



Instituto Politécnico
de Castelo Branco
Escola Superior
Agrária

Genes enterotoxigénicos e resistência a antibióticos em isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva de origem alimentar

Mestrado em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar

Joana Marisa Costa Nunes Ferreira

Orientadora

Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Julho, 2014



Genes enterotoxigénicos e resistência a antibióticos em isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva de origem alimentar

Joana Marisa Costa Nunes Ferreira

Orientadora

Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Castelo Branco para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar, realizada sob orientação da Doutora Cristina Maria Baptista Santos Pintado, do Instituto Politécnico de Castelo Branco

Julho, 2014

Composição do júri

Presidente

Doutor Manuel Vicente de Freitas Martins

Professor Adjunto do Instituto Politécnico de Castelo Branco

Vogais

Doutora Cristina Maria Batista dos Santos Pintado

Professora Adjunta do Instituto Politécnico de Castelo Branco

Mestre Carlos Manuel Gaspar dos Reis

Professor Adjunto do Instituto Politécnico de Castelo Branco

Dedicatória

Dedico esta dissertação a um grande Homem e guerreiro, o meu Avô Jacinto...
Obrigada por tudo o que foste e transmitiste... Até sempre...

Agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível através do contributo pessoal e profissional de algumas pessoas, às quais desejo manifestar o meu obrigada.

À Escola Superior Agrária de Castelo Branco pela disponibilidade de ceder o Laboratório de Microbiologia e Biologia bem como todo o material necessário à realização da parte prática do presente trabalho.

À minha orientadora, Doutora Cristina Pintado pelo apoio, dedicação, motivação e amizade que demonstrou durante a realização do trabalho.

À Engenheira Manuela Goulão, não só pelo apoio e ensinamento transmitido no trabalho prático, mas também por toda a dedicação, motivação e preocupação demonstrada para comigo e com a minha gravidez.

Às técnicas do Laboratório de Microbiologia e Biologia da Escola Superior Agrária, Helena Martins, Conceição Amaro e Graça, pela ajuda e apoio prestado.

À Doutora Catarina Gavinhos pelo apoio e disponibilidade na realização do tratamento e análise de dados estatístico.

A todos os docentes da Escola Superior Agrária por todos os conhecimentos transmitidos durante a minha vida académica.

À minha família, principalmente marido, pais e irmão que sempre me deram força e motivação para a realização de mais esta etapa na minha vida académica.

Ao meu filhote Tomás que embora ainda não tenha nascido, mas que me deu força e animo para terminar esta etapa.

À Doutora Celcidina Pires Gomes do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P pela cedência das culturas de referência e de bibliografia, bem como a sua disponibilidade para esclarecimento de dúvidas.

Ao Doutor João Carlos Rodrigues do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, pela disponibilidade para esclarecer dúvidas e pela cedência de bibliografia.

A palavra “Obrigada” é pequena de mais para poder agradecer a todos os que contribuíram para a realização deste trabalho, a todos um grande Bem Haja!

“As oportunidades normalmente apresentam-se disfarçadas de trabalho árduo, e é por isso que muitos não as reconhecem.”

(Ann Landers)

Resumo

Staphylococcus aureus é, entre as bactérias do gênero *Staphylococcus*, a espécie mais frequentemente relacionada com casos e surtos de intoxicação alimentar, os quais têm origem na produção de enterotoxinas estafilocócicas (SE), principalmente em alimentos de origem animal.

Sabe-se que 95% das intoxicações alimentares estafilocócicas são causadas pelas enterotoxinas clássicas (SEA, SEB, SEC, SED e SEE). Sendo assim, neste estudo foi usado o PCR multiplex para verificar a presença de fragmentos de genes de SE (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*) e do fragmento de gene *femA*, específico para *Staphylococcus aureus*, em 121 isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva obtidos de queijo de ovelha laborado com leite cru, de leite (de vaca, de ovelha e de cabra) e de outros alimentos maioritariamente de origem animal.

De um total de 121 isolados, em 31,4% houve amplificação do fragmento de gene *femA*, em 1,7% amplificação dos fragmentos de gene *sea* e *femA*, em 57% amplificação dos fragmentos de gene *sec* e *femA* e em 4,1% amplificação dos fragmentos de gene *see* e *femA*. Existiram isolados sem amplificação do gene *femA*, sendo submetidos a provas bioquímicas para uma identificação ao nível da espécie.

Para além da avaliação da presença de fragmentos de genes enterotoxigénicos e do gene *femA*, um outro objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de resistência de 80 isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva a nove antibióticos (Sulfametoxazol/Trimetoprim 25 µg, Ampicilina 10 µg, Amoxicilina 10 µg, Penicilina G 10 IU, Enrofloxacina 5 µg, Neomicina 30 µg, Eritromocina 15 µg, Estreptomicina 10 µg, e Cefazolina 30 µg), através da técnica de Kirby-Bauer. Apesar de 77,5% dos isolados apresentarem sensibilidade a todos os antibióticos em estudo, verificou-se resistência a 2, 3 ou 5 antibiótico em 17,7% dos isolados, tendo-se verificado uma maior percentagem de multirresistência à Penicilina G e Ampicilina (8,75%) e à Penicilina G, Ampicilina e Amoxicilina (5%). Tendo em conta a origem dos isolados, a maior percentagem de resistência foi verificada em isolados de leite de vaca, onde 100% dos isolados foram resistentes à Penicilina G e à Ampicilina e 25% à Amoxicilina. Estes dados levam-nos a questionar a utilização inadequada de antibióticos em animais de produção leiteira bovina.

Palavras-chave:

Staphylococcus coagulase positiva; Genes enterotoxigénicos; PCR multiplex; Resistência a antibióticos.

Abstract

Staphylococcus aureus is the specie of the *Staphylococcus* genus more frequently related with cases and outbreaks of food poisoning, caused by staphylococcal enterotoxins (SE), mainly in foods of animal origin.

About 95% of staphylococcal food poisoning are caused by enterotoxins SEA, SEB, SEC, SED and SEE. Thus, a multiplex PCR assay was used in this work to verify the presence of gene fragments of SE (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* \and *see*) and the *femA* gene fragment, specific for *Staphylococcus aureus*, using 121 coagulase-positive *Staphylococcus* isolates obtained from sheep's cheese labored with raw milk, milk (from cow, sheep and goat) and other foods mainly of animal origin.

From a total of 121 isolates, *femA* gene fragment was amplified in 31.4%, *sea* and *femA* gene fragments in 1.7%, *sec* and *femA* gene fragments in 57% and *see* and *femA* gene fragments in 4.1%. Isolates without amplification of *femA* were submitted to biochemical tests for identification to the species level.

In addition to the evaluation of the presence of enterotoxigenic gene fragments and the *femA* gene, another objective of this study was to evaluate the resistance profile of the 80 coagulase-positive *Staphylococcus* isolates to the nine antibiotics (Trimethoprim/sulfamethoxazole 25 µg, Ampicillin 10 µg, Amoxicillin 10 µg, Penicillin G 10 IU, Enrofloxacin 5 µg, Neomycin 30 µg, Erythromycin 15 µg, Streptomycin 10 µg and Cefazolin 30 µg), through the application of the Kirby-Bauer technique. Although 77.5% of the isolates show sensitivity to all antibiotics studied, was observed resistance to two, three or five antibiotics in 17.7% of the isolates, with a higher percentage of multidrug resistance to Penicillin G and Ampicillin (8.75%) and Penicillin G, Ampicillin and Amoxicillin (5%). Concerning the origin of the isolates, the highest percentage of resistance was detected in isolates from cow's milk, with 100% of the isolates resistant to Penicillin G and Ampicillin and 25% to Amoxicillin. These data lead us to question the inappropriate use of antibiotics in milk production.

Keywords

Coagulase-positive *Staphylococcus*; Enterotoxigenic genes; Multiplex PCR; Antibiotics resistance.

Índice Geral

Composição do júri	III
Dedicatória	V
Agradecimentos	VII
Resumo.....	XI
Abstract	XIII
Índice de figuras	XVII
Índice de tabelas	XIX
Índice de anexos.....	XXI
1. Introdução.....	1
2. Revisão Bibliográfica	2
2.1. O género <i>Staphylococcus</i>	2
2.2. Fatores de virulência de <i>Staphylococcus aureus</i>	3
2.3. Intoxicação alimentar estafilocócica.....	5
2.4. Enterotoxinas estafilocócicas	6
2.5. Fatores que afetam a multiplicação e a sobrevivência de <i>S.aureus</i> e a produção e destruição de enterotoxinas estafilocócicas.....	8
2.6. Métodos de Detecção de Enterotoxinas.....	10
2.7. Reação de polimerização em cadeia (PCR)	11
2.8. Suscetibilidade a antibióticos	11
2.8.1. Classificação dos antibióticos.....	11
2.8.2. Resistência aos antibióticos.....	15
2.8.3. Mecanismo de resistência de <i>Staphylococcus</i>	17
2.8.4. Testes de sensibilidade a antibióticos.....	18
3. Material e Métodos	20
3.1. Amostras bacterianas	20
3.2. Provas da coagulase, hemólise e DNase	20
3.2.1. Prova da coagulase.....	20
3.2.2. Prova da hemólise	21
3.2.3. Teste da DNase	22
3.3. Detecção de fragmentos de genes enterotoxigénicos por PCR Multiplex	23
3.3.1. Extração de DNA.....	24
3.3.2. Amplificação do DNA.....	24
3.3.2.1. Primers	24
3.3.2.2. Mistura de amplificação	25

