O.; FEITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I. L.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. A. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 4, n. 6, p. 413-423, 2007.

SAXENA, S.; GOMBER, C. Superoxide dismutase, protease and lipase expression in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*: a tool for antimicrobial drug discovery. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 341, n. 1, p. 217-223, 2010.

SCHLUNDT, J. New directions in foodborne disease prevention. **International Journal of Food Microbiology**. v. 78, n. 1-2, p. 3-17, 2002.

SHAW, L.; GOLONKA, E.; POTEPPA, J.; FOSTER, S. J. The role and regulation of the extracellular proteases of *Staphylococcus aureus*. **Microbiology**. v. 150, n. 1, p. 217–228, 2004.

SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates.

Antonie van Leeuwenhoek : International Journal of General and Molecular Microbiology. v. 23, n. 1, p.15-22, 1957.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual De Métodos De Análise Microbiológica De Alimentos**. 3ª ed. São Paulo: Varela, 2007.

SILVEIRA, G. P.; NOME, F.; GESSER, J. C.; SÁ, M. M. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. **Química Nova**. v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006.

SMITH, E.; WILLIAMSON, M.; ZLOH, M.; GIBBONS, S. Isopimaric acid from *Pinus nigra* shows activity against multidrug-resistant and EMRSA strains of *Staphylococcus aureus*. **Phytotherapy Research**. v. 19, p. 538-542, 2005.

SØRUM, H.; L'ABÉE-LUND, T. M. Antibiotic resistance in food-related bacteria—a result of interfering with the global web of bacterial genetics. **Internacional Journal of Food Microbiology**. v. 78, n. 1-2, p. 43-56, 2002.

SOSPEDRA, I.; RUBERT, J.; SORIANO, J. M.; MAÑES, J. Survey of microbial quality of plant-based foods served in restaurants. **Food Control**. v. 30, n. 2, p. 418-422, 2013.

STAMFORD, T. L. M.; SILVA, C. G. M.; MOTA, R. A.; NETO, A. C. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp. isolados de leite in natura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 26, n. 1, p. 41-45, 2006.

SUNDSFJORD, A.; SIMONSEN, G. S.; HALDORSEN, B. C.; HAAHEIM, H.; HJELMEVOLL, S.; LITTAUER, P.; DAHL, K. H. Genetic methods for detection of antimicrobial resistance. **APMIS. Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**. v. 112, n. 11-12, p. 815-837, 2004.

TEIXEIRA, S.; MILET, Z.; CARVALHO, J.; BISCONTINI, T. M. **Administração Aplicada à Unidade de Alimentação e Nutrição**. São Paulo: Atheneu, 2004.

VÁZQUEZ-SÁNCHEZ, D.; LÓPEZ-CABO, M.; SAÁ-IBUSQUIZA, P.; RODRÍGUEZ-HERRERA, J. J. Incidence and characterization of *Staphylococcus aureus* in fishery products marketed in Galicia (Northwest Spain). **International Journal of Food Microbiology**. v. 157, n. 2, p. 286-296, 2012.

WALLIN-CARLQUIST, N.; MÁRTA, D.; BORCH, E.; RÅDSTRÖM, P. Prolonged expression and production of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A in processed pork meat. **International Journal of Food Microbiology**. v. 141, n. 1-2, p. 69-74, 2010.

WANG, X.; MENG, J.; ZHOU, T.; ZHANG, Y.; YANG, B.; XI, M.; SHENG, J.; ZHI, S.; XIA, X. Antimicrobial susceptibility testing and genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* from food and food animals. **Foodborne Pathogens and Disease**. v. 9, n. 2, p. 95-101, 2012.

XIE, W.; KHOSASIH, V.; SUWANTO, A.; KIM, H. K. Characterization of lipases from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from human facial sebaceous skin. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 22, n. 1, p. 84-91, 2012.

YAN, X.; WANG, B.; TAO, X.; HU, Q.; CUI, Z.; ZHANG, J.; LIN, Y.; YOU, Y.; SHI, X.; GRUNDMANN, H. Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning in Shenzhen, China. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 78, n. 18, p. 6637-6642, 2012.

YOON, Y.; KIM, S. R.; KANG, D. H.; SHIM, W. B.; SEO, E.; CHUNG, D. H. Microbial assessment in school foodservices and recommendations for food safety improvement. **Journal of Food Science**. v. 73, n. 6, p. 304-313, 2008.

YUCEL, N.; CITAK, S.; BAYHÜN, S. Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus aureus* isolated from clinical samples and foods of animal origin. **Foodborne Pathogens and Disease**. v. 8, n. 3, p. 427-431, 2011.

ZRIOUIL, S. B.; BEKKALI, M.; ZEROUALI, K. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* infections and nasal carriage at the Ibn Rochd University Hospital Center, Casablanca, Morocco. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 16, n. 3, p. 279-283, 2012.

ZHANG, C.; SHEN, Y.; DONG, M. Distribution, polymorphism and temporal expression of *egc* in *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in China. **Food Control**. v. 29, n. 1, p. 279-285, 2013.

APÊNDICES

APÊNDICE A – ARTIGO 1**Lipolytic activity of *Staphylococcus aureus* from human, animals, foods and food-contact surfaces in Brazil**

Artigo elaborado a partir de resultados obtidos da presente dissertação, a ser submetido ao *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, ISSN: 1413-8670, QUALIS B2, área: Nutrição.

Lipolytic activity of *Staphylococcus aureus* from human, animals, foods and food-contact surfaces in Brazil

Jessica Bezerra dos Santos Rodrigues¹, Taiz Siqueira Pinto¹, Cybelle Pereira de Oliveira¹, Francisca Inês de Souza Freire², Maria do Socorro Vieira Pereira¹, Quênia Gramile da Silva Meira³, Evandro Leite de Souza^{3*}, José Pinto de Siqueira-Júnior¹

¹ Laboratório de Genética de Microrganismos, Departamento de Biologia Molecular, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil

² Laboratório de Parasitologia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil

³ Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Departamento de Nutrição, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil

Financial support: CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FAPESQ (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba, Brazil)

* Corresponding author: Evandro Leite de Souza

Universidade Federal da Paraíba

Centro de Ciências da Saúde

Departamento de Nutrição

Campus I, 58051-900, Cidade Universitária, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

E-mail: evandroleitesouza@ccs.ufpb.br

Telephone number: + 55 83 3216 7807; Fax number: + 55 83 3216 7094

SUMÁRIO

ABSTRACT	03
INTRODUCTION	03
METHODS.....	05
RESULTS.....	06
DISCUSSION.....	06
ACKNOWLEDGMENTS.....	09
REFERENCES	09

ABSTRACT

S. aureus is of great importance to public health due to its pathogenicity caused by the action of toxins and extracellular enzymes, such as the lipases. The aim of the present study was to evaluate the lipolytic activity of *S. aureus* isolates obtained from human wounds (nosocomial environment), cattle (udder and nasal cavities), foods (cheese ricotta) and food-contact surfaces (meat and vegetables). The frequency of production of lipase among the isolates from human wounds was 86% (43/50); 33.3% (16/30) among the isolates from cow's udder; 15.4% (2/13) among the isolates from nasal cavities of cattle; 82.9% (34/41) among isolates from ricotta cheese; and 100% and 91.7% (24/24) among the isolates from meat- and vegetables-contact surfaces, respectively. These results revealed a variety in the profile for production of lipase among the assayed isolates according to their origin, as well as their possibility to act as pathogenic agent, when considering the role of the enzyme lipase in the virulence of this bacterium, and their potential to spoil foods.

Key-words: *Staphylococcus*, phenotypic characterization, lipolytic activity, virulence

INTRODUCTION

Staphylococcus aureus is widespread in the nature and it is the bacterium more frequently found in skin infectious, although is able to colonize almost all of the human tissues [1]. In the nosocomial environment, skin infections caused by *S. aureus* are commonly found in post-surgical phase, and in the general community these infectious are frequently found as abscesses, impetigo, folliculitis, boils and necrotizing fasciitis [2].

S. aureus has been recognized as the etiological agent of the most cases of foodborne disease all over the world, thereby making it one of the microorganisms of greatest interest regarding the microbiological safety of foods [3,4].

The pathogenesis of infections caused by *S. aureus* depends on the production of surface proteins, which are involved in the bacterial adhesion to the host's tissues, and on the production of extracellular proteins such as the enzymes catalase, thermonuclease, coagulase and lipase [5]. *S. aureus* is known as a potential lipase-producing opportunist pathogenic bacterium able to interfere on the immune host defense by the elimination of granulocytes chemotaxis and reduction of phagocytosis [5,6,7].