A composição da mistura de amplificação e as respectivas quantidades encontram-se assinaladas na Tabela 12.....	25
3.3.2.3. Termociclador	26
3.3.3. Separação dos fragmentos de DNA por eletroforese em gel de agarose	27
3.4. Identificação de isolados	28
3.5. Prova do manitol.....	30
3.6. Prova Voges Proskauer - Methyl Red (VP - MR).....	30
3.7. Teste de suscetibilidade a antibióticos -Técnica de Kirby- Bauer	31
3.8. Tratamento de dados	33
4. Resultados e Discussão.....	34
4.1. Provas da coagulase, hemólise e DNase	34
4.2. Detecção de genes enterotoxigénicos e <i>femA</i> por PCRMultiplex.....	34
4.2.1. Isolados sem amplificação de genes enterotoxigénicos e <i>femA</i>	39
4.3. Caracterização da suscetibilidade aos antibióticos	40
4.3.1. Controlo da técnica Kirby-Bauer a partir da estirpe de referência	40
4.3.2. Suscetibilidade aos antibióticos dos isolados em estudo.....	41
4.3.3. Análise estatística da suscetibilidade dos isolados aos antibióticos.....	44
5. Conclusão	50
6. Bibliografia.....	51
Anexos.....	55

Índice de figuras

Figura 1 - Colónias de <i>Staphylococcus aureus</i>	2
Figura 2.- Enzimas e toxinas produzidas pelo <i>S. aureus</i> que participam nos mecanismos de patogenicidade e de resistência	3
Figura 3 - Surtos estudados no DAN em 2012 e 2013 com agente etiológico identificado.	6
Figura 4- Principais modos de acção de antibióticos sobre bactérias.	12
Figura 5 - Mecanismos de resistência a antibióticos.....	16
Figura 6- Resultados da prova da coagulase em Baird-Parker Agar com RPF.....	21
Figura 7 - Coagulase positiva (+) e coagulase negativa (-) em tubo de ensaio.....	21
Figura 8 - Tipos de hemólise	22
Figura 9 - Teste da DNase antes da adição de HCl 1M (a) e após a adição de HCl 1M (b).....	23
Figura 10 - Sequência de procedimento na extração do DNA genómico.....	24
Figura 11 -NZY TM Taq 2 x Green Master Mix da Nzytech.....	25
Figura 12 - Termociclador (Biometra, <i>Tgradiento</i>).....	26
Figura 13 - Imagem do ecrã do termociclador com os dados do programa utilizado.....	26
Figura 14 - Carregamento dos poços.....	27
Figura 15- Separação eletroforética dos fragmentos de genes <i>femA</i> , <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> e <i>see</i> , após amplificação por PCR Multiplex.	28
Figura 16 - Substratos depois de rehidratados, já com alteração de cor.....	29
Figura 17 - Folha de registo <i>Microgen Staph-ID Report Form</i>	29
Figura 18 -Prova do manitol positivo para <i>S. aureus</i>	30
Figura 19 -Sequência de passos para a realização dos antibiogramas.....	32
Figura 20 - Medição dos diâmetros das zonas de inibição.	33
Figura 21-Separação eletroforética dos fragmentos dos genes <i>femA</i> , <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> e <i>see</i> , após amplificação por PCR Multiplex do DNA das culturas de referência <i>S. aureus</i> ATCC 29213 (coluna 1), <i>S. aureus</i> EURL 11CEB126STA (coluna 2), <i>S. aureus</i> EURL 12CEB583STA (coluna 3), <i>S. aureus</i> EURL 12CEB502STA (coluna 4) e <i>S. aureus</i> EURL 09CEB329STA (coluna 5). M – Marcador de 50pb.....	35
Figura 22 - Percentagem de isolados com amplificação de genes enterotoxigénicos e <i>femA</i> ... 35	
Figura 23- Percentagem de isolados com amplificação para <i>sea</i> , <i>seb</i> , <i>sec</i> , <i>sed</i> e <i>see</i>	36
Figura 24 - Amplificações obtidas num ensaio PCR Multiplex.....	39
Figura 25- Número de isolados suscetíveis, resistentes ou intermédios aos antibióticos em estudo.....	41
Figura 26 - Preparação do gel de agarose.....	60
Figura 27 - Apresentação TBE Buffer 10X antes da sua preparação.....	61

Figura 28 - NZYDNA Ladder VI, nzytech	62
Figura 29- Amplificação do marcador.....	62
Figura 30 - Isolados S96, S100, S130, S224 e O33a sem amplificação de fragmentos de genes enterotoxigênicos e <i>femA</i>	64
Figura 31 - Isolados S221 e S222 sem amplificação de fragmentos de genes enterotoxigênicos e <i>femA</i>	65

Índice de tabelas

Tabela 1 - <i>Staphylococcus</i> coagulase-positiva.....	3
Tabela 2- Enzimas e toxinas produzidas por <i>S. aureus</i> que participam nos mecanismos de patogenicidade e de resistência deste microrganismo patogénico	4
Tabela 3 - Caraterísticas das enterotoxinas estafilocócicas mais comuns.....	7
Tabela 4 -Fatores que afetam a multiplicação e a produção de enterotoxinas por <i>S. aureus</i>	9
Tabela 5 - Fatores que afetam a destruição de <i>S.aureus</i> e a produção de enterotoxinas.....	9
Tabela 6 - Antibióticos que inibem a síntese da parede celular.....	13
Tabela 7 - Antibióticos que inibem a síntese da membrana citoplasmática.....	14
Tabela 8 - Antibióticos que inibem a síntese proteica nos ribossomas.....	14
Tabela 9- Antibióticos que inibem a duplicação cromossômica ou a transcrição.	15
Tabela 10 - Antibióticos que alteram o metabolismo celular.	15
Tabela 11 - Sequência de nucleótidos e tamanho dos produtos de amplificação específicos para os fragmentos dos genes de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva detetados neste estudo.	25
Tabela 12- Composição da mistura de amplificação.....	26
Tabela 13 - Lista de antibióticos testados neste trabalho.	31
Tabela 14 - Valores de referência para interpretação dos diâmetros das zonas de inibição para os antibióticos utilizados.....	33
Tabela 15- Frequência de amplificação dos fragmentos de genes tendo em conta a proveniência dos isolados de queijo de duas queijarias diferentes (n=95).	36
Tabela 16- Frequência de amplificação dos fragmentos de genes em isolados de leite e outros alimentos	37
Tabela 17- Número e percentagem de isolados de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva com amplificação de genes enterotoxigénicos e <i>femA</i>	37
Tabela 18 - Resumo das amplificações obtidas em todos os isolados em estudo.....	38
Tabela 19 - Isolados sem amplificação de genes enterotoxigénicos e <i>femA</i>	40
Tabela 20 - Resultados médios de dois ensaios para os diâmetros de inibição (mm) obtidos para os nove antibióticos testados para a estirpe de referência <i>S. aureus</i> ATCC 25923	40
Tabela 21 - Percentagem de isolados suscetíveis a cada antibiótico, tendo em conta a origem dos isolados.....	41
Tabela 22- Suscetibilidade aos 9 antibióticos testados nos isolados de leite.	42
Tabela 23 - Perfil de resistência dos grupos de isolados em estudo.....	43
Tabela 24 - Teste de independência das variáveis, χ^2	44
Tabela 25 - Teste da homogeneidade das variâncias.	45
Tabela 26- Verificação da acção da Penicilina, Ampicilina e Amoxicilina sobre os isolados dos três grupos de alimentos através do Teste <i>t-student</i>	46
Tabela 27 - Resultados de alguns parâmetros estatísticos analisados tendo em conta as médias dos halos da zona de inibição (em mm) de cada antibiótico testado.	48

Tabela 28- Volume de tampão/ espessura do gel59

Índice de anexos

Anexo I - Métodos clássicos de avaliação do perfil bacteriano de suscetibilidade a antibióticos	56
Anexo II- Preparação da solução de lise - Dodecil sulfato de sódio a 0,25% em 0,05N NaOH estéril	58
Anexo III - Preparação do gel de agarose	59
Anexo IV - Preparação da solução tampão TBE 1×	61
Anexo V - Marcador NZYDNA Ladder VI	62
Anexo VI - Preparação do brometo de etídio	63
Anexo VII - Resultados obtidos em <i>Microgen Software System</i> (MID-60).....	64
Anexo VIII - Registo de resultados de todas as provas efectuadas aos isolados em estudo	66
Anexo IX - Média dos halos da zona de inibição (em mm) de cada antibiótico testado em todos os isolados em estudo.....	72
Anexo X- Boxplots obtidos através das médias dos halos da zona de inibição (em mm) de cada antibiótico testado.	76

1. Introdução

As infeções de origem alimentar têm sido a maior causa de doenças humanas durante séculos, apesar de se manterem subnotificadas e a sua verdadeira incidência desconhecida.

A intoxicação estafilocócica é a causa mais frequente de surtos de doenças microbianas transmitidas por alimentos, em muitos países. Surtos e casos esporádicos de intoxicação atribuídos ao consumo de produtos lácteos, principalmente queijos, têm sido relatados em vários países. Dos *Staphylococcus coagulase positiva*, *Staphylococcus aureus* é a espécie mais frequentemente associada a casos de intoxicação alimentar, devido à sua habilidade de produzir vários tipos de enterotoxinas.

Há vários factores que, apesar de poderem ser prevenidos, podem contribuir para a ocorrência de intoxicações alimentares: ingredientes crus contaminados (incluindo água), refrigeração ou armazenamento inadequados, alimentos insuficientemente cozinhados, contaminação cruzada, deficiente higiene pessoal dos manipuladores ou das instalações ou ainda pessoal não treinado.

No leite e derivados a contaminação pode aparecer quer de factores externos aos animais, como é o caso do ambiente, da água, do pessoal encarregue da ordenha, dos equipamentos e utensílios que entram em contacto direto com o leite, quer com fatores relacionados diretamente com os animais destacando-se a infeção da glândula mamária.

A caracterização molecular de isolados alimentares de bactérias patogénicas é importante uma vez que permite criar uma base de dados que poderá ser útil quando comparada com perfis moleculares de isolados clínicos.

A resistência aos antibióticos é um problema de segurança alimentar, representando um risco direto quando o microrganismo resistente se encontra no alimento ingerido ou indiretamente quando a resistência é transmitida de uma bactéria comensal do alimento para uma bactéria patogénica para o homem. A monitorização da resistência antimicrobiana e o uso prudente de antibióticos em animais e humanos em todos os setores é o aspeto chave para a prevenção e controlo da resistência antimicrobiana.