Besides the role in the pathogenicity of *S. aureus*, there is concern about the influence of the lipase on the food quality due to its capacity to hydrolyze lipid components in foods. The presence of microorganisms with lipolytic activity can cause faster deterioration of foods because its action on lipids, with subsequent accumulation of intermediate and end-products which cause changes in sensory characteristics, particularly in the taste and flavor of foods [8,4]. The incidence of *S. aureus* in foods is high, mainly in foods of animal origin that were handled or those which do not undergo a heat processing [9,10].

Considering these aspects, the aim of the present study was to characterize strains of *S. aureus* isolated from animals, human wounds, foods and food contact surfaces in Brazil with respect to their capacity to produce lipase.

METHODS

Isolates of S. aureus

The isolates of *S. aureus* were obtained from infected human wounds in a College Public Hospital in the city of João Pessoa – Paraíba – Brazil (50 isolates); from cattle (udder:

30 isolates; nasal cavities: 13 isolates) of a small farm in the city of Patos – Paraíba state - Brazil; from bovine ricotta cheeses of different brands marketed in local supermarkets in the city of João Pessoa – Paraíba state - Brazil (41 isolates); and from meat- (24 isolates) and vegetables-contact surfaces (24 isolates) of food services of in Public Hospital in the city of João Pessoa – Paraíba state - Brazil.

S. aureus was isolated as described elsewhere [11,12]. The samples (swabs for samples of wounds, animals and food-contact surfaces; and 25 g for cheese) were first selectively enriched in brain-heart infusion broth (225 mL) supplemented with NaCl (75 g/1000 mL) for 24 h. Ten-fold serial dilutions of the cultures were prepared (10^{-1} – 10^{-4}) in sterile peptone water (10 g/1000 mL), and aliquots of 100 μ L were plated on Salt Manitol agar (samples of wounds and animals) and on Baird-Parker agar (samples of food-contact surfaces and cheeses) with added potassium tellurite (10 g/1000mL) and egg yolk emulsion (50 mL/1000 mL) at 35°C. Typical colonies were picked and placed on nutrient agar slants. The isolated strains were then identified by biochemical tests (Gram stain, catalase activity, coagulase reaction, thermonuclease production, and mannitol and glucose fermentation). The strains confirmed as *S. aureus* were kept refrigerated (7°C) in nutrient agar slant tubes.

Assessing of the lipolytic activity

Lipolytic activity in the *S. aureus* isolates was determined according to Sierra (1957) [13]. The bacteria were first cultivated in brain-heart infusion broth for 24 h at 35°C. Next, an aliquot (100 μ L) of the culture was grown on sterile plates containing Tween-Calcium agar (10 g/1000 mL peptone, 5 g/1000 mL sodium chloride, 0.1 g/1000 mL calcium chloride, 15 g/1000 mL agar, and 10 mL/1000 mL Tween 80) for 48 h at 35°C. Afterwards, lipase-producing strains were observed by a halo of calcium soap crystals around their colonies, due to the action of lipase on Tween 80 (oleic acid ester).

RESULTS

A total of 182 isolates of *S. aureus* from different origins were tested for production of lipase. From the isolates obtained of human wounds, 43/50 (86%) produced lipase. Regarding the isolates from animals, the higher frequency (53.3%; 16/30) of lipolytic activity was found in isolates from udder, while few isolates from nostrils presented lipolytic activity (15.4%; 2/13). Among the isolates obtained from cheeses, 82.9% (34/41) revealed to produce lipase. All isolates from meat-contact surfaces and 91.7% (22/24) of the isolates from vegetables-contact surfaces were positive for lipase production. Regarding the total number of isolates tested, 77.5% (141/182) were positive for lipase production.

DISCUSSION

In this study a phenotypic characterization of *S. aureus* from human wounds, animals, foods and meat- and vegetables-contact surfaces was carried out, and it was verified a variable frequency of lipase production according to the source/origin of the different tested isolates. The higher frequency for positive lipase production (85%) among the *S. aureus* isolates from human wounds (nosocomial environment) could be related to the necessity of this feature in the bacterium for colonization and establishment of the infectious process in the human tissue.

Staphylococcal lipases negatively affect the human granulocytes functions, which are needed to human defense against the action of *S. aureus*. Lipases are also active against physiological substrates of human plasma, with inhibitory effect on the proliferation of T cells becoming the bacteria dissemination easier [14,7]. Early study found influence of lipases on the abscesses formation in rats, and the infectious were more severe when caused by lipase-

producing *S. aureus* strains [15]. In the same study, higher counts of *S. aureus* (10^4 - 10^7 CFU/g) in the kidneys, liver and spleen of the rats infected with positive lipase strains were found, revealing the importance of this enzyme for the formation of the abscesses and invasion of the organs.

Some researchers have reported that the most of the isolates of *S. aureus* obtained from cattle are not able to produce lipase, in opposite to the ability to produce lipase in isolates from human origin [16,17]. A study carried out in Brazil found that the most of the isolates of *S. aureus* obtained from cattle were negative for lipase production, and that the most of the isolates from cattle that produced lipase were obtained from the cow's udder where can occur a normal contact of the handler during the milking; and it could increase the possibility for contamination with *S. aureus* from human origin with highlighted capability to produce lipase [18]. Among the isolates obtained from the cow's udder assayed in this study, 53% were positive for production of lipase. Our findings are in agreement with the results obtained by other researchers when reveal the high prevalence of negative production of lipase among isolates of *S. aureus* from cattle, at the same time that a low prevalence of negative production of lipase was found among the isolates from human origin.

The most of the isolates of *S. aureus* from foods (ricotta cheese) and from meat- and vegetables-contact surfaces (food processing environments) were positive for lipase production. Early studies found low frequency for production of lipase among isolates of *S. aureus* from chicken samples (22.8%) [8], absence of lipase production among isolates of *Staphylococcus* spp. from fermented sausages [19], while other study found production of lipase in all isolates of *S. aureus* obtained from cow's milk [20].

It is provocative the idea that the isolates of *S. aureus* from ricotta cheeses are of human origin because the high frequency of lipolytic activity presented by them, and that the contamination of these samples (cheeses) could be related to improper handling; suggesting

also the same origin of contamination for the isolates from meat- and vegetables-contact surfaces. Still, the high frequency of lipolytic activity among the isolates from foods and food-contact surfaces reveals the potential of these isolates to spoil foods, particularly due to the action on lipids resulting in decreased quality and shelf life.

Regarding the few available studies on the evaluation of lipase production by *S. aureus* from different origins, including isolates from humans, animals, foods and food-contact-surfaces, the results of the present study become interesting. Although, it is recognized that only a limited number of isolates of *S. aureus* from animal and food-contact surfaces were analyzed when compared to isolates from foods, human wounds and cattle, the findings of this study showed clearly a different frequency of lipase-producing isolates in the sources studied suggesting that this feature could be related to the environment where the isolate is harbored. The higher frequency of isolates of *S. aureus* from human wounds, foods and food-contact surfaces with positive lipase profile suggest the possibility of them to act as etiological agents of infectious diseases, when regarded the role of the enzyme lipase in the establishment of the virulence of *S. aureus*, and also to act as food-spoiling agents.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank to CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brazil), CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FAPESQ (Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba, Brazil) for the financial support.

REFERENCES

1. POPOWICZ GM, DUBIN G, STEC-NIEMCZYK J, et al. Functional and structural characterization of Spl proteases from *Staphylococcus aureus*. J Mol Biol. 2006;358:270-279.
2. MORELL EA, BALKIN DM. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a pervasive pathogen highlights the need for new antimicrobial development. Yale J Biol Med. 2010;83:223-233.
3. IFESAN BOT, HAMTASIN C, MAHABUSARAKAM W, et al. Inhibitory effect of *Eleutherine Americana* err. extract on *Staphylococcus aureus* isolated from food. J Food Scie. 2009;74:31-36.
4. SOARES JC, MARQUES MR, TAVARIA FK, et al. Biodiversity and characterization of *Staphylococcus* species isolated from a small manufacturing dairy plant in Portugal. Int J Food Microbiol. 2011;146:123-129.
5. SAXENA S, GOMBER C. Superoxide dismutase, protease and lipase expression in clinical isolates of *Staphylococcus aureus*: a tool for antimicrobial drug discovery. Mol Cel Biochem. 2010;341:217-223.
6. SMELTZER MS, HART ME, IANDOLO JJ. Quantitative spectrophotometric assay for staphylococcal lipase. Appl Environ Microbiol. 1992;58:2815-2819.
7. XIE W, KHOSASIH V, SUWANTO A, et al. Characterization of lipases from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from human facial sebaceous skin. J Microbiol Biotechnol. 2010;22:84-91.
8. GÜNDĞAN N, DEVREN A. Protease and lipase activity of *Staphylococcus aureus* obtained from meat, chicken and meatball samples. Gazi University Journal of Science. 2010;23:381-384.
9. TAUXE RV. Emerging foodborne pathogens. Int J Food Microbiol. 2002;78: 31-41.