Com o presente trabalho pretendeu-se verificar a presença de genes de enterotoxinas estafilocócicas em culturas de *Staphylococcus coagulase positiva* de isolados maioritariamente de leite e produtos lácteos (leite de vaca, leite de cabra, leite de ovelha e queijo feito com leite cru de ovelha). Devido à importância de estudos que controlam o aparecimento em alimentos de estirpes bacterianas resistentes aos compostos utilizados para a sua eliminação, este trabalho teve também como objetivo testar a resistência antimicrobiana das culturas bacterianas a nove antibióticos.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. O género *Staphylococcus*

Os *Staphylococcus* foram descritos pela primeira vez em 1880, a partir de isolados clínicos de pus de abscessos cirúrgicos, pelo cirurgião escocês Alexandre Ogston, e atualmente é um dos microrganismos mais comuns nas infeções piogénicas em todo o mundo (Santos *et al.*, 2007).

Os *Staphylococcus* são ubíquos no ambiente e podem ser encontrados no ar, poeira, esgoto, água, superfícies ambientais, em seres humanos e animais (Hennekinne *et al.*, 2010). Pertencem à família *Micrococcacea*, são pequenos cocos Gram-positivos, apresentam-se isolados, aos pares, em cadeias curtas, ou agrupados (com aspeto semelhante a um cacho de uvas), com aproximadamente 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, imóveis, não esporulados e geralmente não encapsulados. Eles formam colónias normalmente grandes (1 a 2 mm de diâmetro) e cremosas, com pigmentos que variam do branco a vários tons de amarelo, dependendo da espécie (Cordeiro, 2011).

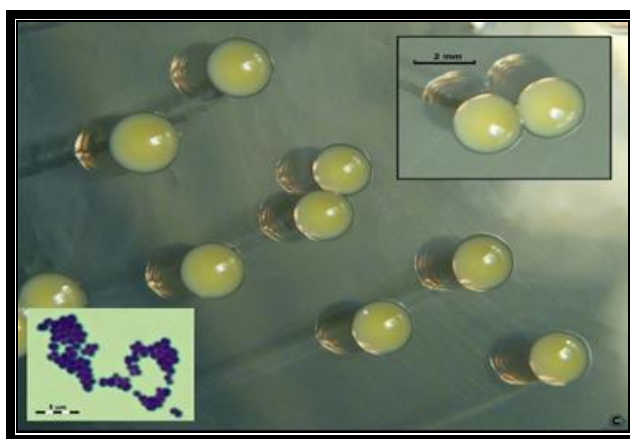


Figura 1 - Colónias de *Staphylococcus aureus*.

Fonte: Bactéria inphotos (2014).

São anaeróbios facultativos, produzem a enzima catalase (Martins, 2012). Os estafilococos são capazes de produzir enzimas e citotoxinas tais como quatro hemolisinas (α , β , γ e δ), nucleases, proteases, lipases, hialuronidasas, colagenases, fibrolisina, coagulase e β -lactamase. Estas enzimas e citotoxinas são encontradas em elementos genéticos como plasmídeos, transposons e profagos (Novick *et al.*, 2001).

Até ao momento, 50 espécies e subespécies de *Staphylococcus* foram descritas de acordo com o seu potencial para a produção de coagulase em estirpes produtoras de coagulase, designados como estafilococos coagulase positiva (ECoP), e estirpes não produtoras de coagulase, chamadas estafilococos coagulase negativa (ECoN) (Hennekinne *et al.*, 2010).

A atividade da coagulase é considerada um fator de virulência, pois o coágulo consiste em um acúmulo de fibrina ao redor das células bacterianas que isola a área infetada, o que dificulta o acesso das células do sistema imune do hospedeiro às bactérias (Martins, 2012).

Estirpes ECoP foram claramente implicadas em casos de intoxicação alimentar, embora já tenham sido descritos alguns surtos de intoxicação estafilocócica associados a espécies coagulase negativa (Borges *et al.*, 2008b).

Entre as espécies pertencentes ao grupo ECoP (Tabela 1), *S. aureus* é o principal causador descrito em casos de intoxicação alimentar estafilocócica. Durante o processamento e armazenamento de alimentos, temperaturas fora do intervalo de 7-48°C previnem a multiplicação de *S. aureus*. No entanto, os *S. aureus* são geralmente muito tolerantes a NaCl e multiplicam-se bem em concentrações de NaCl até 10%. O crescimento é possível, embora retardado, mesmo em concentrações de NaCl até 20% (Hennekinne *et al.*, 2010).

Tabela 1 - *Staphylococcus coagulase*-positiva.

Espécie	Principais Fontes
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	Humanos e animais
<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>	Ovelhas
<i>S. intermedius</i>	Cão, cavalo, pombo
<i>S. hyicus</i>	Porco e aves
<i>S. delphini</i>	Golfinhos
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	Cão (auditivo externo)
<i>S. lutrae</i>	Lontra

Adaptada de Hennekinne *et al.* (2010).

2.2. Fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*

A capacidade de colonização e a patogenicidade do *S. aureus* são uma consequência dos seus fatores de virulência, os quais têm um papel relevante na adesão celular, na captação de nutrientes e na evasão da resposta imunológica do hospedeiro. Esses fatores de virulência podem ser classificados, basicamente, nas três seguintes categorias: a) fatores relacionados com a aderência às células do hospedeiro ou à matriz extracelular, como a produção de moléculas de fibrinogênio, fibronectina, colagênio ou da enzima coagulase; b) fatores relacionados com a evasão da defesa do hospedeiro, como diversas enterotoxinas estafilocócicas (SEs A-E, G-J, K, L, M, O e P), a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST), a proteína A, lipases e polissacáridos capsulares; e c) fatores relacionados com a invasão na célula do hospedeiro e a penetração nos tecidos ou adesão de superfícies de cateteres e próteses, os quais incluem as hemolisinas α , β , δ e γ as quais são toxinas de natureza proteica (Velázquez, 2005).

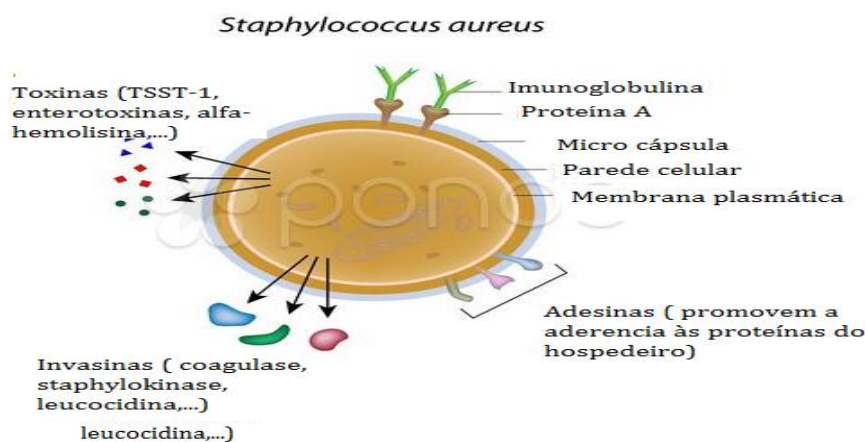


Figura 2.- Enzimas e toxinas produzidas pelo *S. aureus* que participam nos mecanismos de patogenicidade e de resistência

Fonte: Pond5 (2014).

O *S. aureus* contém ainda, na estrutura da sua parede celular, polissacarídeos e proteínas antigénicas, bem como outras moléculas importantes, as quais podem induzir uma resposta imunológica no hospedeiro. Entre essas outras moléculas podemos citar o ácido teicóico, o glicanopeptídeo, a proteína A, além da presença de cápsula e de adesinas (Santos *et al.*, 2007).

O elevado potencial infeccioso de *S. aureus* não está restrito apenas à sua facilidade de multiplicação e disseminação nos tecidos, mas também à produção de moléculas com grande poder patogénico, que incluem enzimas e toxinas (Tabela 2). As β -lactamases, coagulases, hialuronidasas e catalases são algumas das enzimas produzidas para esse fim. Além dessas enzimas, o *S. aureus* também produz DNAsas, lipases, proteases e esterases. Entre as toxinas produzidas por este microrganismo patogénico destacam-se as seguintes: as toxinas β , α e δ , aleucocidina, a esfoliatina, a toxina do choque tóxico e as enterotoxinas (Santos *et al.*, 2007).

Os diferentes tipos de toxinas produzidas por *S. aureus* podem induzir uma resposta imune, diferenciada para cada hospedeiro, que é responsável pelas manifestações clínicas características do processo infeccioso e que determina o grau de severidade dos sintomas provocados (Santos *et al.*, 2007).

Tabela 2- Enzimas e toxinas produzidas por *S. aureus* que participam nos mecanismos de patogenicidade e de resistência deste microrganismo patogénico

Nome	Classe	Função
Betalactamases	Enzima	Inativa os antibióticos betalactâmicos (exs.: penicilinas e cefalosporinas) pela abertura do anel betalactâmico (exs.: penicilinasas e cefalosporinasas)
Coagulase	Enzima	Converte o fibrinogénio em fibrina, independentemente da presença do íon Ca^{2+} e dos fatores V, VI e VII da coagulação sanguínea, provocando a deposição de fibrina em torno do microrganismo e dificultando a fagocitose celular
Hialuronidase	Enzima	Despolimeriza o ácido hialurónico, agindo, assim, como fator de propagação do microrganismo
Catalase	Enzima	Converte o peróxido de hidrogénio, que apresentaria uma ação tóxica sobre a bactéria, em oxigénio e água
Alfatoxina (alfa-hemolisina)	Toxina	Pode apresentar quatro conformações diferentes, sendo capaz de lisar hemácias e causar danos às plaquetas em casos de intoxicações graves
Betatoxina (beta-hemolisina)	Toxina	Degrada a esfingomielina, provocando lesões na membrana dos eritrócitos e, conseqüentemente, conduzindo à hemólise
Deltatoxina (delta-hemolisina)	Toxina	Possui propriedades tensoativas, atuando como detergente e sendo responsável pelos efeitos sobre as membranas de eritrócitos, macrófagos, linfócitos, neutrófilos e plaquetas. É capaz, ainda, de inibir a absorção de água pelo íleo, devido à alteração do mecanismo de ação do monofosfato de adenosina cíclico (AMP-c), desencadeando uma diarreia aguda
Gama-toxina (gama-hemolisina)	Toxina	Apresenta atividade hemolítica, cujo mecanismo ainda não foi devidamente estabelecido
PVL	Toxina	Composta por dois componentes protéicos (S e F), que atuam sinergicamente. Essa proteína altera a permeabilidade da membrana e ataca os leucócitos polimorfonucleares e os macrófagos. Essa alteração permite a entrada de cátions, como o Ca^{2+} , resultando na degranulação celular e induzindo a citólise
Esfoliatina	Toxina	Promove a clivagem do extrato granuloso da epiderme, causando síndromes cutâneas severas (síndrome da pele escaldada e impetigo bolhoso)
TSST-1	Toxina	Provoca febre, choque e envolvimento de sistemas orgânicos múltiplos, incluindo erupção cutânea descamativa
Enterotoxinas (A, B, C, D e E)	Toxina	Toxinas protéicas pirogénicas, termoestáveis, responsáveis pela intoxicação alimentar, podendo provocar vômitos e diarreias

Fonte: Velásquez (2005).

2.3. Intoxicação alimentar estafilocócica

Staphylococcus aureus é um dos agentes mais comuns em surtos de intoxicação alimentar. A intoxicação causada por *S. aureus* (SFPO) manifesta-se logo após a ingestão do alimento contaminado com enterotoxinas pré-formadas. A quantidade de enterotoxina necessária para causar a doença ainda não está bem estabelecida, mas sabe-se que depende da suscetibilidade do indivíduo, do peso corporal e, especialmente, do estado de saúde da pessoa acometida. Para a formação de enterotoxinas em quantidade suficiente para provocar intoxicação é necessária 10^5 a 10^6 unidades formadoras de colônias (UFC) de *S. aureus* por grama de alimento (Borges *et al.*, 2008a).

Cinco condições são necessárias para induzir SFPOs: (1) uma fonte de matérias-primas contendo enterotoxinas estafilocócicas; (2) transferência de estafilococos da origem para os alimentos (más práticas de higiene); (3) a composição alimentar com características físico-químicas favoráveis para a multiplicação de *S. aureus*; (4) a temperatura favorável e o tempo suficiente para a multiplicação de bactérias e produção de toxinas; e (5) a ingestão de alimentos que contenham uma quantidade suficiente de toxina para provocar sintomatologia (Hennekinne *et al.*, 2010).

A maioria das SFPOs surge devido a más práticas de higiene durante o processamento (da matéria-prima ao produto acabado) e/ou na distribuição do produto alimentar. Os *Staphylococcus* são encontrados em uma grande variedade de mamíferos e aves. A transferência de *S. aureus* para a alimentação tem duas fontes principais: fonte humana, durante o processamento de alimentos, e no caso dos laticínios, os animais com mastite (Pereira *et al.*, 1996).

A Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) e o Centro Europeu de Prevenção e Controlo das Doenças analisaram dados apresentados por 27 países da União Europeia sobre a ocorrência de zoonoses e surtos transmitidos por alimentos em 2012. Foram registados 5.363 surtos de origem alimentar, afetando 55.453 humanos, causando 5.118 hospitalizações e 41 mortes.

Quatorze estados membros relataram 346 surtos causados por toxinas estafilocócicas, o que representa 6,4% de todos os surtos relatados na UE. Isto é semelhante ao que sucedeu em 2011, quando 345 surtos foram relatados. O maior número de casos foi relatado por França, 300 (86,7 %). Em Portugal apenas foram descritos 2 (0,6%) (EFSA, 2014).

Os casos de SFPOs diferem muito entre países o que pode ser devido a diferenças no consumo e hábitos alimentares em cada um dos países (Ortega, 2010).

Analisando dados dos surtos de toxinfecções estudados pelos Laboratórios de Microbiologia do Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN) do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge em 2012 e 2013, verifica-se que o agente etiológico mais frequentemente isolado foi estafilococos coagulase positiva / enterotoxinas estafilocócicas (Figura 3) (Furtado *et al.*, 2014).

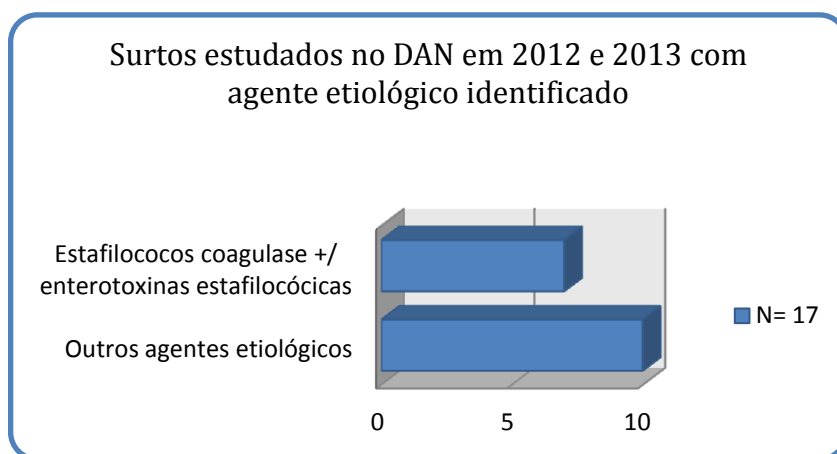


Figura 3 - Surtos estudados no DAN em 2012 e 2013 com agente etiológico identificado.
Fonte: Adaptado de Furtado *et al.* (2014).

Diferentes géneros alimentícios têm sido implicados na intoxicação alimentar estafilocócica, incluindo leite, produtos de pastelaria com creme, queijos, produtos de charcutaria, saladas, refeições cozinhadas, sanduíches e molhos. Devemos ter em conta que a pasteurização destrói os estafilococos mas não tem efeito sobre as enterotoxinas estafilocócicas (SEs). Este facto ilustra a importância da eliminação de qualquer fonte de contaminação durante o processamento e de um sistema controlado de refrigeração de matérias-primas e de géneros alimentícios (Furtado *et al.*, 2014). Neste estudo foram identificados muitos fatores isolados ou em combinação, responsáveis pelo aumento do número de *Staphylococcus* produtores de SEs: tempo de armazenamento longo, refrigeração inadequada, inadequado tratamento térmico, manipuladores de alimentos contaminados e ingredientes contaminados.

Produtos lácteos, bem como outros produtos com um elevado teor de proteínas, são um bom substrato para a multiplicação de *Staphylococcus aureus*. Tais produtos estão envolvidos em doenças transmitidas por alimentos devido a (ECHCP, 2003):

- Ocorrência de estafilococos coagulase positiva em leite cru;
- Contaminação cruzada durante o processo;
- Possível contaminação cruzada após o fabrico.

2.4. Enterotoxinas estafilocócicas

As enterotoxinas estafilocócicas (SE) são proteínas extracelulares de baixo peso molecular (22 a 29 kDa), hidrosolúveis e resistentes à ação de enzimas proteolíticas do sistema digestivo, tais como a pepsina, permanecendo ativas após a ingestão. Outra característica importante é a sua termoestabilidade, sendo capazes de resistir a tratamentos térmicos como a pasteurização e a ultrapasteurização (Rahimi e Forough, 2013). O número de enterotoxinas tem-se expandido pela deteção de novos genes e, até ao momento, já foram identificados 18 tipos distintos, mas com similaridade na estrutura e sequência. As clássicas SEA, SEB, SEC, SED e SEE são as de maior ocorrência. Outras treze enterotoxinas, SEG, SEH,

SEI, SEJ, SEK, SEL, SEM, SEN, SEO, SEP, SEQ, SER e SEU) foram identificadas bem como os seus genes correspondentes foram descritos (*seg, seh, sei, sej, sek, sel, sem, sen, seo, sep, seq, ser e seu*) (Borges *et al.*, 2008a).

As enterotoxinas estafilocócicas são codificadas por genes presentes em bacteriófagos (SEA, SED, SEE e SEJ), plasmídios (SEH e SEP), cromossomas (SEH e SEP) e ilhas de patogenicidade cromossomal, a exemplo de SEB, SEC, SEG, SEGV, SEI, SEI, SEM, SEN, SEO, SEK, SEL e SEQ (Su e Wong, 1995).

S. aureus pode produzir uma ou mais SEs simultaneamente e, apesar deste patógeno ser produtor de uma grande variedade de SE, 95% dos surtos são causados pelas enterotoxinas A, B, C, D e E (Zocche *et al.*, 2009).

Tabela 3 - Características das enterotoxinas estafilocócicas mais comuns.

Enterotoxina estafilocócica	Gene enterotoxigénico	Caraterística
SEA	<i>sea</i>	Toxina mais comumente associada com Intoxicação alimentar
SEB	<i>seb</i>	Estudada como arma biológica
SEC	<i>sec</i>	Isolada em animais
SED	<i>sed</i>	A mais identificada em Intoxicação alimentar a seguir à SEA
SEE	<i>see</i>	Intoxicação alimentar
SEF	<i>sef</i>	Associada ao síndrome do choque tóxico
SEG	<i>seg</i>	Reduzido papel em intoxicação alimentar
SEH	<i>seh</i>	Intoxicação alimentar
SEI	<i>sei</i>	Reduzido papel em intoxicação alimentar

Adaptada de Pinchuck *et al.* (2010).

O isolamento e determinação da enterotoxigenicidade das estirpes de *Staphylococcus* isoladas em alimentos indicam o potencial para a produção de enterotoxinas. Além disso, a presença do microrganismo em altos níveis pode indicar o uso inadequado do binómio tempo-temperatura no processamento e/ou armazenamento dos alimentos, condição em que *S. aureus* pode desenvolver-se até níveis suficientes para produzir enterotoxinas em concentração capaz de causar doença (Zocche, 2008).

A determinação do tipo de SEs é um fator importante na investigação epidemiológica de casos e surtos da doença e a sua identificação nos alimentos pode indicar a possível fonte de contaminação. Foi demonstrado que SEA e SEB estão associadas com a contaminação de origem humana, através de manipuladores de alimentos, e que SEC e SED estão associadas com contaminação a partir de animais (Zocche, 2008).