10. SANDEL MK, MCKILLIP JL. Virulence and recovery of *Staphylococcus aureus* relevant to the food industry using improvements on traditional approaches. Food Cont. 2004;15:5-10.
11. DOWNES FP, ITO K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th ed. American Public Health Association, Washington, 2001.
12. PEREIRA MSV, SIQUEIRA-JÚNIOR JP. Antimicrobial drug resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from cattle in Brazil. Let Appl Microbiol. 1995;20:391-395.
13. SIERRA G. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. Antonie van Leeuwenhoek: Int J Gen Mol Microbiol. 1957;23:15-22.
14. ROLLOF J, BRACONIER JH, SÖDERSTRÖM C, et al. Interference of *Staphylococcus aureus* lipase with human granulocyte function. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1988;7:505-510.
15. HU C, XIONG N, ZHANG Y, et al. Functional characterization of lipase in the pathogenesis of *Staphylococcus aureus*. Biochem Biophys Res Commun. 2012;419:617-620.
16. OWENS JJ, JOHN PCL. The egg yolk and lipolytic reaction of coagulase positive staphylococci. J Appl Bacteriol. 1975;39:23-30.
17. O'TOOLE DK. Differences in egg yolk reaction on Baird-Packer medium between bovine and human strains of coagulase-positive staphylococci. Let Appl Microbiol. 1987;4:111-112.
18. ARAÚJO, MLC, ITO IY, SANTIAGO MEB, et al. *Staphylococcus aureus*: Pesquisa de portadores bovinos em lactação e antibiograma das cepas isoladas. Braz J Microbiol. 1986; 17:350-355.

19. DROSINOS EH, PARAMITHIOTIS S, KOLOVOS G, et al. Phenotypic and technological diversity of lactic acid bacteria and staphylococci isolated from traditionally fermented sausages in Southern Greece. *Food Microbiol.* 2007;24: 260-270.
20. TEBALDI VMR, OLIVEIRA TLC, BOARI CA, et al. Isolation of coliforms, staphylococci, and enterococci in raw milk from communitarian expansion refrigeration tanks: identification, lipolytic and proteolytic action. *Food Scie Technol.* 2008;28:753-760.

Table 1. Lipase activity of isolates of *S. aureus* from different sources in Brazil.

Source	Number of isolates	Isolates with lipolytic positive activity	
		Nº	%
Human wounds (hospital)	50	43	86
Animals (udder)	30	16	53.3
Animals (nostrils)	13	2	15.4
Cheese (ricotta)	41	34	82.9
Meat-contact surfaces	24	24	100
Vegetables-contact surfaces	24	22	91.7
Total	182	141	77.5

APÊNDICE B
RESULTADOS A SEREM PUBLICADOS

ATIVIDADE PROTEOLÍTICA

Para detecção da atividade proteolítica foram utilizados isolados de *S. aureus* obtidos de superfícies de preparo de alimentos de carnes (24) e de vegetais (24) de Serviços de Alimentação de dois Hospitais Públicos localizados na Cidade de João Pessoa – Paraíba – Brasil; e de queijos ricota bovinos (21 isolados) de diferentes marcas comercializadas na mesma cidade.

Tabela 1. Atividade proteolítica de isolados de *S. aureus* de diferentes origens

Origem	Numero de isolados	Isolados com atividade proteolítica positiva	
		Nº	%
Bancada de corte (carne)	24	24	100
Bancada de corte (vegetais)	24	24	100
Queijo (ricota)	21	21	100

Tabela 2. Produção de proteases por *S. aureus*

Tamanho do Halo (mm)	Nº	Bancada de corte de carne	%	Bancada de corte de vegetais	%	Queijo Ricota	%
< 0,5	6	0	0	4	66,67	2	33,33
0,5 – 1	17	1	5,88	4	23,53	12	70,59
> 1- 2	12	4	33,33	7	58,34	1	8,33
> 2 - 4	34	19	55,88	9	26,47	6	17,65