O gene *femA* tem sido explorado como marcador específico de *S. aureus* em testes baseados em pesquisa de DNA. Esse gene codifica um fator essencial para a resistência à

metecilina e está universalmente presente em todas as estirpes de *S. aureus*. A amplificação do gene *femA* ou parte dele por PCR constitui uma ferramenta útil na diferenciação de espécies de *Staphylococcus* podendo ser uma alternativa rápida e segura para a identificação desta bactéria (Mehrotra *et al.*, 2000).

2.5. Fatores que afetam a multiplicação e a sobrevivência de *S.aureus* e a produção e destruição de enterotoxinas estafilocócicas

Diversos são os fatores que podem afetar a multiplicação e a sobrevivência de *S.aureus* e a produção de enterotoxinas estafilocócicas. Podem-se destacar a temperatura, o pH, a actividade da água, as radiações e a atmosfera gasosa.

A multiplicação bacteriana de *S. aureus* é óptima entre 35 a 45°C, estipulando-se os seus limites entre 7 e 48°C.

S.aureus é muito resistente à congelação e descongelação e sobrevive em alimentos conservados a temperaturas menores ou iguais a -20°C contudo, a temperaturas de -10 a 0°C a viabilidade destas bactérias decresce notavelmente durante a conservação por congelamento. Assim, tal como as bactérias, as toxinas estafilocócicas demonstram ser bastante resistentes e estáveis à congelação (Fonte, 2012).

A produção de enterotoxinas ocorre numa gama mais estreita de temperaturas, uma vez que esta afeta a qualidade e a taxa de produção das mesmas. A temperatura mínima para a produção de enterotoxinas é de aproximadamente 10°C. A esta temperatura, a taxa de produção de enterotoxina é muito lenta. A temperatura máxima é 45°C, contudo este limite pode ser aumentado em vários graus na presença de cloreto de sódio a 1M. *S. aureus* é facilmente destruído pelas temperaturas de pasteurização ou através de processos de esterilização dos alimentos, todavia as enterotoxinas são extraordinariamente resistentes aos vários tratamentos térmicos (Fonte, 2012).

S. aureus pode multiplicar-se num intervalo de pH entre 4 e 10. Na presença de ácidos inorgânicos, tais como o HCl, pode multiplicar-se a um valor de pH inferior a 4,3, porém na presença de ácidos orgânicos os limites de pH são aumentados. A produção de enterotoxinas surge num intervalo análogo, não oscilando muito dos valores estipulados para a multiplicação bacteriana (ICMSF, 1996).

S. aureus é um dos contaminantes alimentares mais tolerante, cresce a uma actividade da água tão reduzida como 0,85, contudo o crescimento óptimo ocorre a um a_w de 0,98 (ICMSF, 1996). É facilmente destruído pelas radiações ionizantes e não ionizantes. As enterotoxinas são extremamente resistentes às radiações gama e não são destruídas pelas doses utilizadas na esterilização dos alimentos. Em relação à atmosfera gasosa, *S. aureus* cresce em aerobiose e em anaerobiose, contudo o crescimento é mais lento em anaerobiose. Em anaerobiose toleram uma gama mais ampla de temperaturas e de pH. No entanto a destruição de ambas é dificultada em condições anaeróbicas (Hui *et al.*, 2001).

Na Tabela 4 encontram-se resumidos os principais fatores que afetam a multiplicação bacteriana e a produção de toxinas.

Tabela 4 -Fatores que afetam a multiplicação e a produção de enterotoxinas por *S. aureus*.

Fatores	Multiplicação do microrganismo		Produção de enterotoxinas estafilocócicas	
	Ótimo	Variação	Ótimo	Variação
Temperatura	37°C	7-48°C	40-45°C	10-48°C
pH	6-7	4-10	7 - 8	4-9,6
Actividade da água (a _w)	0,98	0,83 - 0,99*	0,98	0,85 - 0,99**
NaCl (%)	0-4	0-20	0-0,5	0-10
Potencial redox (Eh)	>+200mV	< - 200 mV a > +200 mV	>+200mV	< -100mV a >+200Mv
Atmosfera	Aeróbica	Anaeróbica - Aeróbica	Aeróbica (5-20% O ₂ dissolvido)	Anaeróbica - Aeróbica

*Aeróbica (anaeróbica 0,90 - 0,99) **Aeróbica (anaeróbica 0,92 - 0,99)

Adaptada de ECHCP(2003) e ICMSF (1996).

Na Tabela 5 encontram-se os fatores que afetam a destruição de *S. aureus* e enterotoxinas.

Embora estes fatores sejam os mais referenciados e estudados, não são os únicos que interferirem na multiplicação bacteriana e na produção ou inibição da produção de enterotoxinas. A presença de certos aminoácidos e açúcares e a competição microbiana têm sido alvo de estudo. Aminoácidos como a valina, arginina e a cistina estão estritamente implicados na multiplicação do microrganismo e na produção de enterotoxinas em algumas estirpes de *S. aureus*, nomeadamente SEA, SEB e SEC. Já a glucose demonstrou ter um efeito inibitório sobre a produção de SE, especialmente para SEB e SEC. Este efeito inibitório foi atribuído a uma queda de pH, como consequência do metabolismo da glucose (Onoue, 1997).

S. aureus também é bastante sensível à competição microbiana, tendo-se demonstrado que quanto maior a concentração de microrganismos acompanhantes, menor a taxa de multiplicação de *S. aureus* e a produção de enterotoxinas. Este acontecimento tem sido particularmente estudado em leites e queijo (Vernozy-Rozand *et al.*, 1998).

Tabela 5 - Fatores que afetam a destruição de *S. aureus* e a produção de enterotoxinas

Fator	<i>S. aureus</i>	Enterotoxinas
Calor	Caldo de carne (D _{60°C}) 0,43 - 8min.	Caldo de carne (D _{121°C}) 3 - 8min.
	Leite (D _{60°C}) 3,16 - 3,29	-
Irradiação (D - KGy)	0,1 - 0,6	>30
Secagem, refrigeração, congelamento, armazenamento à temperatura ambiente	Resistente	Resistente
Desinfecção		
Álcool (MIC - MBC)	20-40%	NA
Cloro (MBC)	0,1µg/L	NA
QAC (MIC - MBC)	0,2 - 50µg/L	NA

MBC: Concentração Mínima Bacteriológica ; MIC: Concentração Mínima inibitória; QAC: compostos de amónio quaternário; NA: não aplicável

Adaptada de ECHCP (2003)

2.6. Métodos de Detecção de Enterotoxinas

Muitos métodos têm sido desenvolvidos para a deteção de enterotoxinas, os quais se resumem a ensaios biológicos e ensaios imunológicos. Os ensaios biológicos implicam testes em animais, o que é dispendioso, complexo e levantava muitas questões éticas. Os ensaios imunológicos são mais sensíveis e específicos (Santiliano *et al*, 2011).

Os métodos imunológicos, são mais sensíveis, específicos, práticos, rápidos e bem vistos quando há a necessidade de analisar um grande número de amostras, embora necessitem de equipamentos específicos, reagentes e de padronização para que os resultados possam ser analisados com confiabilidade (Santiliano *et al*, 2011).

O método ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) é uma ferramenta fundamental na deteção de agentes biológicos. Baseado nos princípios de interações antigénio-anticorpo, o método ELISA permite uma fácil visualização de resultados e pode ser finalizado sem a adição de materiais radioativos (Khan *et al*, 2003). Uma variedade de técnicas qualitativas para deteção dessas toxinas está disponível no mercado. A sensibilidade dessas técnicas difere e o menor limite de deteção tem sido de 0,1 ng/mL de enterotoxina B estafilocócica (SEB) com o kit SET-EIA (*enzyme immunosorbent assay*) (Santiliano *et al*, 2011).

A técnica *Western blot* supera alguns dos problemas associados com os ensaios de ELISA. O *Western blot* é um método amplamente usado para análise de proteínas e, assim, tem sido usado para detetar SEA e SEC. Num imunoblot, as proteínas são separadas por tamanho usando a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) ou por ponto isoelétrico usando gel de focagem isoelétrica (eletroforese na qual um gradiente de pH é estabelecido num gel e as proteínas migram até alcançarem um local no qual o pH é igual ao seu ponto isoelétrico), transferido para uma membrana, que é depois incubada com anticorpos específicos (Santiliano *et al*, 2011).

Um dos métodos de referência, a imunodifusão ou técnica de Ouchterlony, foi desenvolvida por Casman. Requer três a dez dias para a obtenção dos resultados. Neste método, a proteína e um anticorpo específico difundem por um gel e a reação entre ambos forma uma linha de precipitação característica de positividade. É um método que deteta cerca de 500 ng/mL de enterotoxina no material suspeito (Casman *et al.*, 1969). Esta técnica está aprovada pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), adotada pela *Food and Drug Administration* (FDA) e é recomendada como método padrão para avaliação de novos ensaios (Santiliano *et al.*, 2011).

Os testes de aglutinação em látex têm sido utilizados para vários alvos e, apesar de não serem métodos padrão de deteção, têm mostrado alta sensibilidade e especificidade. Em comparação com outros métodos de deteção são mais rápidos (o tempo varia de um minuto a dezasseis horas), económicos e fáceis de utilizar, além de não necessitarem de técnicos especializados para a sua realização, equipamentos sofisticados ou reagentes de custos mais elevados (Lee *et al.*, 2004).

Neste teste, o anticorpo específico adsorvido ou ligado covalentemente ao látex é misturado com a amostra suspeita e é monitorizado se há ou não aglutinação. A presença de antigénio na amostra permite o seu reconhecimento pelo anticorpo e aglutinação do complexo formado no látex. Existem algumas modificações do teste, nas quais se utiliza látex colorido ou magnetizado (Santiliano *et al.*, 2011).

Como técnica moderna da Biologia Molecular, a PCR (*polymerase chain reaction*) também tem sido utilizada na detecção dos genes que codificam enterotoxinas. Ela faz-se de forma específica, porém, a amplificação das sequências não é evidência da toxina no material biológico. Apesar de ser executado em horas, uma vantagem deste método é o facto de possuir uma alta sensibilidade e precisão, mesmo numa amostra com baixa concentração de microrganismos (Santiliano *et al.*, 2011).

2.7. Reação de polimerização em cadeia (PCR)

A técnica da reação em cadeia da polimerase, PCR, foi desenvolvida por Kary Mullis nos anos 80, o que lhe propiciou o prémio Nobel de Química em 1994.

A reação PCR é uma das técnicas mais usadas nas diversas áreas de diagnóstico molecular. A sua introdução resultou numa grande revolução tecnológica, permitindo a amplificação de uma sequência de interesse contida em uma amostra complexa de DNA e possibilitou a adoção de métodos automatizados para a análise do genoma. A tecnologia da reação em cadeia da polimerase também é bastante flexível, permitindo uma série de modificações que possibilitam o seu emprego na análise de uma grande variedade de amostras (Molina e Tobo, 2004).

Para a realização da PCR, utiliza-se uma enzima termoestável (DNA polimerase) que, na presença de um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e dos nucleotídeos que compõem a molécula de DNA, amplifica a região de interesse a partir de uma pequena quantidade de DNA. Esta amplificação ocorre durante repetidos ciclos de temperatura, a saber: 94°C para desnaturação do DNA, 45°C a 70°C para hibridização dos oligonucleotídeos às sequências-alvo e 72°C para a síntese do DNA, em equipamentos chamados de termocicladores. O DNA amplificado pode, então, ser separado e visualizado em géis de agarose ou poliacrilamida e utilizado para diversos fins. Entre as principais técnicas resultantes de modificações da reação em cadeia da polimerase, podemos citar o RT-PCR, nested PCR, multiplex PCR, PCR a partir de *primers* aleatórios e PCR em tempo real (Molina e Tobo, 2004).

2.8. Suscetibilidade a antibióticos

2.8.1. Classificação dos antibióticos

Os antibióticos são agentes com toxicidade seletiva contra microrganismos invasores externos (bactérias e fungos). O antibiótico ideal é aquele que interfere na função vital da bactéria sem comprometer as células do hospedeiro (Medley, 2007).

Os antibióticos ideais definem-se por diversas características, tais como: alvo seletivo; alcançar rapidamente o alvo; bactericida; espectro estreito de forma a não afetar a flora saprófita; com baixo nível tóxico e elevados níveis terapêuticos; poucas reações adversas, quer seja toxicidade ou alergia; várias vias de administração, tais como, oral, intravenosa (IV) e intramuscular (IM). Deve ter uma boa absorção e caso seja administrado por via oral, ter uma boa absorção intestinal, boa distribuição no local de infeção e ser um antibiótico pró-hospedeiro, isto é, que não contrarie as defesas imunológicas, não deve induzir resistências e deve ter uma boa relação custo/eficácia. No entanto nem todas estas características

conseguem ser obtidas, pois a relação entre os antibióticos e as bactérias não é linear (Katzung, 2007).

Em relação à sua ação sobre bactérias, um antibiótico pode ser classificado em bactericida ou bacteriostático. No primeiro caso, inativa e destrói os microrganismos. São exemplos de drogas bactericidas: aminoglicósidos, quinolonas, penicilinas, cefalosporinas. No caso do antibiótico bacteriostático, este controla o crescimento bacteriano ao inibir a sua multiplicação, ou seja, apenas impede a sua multiplicação, não permitindo a evolução ao estado infeccioso. A eliminação do microrganismo neste caso depende da imunidade do paciente. São exemplos de drogas bacteriostáticas: sulfonamidas, trimetropim, cloranfenicol, tetraciclina, nitrofurantóina (Medley, 2007).

A classificação mais comum dos antibióticos baseia-se no seu mecanismo de ação. Assim são descritos cinco mecanismos de ação, tal como representado na Figura 4 (Tenover, 2006):

- I) Inibição da síntese da parede celular;
- II) Inibição da síntese ou danos da membrana citoplasmática;
- III) Inibição da síntese proteica nos ribossomas;
- IV) Alterações na síntese dos ácidos nucleicos
- V) Alteração do metabolismo celular.

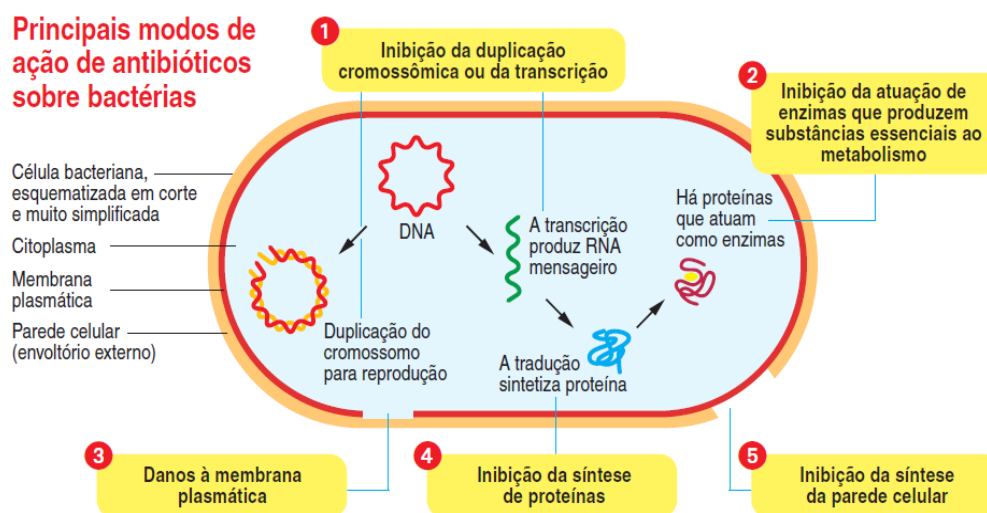


Figura 4- Principais modos de acção de antibióticos sobre bactérias.

Fonte: Tenover (2006).

I. Antibióticos que inibem a síntese da parede celular

Para a sobrevivência de qualquer bactéria é essencial manter a integridade da parede celular, sendo importante referir que a parede celular das bactérias Gram-positivas e das bactérias Gram-negativas é diferente. A parede celular é suficientemente flexível em virtude da sua estrutura entrelaçada do seu principal constituinte, o peptidoglicano, com um elevado índice de ligações cruzadas, contudo existem antibióticos que impedem a formação completa do peptidoglicano o que leva à lise da célula bacteriana (Baptista, 2013).

São exemplo de antibióticos com ação ao nível da síntese do peptidoglicano os antibióticos β -lactâmicos e os glicopéptidos (Tabela 6).

Tabela 6 - Antibióticos que inibem a síntese da parede celular.

Classe	Substância	Mecanismo de ação	
β-lactâmicos	Penicilina	•PenicilinaG (benzilpenicilina) •Penicilina v •Ampicilina •Amoxicilina •Oxacilina •carbenicilina	Atividade bactericida por inibição da síntese do peptidoglicano da parede celular e ativação do sistema autolítico da bactéria, determinando a sua lise e posterior morte.
	Cefalosporina 1^a geração	•Cefalexina •Cefadroxila •Cefalotina •Cefazolina	Preferencialmente sobre bactérias Gram - positivas através da lise da parede.
	Cefalosporina 2^a geração	•Cefactor •Cefuroxina •Cefprozil •Cefoxitina	
	Cefalosporina 3^a geração	•Ceftriaxona •Cefotaxima •Cefodizima •Cefetamet •Cefixima •Cefpodoxima •Cefoperazona •Ceftazidina	Ação bactericida ao unir-se às proteínas da membrana citoplasmática. Apresentam boa atividade sobre bactérias Gram-negativas.
	Cefalosporina 4^a geração	•Cefepima •Cefpiroma	Inibe a síntese da parede mas possui maior afinidade pelas proteínas de ligação à penicilina presentes na parede das bactérias Gram-negativas.
	Carbapenêmicos	•Imipenem •Meropenem	Inibe a síntese da parede celular e apresenta amplo espectro de ação.
	Monobactâmicos	•Aztreonam	Bactericida contra bacilos Gram-negativos. Age na síntese da parede celular.
	Inibidor da Betalactamase	•Ácido clavulônico	Inibe a beta - lactamase, enzima responsável pela degradação do antibiótico. Deve ser usado em associação, pois possui baixa atividade.
Glicopeptídeos	•Vancomicina	Bactericida atuando na inibição da síntese da parede celular.	

Adaptado de Medley (2007).

II. Antibióticos que inibem a síntese da membrana citoplasmática

Existem antibióticos que conseguem desorganizar a membrana citoplasmática, podendo ser agentes aniônicos, catiónicos ou neutros (Tabela 7). As polimixinas são disto exemplo, uma vez que são moléculas anfipáticas tensoactivas, pois contêm grupos tanto lipofílicos como lipofóbicos. Estas interagem com as moléculas de polissacárido presente na membrana externa, retirando o cálcio e magnésio necessários à estabilidade da mesma. A permeabilidade na membrana modifica-se imediatamente em contacto com o fármaco e a subsequente entrada de água na célula causa a sua destruição (Baptista, 2013).

Tabela 7 - Antibióticos que inibem a síntese da membrana citoplasmática.

Classe	Substância	Mecanismo de ação
<u>Polimixinas</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Polimixina c ou colistina • Polimixina E 	Desorganizam a membrana citoplasmática, podendo ser agentes aniões, catiões ou neutros.

Fonte: Infarmed (2013).

III. Antibióticos que inibem a síntese proteica nos ribossomas

Os ribossomas bacterianos são organelos celulares constituídos por duas subunidades, 30s e 50s, onde ocorre a ligação dos fármacos de forma a inibir ou modificar a síntese proteica (Katzung, 2007).

Na Tabela 8 encontram-se descritas as classes de antibióticos que inibem a síntese proteica nos ribossomas.

Tabela 8 - Antibióticos que inibem a síntese proteica nos ribossomas.