Todos os isolados de *S. aureus* testados apresentaram atividade proteolítica quando inoculados em BAB adicionado de leite desnatado sem lactose. Entretanto, os isolados de diferentes origens apresentaram halos característicos de atividade proteolítica (zonas de precipitação) com diferentes diâmetros. A atividade proteolítica dos isolados foi classificada em quatro categorias, como segue: muito baixa, (halos transparentes com diâmetro < 0,5 mm); baixa, halos transparentes com diâmetro de 0,5 - 1 mm; média, halos transparentes com diâmetro > 1 - 2 mm; e alta com halos transparentes com diâmetro > 2 - 4 mm. Alguns poucos isolados de *S. aureus* testados para atividade proteolítica apresentaram halos característicos de atividade proteolítica com diâmetro menor que 0,5 mm, os quais se caracterizam por zonas de

precipitação tão próximas da colônia ensaiada que podem ser considerados como não produtores de protease, sendo tais achados e interpretação já relatados em estudo prévio (MARTLEY et al., 1970).

Dos isolados obtidos de bancada de corte de carne, quatro (16,67%) apresentavam halos com diâmetros entre > 1 - 2 mm; enquanto a maioria dos isolados (19/24; 79,17%) apresentaram halos de diâmetro entre > 2 - 4 mm. A maioria dos isolados obtidos de bancada de corte de vegetais apresentou halos com diâmetro entre > 2 - 4 mm, entretanto esta frequência (9/24; 37,50%) foi menor daquela observada nos isolados obtidos de bancadas de corte de carne. Por sua vez, a maioria dos isolados obtidos de queijo ricota (12/24; 57,14%) apresentou halos com diâmetro entre 0,5 – 1 mm. Foi observado que após 24 horas de incubação os isolados apresentaram halos de atividade proteolítica com diâmetros muito pequenos, no entanto os diâmetros dos halos formados aumentaram consideravelmente após 48 horas de incubação.

RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Para avaliação da resistência a antimicrobianos, os isolados de *S. aureus* testados foram obtidos de superfícies de preparo de carnes (24) e de vegetais (24) de Serviços de Alimentação de dois Hospitais Públicos localizados na Cidade de João Pessoa – Paraíba – Brasil.

Tabela 3 – Prevalência de cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos segundo CIM¹ (µg/mL)

Origem	CLO	ERI	TET	ESTREP	PEN	NOR	MET
Bancada de corte (carnes) – n:24	0 (0%)	2 (8,3%)	3 (12,5%)	24 (100%)	24 (100%)	0 (0%)	0 (0%)
Bancada de corte (vegetais) – n:24	0 (0%)	10 (41,7%)	9 (37,5%)	24 (100%)	24 (100%)	0 (0%)	0 (0%)

¹ Concentração Inibitória Mínima de acordo com CLSI (2011), exceto estreptomicina que seguiu critério citado por GILLESPIE et al. (1990)

CLO: Clorafenicol; ERI: Eritromicina; TET: Tetraciclina; ESTREP: Estreptomicina; PEN: Penicilina; NOR: Norfloxacin; MET: Meticilina

Tabela 4 – Padrões e fenótipos de resistência a antibióticos em isolados de *Staphylococcus aureus* de superfícies de contato com alimentos.

Padrões	Fenótipo
Resistência a três drogas (08 isolados)	Eri; Estrep; Pen (04 isolados) Tet; Estrep; Pen (04 isolados)
Resistência a quatro drogas (08 isolados)	Eri; Tet; Estrep; Pen (08 isolados)
Eri: eritromicina; Tet: tetraciclina; Estrep: estreptomicina; Pen: penicilina	

Tabela 5 – Concentração Inibitória Mínima de antibióticos frente a isolados de *Staphylococcus aureus* de superfícies de contato com alimentos.