Classe	Substância	Mecanismo de ação
<u>Aminoglicósidos</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Neomicina • Gentamicina • Tobramicina • Amicacina • Netilmicina • Estreptomicina 	Inibem a síntese de proteínas. A sua penetração é dependente do transporte ativo de oxigénio, por isso possuem baixa ação contra microrganismos anaeróbios.
<u>Macrólidos</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Azitromicina • Claritromicina • Eritromicina • Troleandomicina 	Inibem a síntese de proteínas ligando-se à subunidade 50s do ribossoma bacteriano.
<u>Cloranfenicol</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Cloranfenicol 	Inibem a síntese de proteínas ligando-se à subunidade 50s do ribossoma bacteriano.
<u>Tetraciclina</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Tetraciclina • Oxitetraciclina • Doxiciclina • Minociclina 	Bacteriostática ao inibir a síntese de proteínas. Atuam sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.
<u>Lincosamidas</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Clindamicina 	Ativa contra cocos Gram-positivos. Inibe a síntese de proteínas. Semelhante ao cloranfenicol e macrólidos.

Adaptado de Medley (2007).

IV. Antibióticos que inibem a replicação do DNA ou a transcrição

Este grupo de antibióticos inibe a duplicação do cromossoma bacteriano (impedindo a reprodução do microrganismo) ou a transcrição do DNA em RNA mensageiro (fonte de informação para a síntese proteica).

Os antibióticos que interferem nesta inibição são as quinolonas, tal como descrito na Tabela 9.

Tabela 9- Antibióticos que inibem a duplicação cromossômica ou a transcrição.

Classe	Substância	Mecanismo de ação
Quinolonas	<ul style="list-style-type: none"> •Norfloxacin •Ciprofloxacina •Pefloxacina •Ofloxacina •Enoxacin •Levofloxacina 	Bactericidas. Interferem na síntese de DNA bacteriano inibindo a DNA-girase.

Adaptado de Medley (2007).

V. Antibióticos que alteram o metabolismo celular

Há antibióticos que imitam substâncias usadas pela célula bacteriana e se ligam a enzimas, inibindo-as. O metabolismo celular retratado neste ponto é a síntese do ácido fólico, que pode ser inibido pelas sulfonamidas ou da sua combinação com o trimetoprim. Estes antibióticos inibem a produção de ácido fólico, essencial à multiplicação bacteriana (Tabela 10). Os microrganismos sensíveis são todos aqueles que precisam de sintetizar o seu próprio ácido fólico. Os outros não são afetados pois são capazes de utilizar o folato pré-formado (Katzung, 2007).

Tabela 10 - Antibióticos que alteram o metabolismo celular.

Classe	Substância	Mecanismo de ação
Sulfonamidas	<ul style="list-style-type: none"> • Sulfadiazina • Sulfadimidina • Sulfametoxazol • Sulfametopirazina • Sulfassalazina 	Essencial à síntese do folato que é necessário para a formação do DNA e RNA.

Adaptado de Medley (2007).

2.8.2. Resistência aos antibióticos

A resistência a agentes antimicrobianos é um fenômeno comum na natureza decorrente da competição pela sobrevivência entre as espécies. A grande maioria dos antimicrobianos utilizados como tratamento médico ou veterinário é produzido por um grupo de bactérias denominado actinomicetos. Cerca de 85% dos antibióticos são moléculas originárias ou derivadas de compostos deste grupo. O microrganismo produtor de antibiótico deve apresentar também mecanismo de proteção contra a sua ação. Acredita-se que os genes de resistência originários de microrganismos produtores de antibióticos sejam a origem da disseminação da resistência através da transferência de material genético. Portanto, antes da introdução de agentes antimicrobianos na medicina, a resistência bacteriana já existia mesmo que em níveis baixos. Contudo, a partir da introdução da penicilina e de mais antibióticos, os níveis de resistência têm aumentado mundialmente (Martins, 2012).

Há um certo número de maneiras pelas quais os microrganismos se podem tornar resistentes aos agentes antimicrobianos (Figura 5). Estes incluem: 1) as bactérias produzem enzimas para destruir o agente antimicrobiano antes de atingir o seu alvo ou modificar a droga de forma a não ser reconhecido pelo alvo; 2) a parede da célula tornar-se impermeável ao agente antimicrobiano; 3) o local-alvo ser alterado por mutação, de modo que já não se liga ao agente antimicrobiano; 4) as bactérias possuem uma bomba de efluxo que expelle o

agente antimicrobiano a partir da célula antes que ele possa atingir o seu objectivo; e 5) as vias metabólicas específicas em que as bactérias são geneticamente alteradas de modo a que o agente antimicrobiano não pode exercer um efeito (Coyle, 2005).

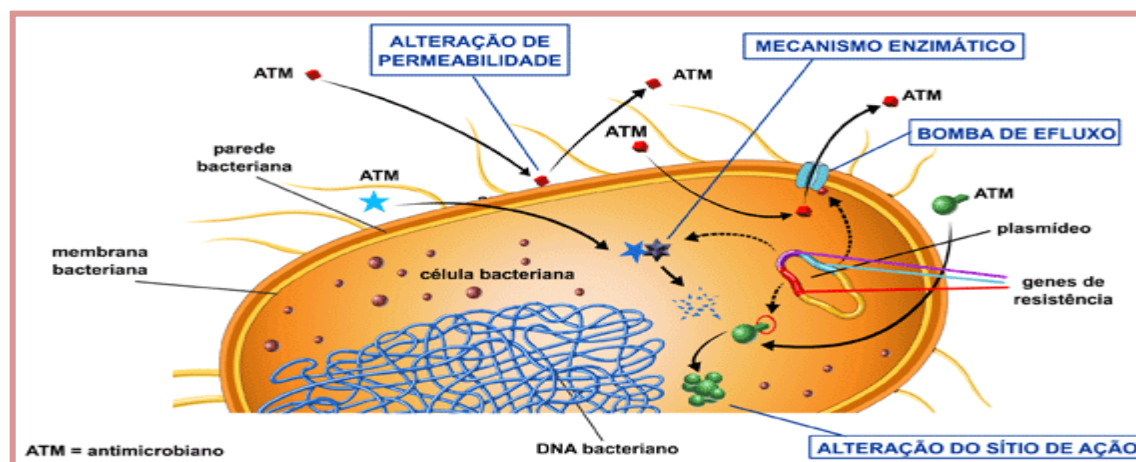


Figura 5 - Mecanismos de resistência a antibióticos.
Fonte: Anvisa (2014).

Existem dois tipos de resistência a antimicrobianos: a inata, refere-se a uma resistência que a estrutura da bactéria já possui para determinado antibiótico, e a adquirida, que ocorre quando a bactéria entra em contato com o antibiótico e se torna insensível ao mesmo, por exemplo após um tratamento inadequado. Nesse caso, essas bactérias sobreviventes guardam a informação de resistência no seu DNA, podendo transmitir essa informação à sua descendência (Coyle, 2005).

As bactérias também podem adquirir resistência aos agentes antimicrobianos por acontecimentos genéticos, tais como mutação, conjugação, transformação, transdução e transposição (Coyle, 2005).

Os alimentos são um importante fator para a transferência de resistências aos antibióticos. Essa transferência pode ocorrer pela presença de resíduos de antibióticos em alimentos, através da transferência de microrganismos patogênicos de origem alimentar resistentes ou através da ingestão de estirpes resistentes da microflora original do alimento e resistência transferida de microrganismos patogênicos (Pereira *et al.*, 2009).

A presença de microrganismos resistentes a antibióticos está diretamente relacionada com o uso indiscriminado desses agentes no tratamento de doenças (automedicação e uso incorreto em tratamentos sem diagnóstico estabelecido), bem como na pecuária, onde são muitas vezes utilizados para o aumento das taxas de crescimento em animais de produção (Gandra *et al.*, 2009).

O uso de antibióticos em animais produtores de alimentos pode afetar a saúde humana pela presença de resíduos em alimentos e, particularmente, pela seleção de bactérias resistentes, em animais. As consequências de tal seleção incluem (WHO, 2001):

- Um aumento do risco de microrganismos patogênicos resistentes serem transferidos para os seres humanos por contacto direto com animais ou através do consumo de alimentos ou água contaminados;
- A transferência de genes de resistência a partir de animais à flora bacteriana humana.

Fatores associados com o surgimento da resistência aos antibióticos em animais produtores de alimentos e na indústria agrícola parecem ser semelhantes aos responsáveis pela resistência nos humanos, aumentando assim o risco de surgimento e propagação de bactérias resistentes, incluindo as capazes de causar infecções em animais e seres humanos (WHO, 2014).

A inadequada compreensão sobre o uso apropriado e os efeitos do uso inadequado de antibióticos são comuns entre os agricultores, veterinários prescritores e distribuidores (WHO, 2001).

De uma maneira geral, os microrganismos de importância médica têm-se tornado cada vez mais resistentes, sendo que os seus índices de resistência variam de acordo com o país ou região e com o uso de determinados agentes antimicrobianos. Contudo, os estafilococos, particularmente *S. aureus* apresentam resistência amplamente difundida pelo mundo (Tavares, 2000).

2.8.3. Mecanismo de resistência de *Staphylococcus*

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

Staphylococcus aureus possui três mecanismos distintos de resistência à meticilina: a) hiperprodução de betalactamases; b) presença de uma proteína de ligação à penicilina (PBP, *protein binding penicilin*) alterada, denominada PBP2a; c) modificações na capacidade de ligação das PBPs. Os três mecanismos podem estar presentes numa mesma amostra, podendo inclusive interagir entre si (Souza, 2005).

Staphylococcus aureus possui cinco PBPs. As PBPs são enzimas que catalisam a etapa terminal da síntese da parede bacteriana e se localizam na membrana celular da bactéria. As PBP 1, 2 e 3 são essenciais e têm alta afinidade com os antibióticos β -lactâmicos, unindo-se a esses por ligações covalentes. A resistência à meticilina em estafilococos é devida à produção de uma PBP adicional, anômala, denominada PBP 2a, que apresenta baixa afinidade com os antibióticos β -lactâmicos. Esta proteína alterada é codificada por um gene cromossômico denominado *mecA*, que é responsável pela resistência intrínseca dos estafilococos meticilina resistentes (MRSA) a todos os antibióticos β -lactâmicos. O gene *mecA* faz parte de uma ilha genômica de resistência chamada *staphylococcal cassette chromosome mec* (SCCmec) (Serafim, 2013).