Antibióticos	Número de <i>S. aureus</i> resistentes e CIM (µg/mL) de antibióticos												
	Total	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512
Clorafenicol (≥ 32 µg/mL)	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Eritromicina (≥ 8 µg/mL)	12	-	1	4	17	14	5	-	-	1	1	-	5
Tetraciclina (≥16 µg/mL)	12	4	20	4	3	2	3	7	3	2	-	-	-
Estreptomicina (≥16 µg/mL)	48	-	-	-	-	-	-	-	4	6	29	9	-
Penicilina (≥ 0,25µg/mL)	48	-	-	11	8	8	5	12	2	2	-	-	-
Norfloxacin (≥ 16 µg/mL)	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Meticilina (≤ 9 mm)	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

No presente estudo a prevalência de cepas de *S. aureus* resistente a antibióticos foi estudada a partir de dois grupos específicos: o primeiro referente a isolados de superfície de corte/manipulação de carne, e o segundo referente a isolados de superfície de corte/manipulação de vegetais. A prevalência de *S. aureus* resistentes a antibióticos isolados de acordo com o tipo de superfície de contato com alimentos (carne e vegetais) são apresentados na Tabela 3. Dos 48 isolados de *S. aureus* testados, nenhum foi resistente a

clorafenicol (CIM ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$), norfloxacin (CIM ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$) e meticilina (Diâmetro ≤ 9 mm). Doze isolados foram resistentes a eritromicina (CIM ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$) e tetraciclina (CIM ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$); enquanto todos os isolados foram resistentes a estreptomicina (CIM ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$) e penicilina (CIM $\geq 0,25$ $\mu\text{g/mL}$). Os isolados que apresentaram resistência à tetraciclina foram submetidos ao teste de sensibilidade à minociclina, sendo detectada sensibilidade de todos os isolados a este antibiótico indicando resistência associada ao plasmídeo (CHOPRA; LACEY; CONNOLLY, 1974). O gene *mecA* não foi identificado em nenhum isolado testado.

A variação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) frente aos isolados testados foi de 0,5 a 512 $\mu\text{g/mL}$ para eritromicina; 0,25 a 64 $\mu\text{g/mL}$ para tetraciclina; 32 a 256 $\mu\text{g/mL}$ para estreptomicina; e 1 a 64 $\mu\text{g/mL}$ para penicilina (Tabela 5). As cepas resistentes à penicilina apresentaram uma extensa variabilidade em sua CIM e pode ser entendido como um reflexo do caráter mutagênico da susceptibilidade de *S. aureus* à penicilina, o que há muito vem sendo relatado (DEMEREK, 1945; McCALLUM; BERGER-BÄCHI; SENN, 2010; YUCEL; CITAK; BAYHÜN, 2011). Dezesesseis isolados foram resistentes ao menos a três dos antibióticos testados (Tabela 4), sendo, dessa forma, consideradas multirresistentes (AYDIN et al., 2011). Os isolados que apresentaram padrão de multiresistência revelaram um fenótipo de resistência a três ou quatro dos antibióticos ensaiados.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que isolados de *S. aureus* de superfícies de contato com carnes e vegetais de serviços de alimentação hospitalar apresentaram padrão de resistência ao menos a um antibiótico testado, revelando a necessidade de considerar estas superfícies de contato com alimentos como potenciais vias de disseminação de *S. aureus* resistentes a antibióticos.

REFERÊNCIAS

- AYDIN, A.; MURATOGLU, K.; SUDAGIDAN, M.; BOSTAN, K.; OKUKLU, B.; HARSA, S. Prevalence and Antibiotic Resistance of Foodborne *Staphylococcus aureus* Isolates in Turkey. **Foodborne Pathogens and Disease**. v. 8, n. 1, p. 63-69, 2011.
- CHOPRA, I.; LACEY, R. W.; CONNOLLY, J. Biochemical and genetic basis of tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 6, n. 4, p. 397-404, 1974.
- DEMEREK, M. Production of *Staphylococcus* strains resistant to various concentrations of penicillin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 31, n. 1, p. 16-24, 1945.
- MARTLEY, F. G.; JARVIS, A. W.; BACON, D. F.; LAWRENCE, R. C. Typing of coagulase-positive staphylococci by proteolytic activity on buffered caseinate-agar, with

special reference to bacteriophage nontypable strains. **Infection and Immunity**. v. 2, n. 4, p. 439-442, 1970.

McCALLUM, N.; BERGER-BÄCHI, B.; SENN, M. A. Regulation of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 300, n. 2-3, p. 118-129, 2010.

YUCEL, N.; CITAK, S.; BAYHÜN, S. Antimicrobial Resistance Profile of *Staphylococcus aureus* Isolated from Clinical Samples and Foods of Animal Origin. **Foodborne Pathogens and Disease**. v. 8, n. 3, p. 427-431, 2011.