A maioria das infecções hospitalares é causada por estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA). Além disso, devido à emergente multiresistência a outros antibióticos, essas infecções tornaram-se uma causa amplamente conhecida de morbidade e mortalidade no mundo, por restar uma escolha limitada de princípios ativos para o seu controle (André *et al.*, 2008).

2.8.4. Testes de sensibilidade a antibióticos

Os testes de sensibilidade a antibióticos (TSA) são indicados para qualquer organismo que cause um processo infeccioso que requeira terapia antimicrobiana, sempre que a sua sensibilidade não possa ser predita de maneira confiável com base na identificação do organismo. Os TSA são indicados, com maior frequência, quando se acredita que o organismo causador da infecção pertence a uma espécie capaz de demonstrar resistência aos agentes antimicrobianos normalmente usados (CLSI, 2012).

Além de orientar a escolha do antibiótico mais adequado, os TSA representam uma importante ferramenta na monitorização da evolução da resistência bacteriana e agem também como um método auxiliar na implementação de medidas de controlo que evitem a disseminação de bactérias multirresistentes.

O objetivo destes testes é prever, através da realização de provas *in vitro*, a probabilidade de sucesso terapêutico no uso de antibióticos avaliados no tratamento de infeções causadas pelo microrganismo a ser testado (CLSI, 2012).

Todas as etapas envolvidas na realização dos TSA, desde a seleção dos antimicrobianos a serem testados até a interpretação dos resultados, são padronizadas por organizações especializadas como (Anvisa, 2014):

- *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, EUA);
- *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* (BSAC, Reino Unido);
- *Comité de L'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie* (CA-SFM, França).

Estas organizações elaboram documentos de consenso, gerados por diversos especialistas, que apresentam recomendações detalhadas sobre a realização e interpretação dos testes de sensibilidade.

O desenvolvimento de novos e variados mecanismos de resistência pelos microrganismos tem gerado o surgimento de um número cada vez maior de antibióticos. Hoje, existe uma variada gama de métodos convencionais (Anexo I) e automatizados que avaliam o perfil bacteriano de suscetibilidade a antibióticos.

Nos métodos convencionais, a metodologia de disco-difusão ou Kirby - Bauer é a mais difundida e utilizada até hoje, devido à sua facilidade de execução, baixo custo e fiabilidade de resultados. Apesar da sua simplicidade de execução, a técnica de Kirby-Bauer exige que as normas sejam seguidas com rigor de forma a que os resultados possam ser comparados com as tabelas internacionais (PNCI, 2004). As normas utilizadas, normalmente são as recomendadas pelo Clinical And Laboratory Standars Institute (CLSI). As tabelas do CLSI são atualizadas anualmente num processo contínuo que se reflecte nos procedimentos, métodos e protocolos, estando em vigor a M100-S22.

Exemplos de sistemas automatizados são: Vitek® e Vitek-2® (bioMérieux), Walk-Away® (Dade International), BD Phoenix® (BD Biosciences) eSensititre ARIS-2® (Trek Diagnostic Systems). Estes sistemas têm como vantagens: a maior rapidez na emissão dos resultados; a padronização intra e interlaboratorial; capacidade para realizar simultaneamente a identificação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e unir os resultados de identificação e do TSA em um único relatório; e a disponibilidade de programas de software adicionais como o Impact (Vitek®) e o PharmLink (Walk-Away®), os quais permitem a

redução do trabalho manual, bem como o envio dos relatórios simultaneamente para a farmácia hospitalar (Jorgensen e Ferraro, 2009).

Contudo, estes sistemas são onerosos, não fornecem o resultado exato da CIM e, por apresentarem um período de incubação curto, as bactérias que possuem mecanismos de resistência induzíveis podem não ter o tempo suficiente para expressar o respectivo mecanismo de resistência e serem interpretadas por estes sistemas como sensíveis a um determinado antimicrobiano, quando na verdade são resistentes (Jorgensen e Ferraro, 2009).

O antibiograma é uma técnica microbiológica que determina a sensibilidade ou resistência bacteriana a um ou mais antibióticos. O seu objetivo não é apenas analisar o espectro de sensibilidade e resistência das bactérias às drogas, mas também determinar a concentração mínima inibitória (CMI), ou seja, a concentração mínima do antibiótico necessária para inibir a multiplicação de um isolado bacteriano (Centerlab, 2009).

A realização do antibiograma e sua interpretação não é uma tarefa fácil, pelas suas limitações e principalmente pela crescente descoberta de novos mecanismos de resistência, o que exige cada vez mais atualização e experiência dos profissionais (Laborclin, 2011).

3. Material e Métodos

3.1. Amostras bacterianas

Foram analisados 121 isolados bacterianos de *Staphylococcus* coagulase positiva, dos quais 95 provieram de queijos com diferentes tempos de maturação e produzidos com leite cru de ovelha em duas queijarias, uma localizada na localidade de Zebras (isolados com a referência Z) e outra na localidade da Soalheira (isolados com a referência S). Os restantes isolados (n=26) provieram de diferentes origens: 9 isolados de leite de vaca, 5 de leite de ovelha, 2 de leite de cabra, 3 de bolo jesuíta, 3 de salmoura, 2 de cozido à portuguesa e 2 de salada de atum.

Todos os isolados em estudo foram obtidos em trabalhos realizados anteriormente no Laboratório de Microbiologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco e crioconservados a -80°C (os 95 isolados de queijo em caldo de triptona soja com 15% de glicerol e os restantes isolados em 50% de água mais 50% de glicerol).

3.2. Provas da coagulase, hemólise e DNase

Todos os isolados foram primeiramente sujeitos à prova da coagulase para confirmação desta característica, a qual esteve na base da seleção dos isolados usados neste estudo. Todos os isolados foram igualmente sujeitos à prova da hemólise e, a um grupo selecionado de isolados, foi efetuada a prova da DNase.

Para todas as provas realizadas foi usada cultura jovem, com 18 a 24 horas de incubação, previamente inoculada em meio de cultura não seletivos (Agar Nutritivo-AN).

3.2.1. Prova da coagulase

Para avaliar a capacidade de produção da enzima coagulase por parte de todos os isolados foi usado o meio de cultura Baird-Parker (BP) Agar com o suplemento *Rabbit Plasma Fibrinogen* (RPF) (bioMérieux, ref. 44003), preparado de acordo com as instruções do fabricante. O suplemento RPF contém plasma de coelho e fibrinogénio de vaca, que permitem detetar a actividade da coagulase pela formação de halos opacos em redor da cultura de *Staphylococcus* coagulase positiva, bem como um inibidor de tripsina que evita a fibrinólise total ou parcial dos halos opacos previamente formados. Foi utilizada uma placa de Petri com o meio em questão, subdividida em quadrículas e em cada quadrícula foi inoculada por picada uma cultura bacteriana. Após 24 horas de incubação observaram-se e registaram-se os resultados (Figura 6)

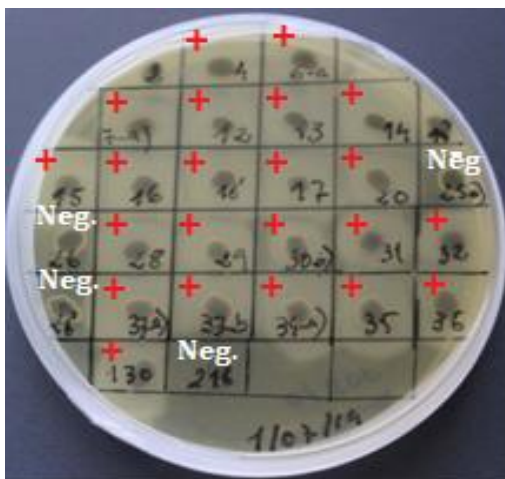


Figura 6- Resultados da prova da coagulase em Baird-Parker Agar com RPF.

Nos casos em que o resultado da coagulase em BP Agar + RPF era duvidoso, foi efetuada a prova da coagulase em tubo. Esta prova deteta a coagulase livre, libertada pelas células, a qual atua na protrombina originando uma substância semelhante à trombina, “trombina livre” que atua no fibrinogênio formando um coágulo de fibrina. Para a realização desta prova inoculou-se uma colônia isolada da cultura em estudo num tubo com o caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Merck, Danstald, Germany) e, após incubação a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{h} \pm 2\text{h}$, juntou-se 0,1 ml da cultura jovem em BHI a 0,3 ml de plasma de coelho com EDTA (Merck, Danstald, Germany), em tubos de hemólise. Ao fim de 4h de incubação a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, e sem agitar o tubo, verificou-se a formação de coágulo (Figura 7). A ausência de coágulo às 4h implica a reincubação do tubo com leitura às 24h. Considera-se a reação como positiva quando o coágulo ocupa mais de três quartos do volume inicialmente ocupado pelo líquido.

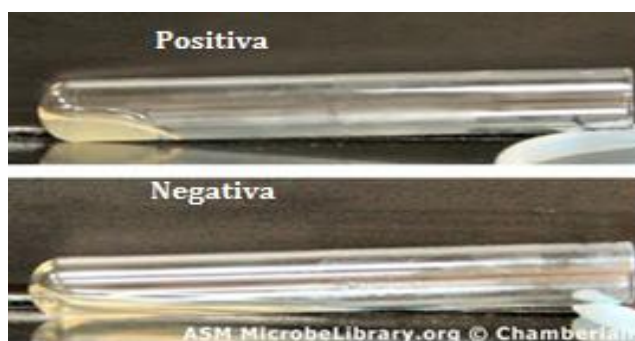


Figura 7 - Coagulase positiva (+) e coagulase negativa (-) em tubo de ensaio.

Fonte: Microbiologiaonline (2014).

3.2.2. Prova da hemólise

A prova da hemólise é efetuada em placas de Petri contendo Agar Sangue (Columbia Agar com 5% de sangue de carneiro; bioMérieux, ref^a. 43041). O Agar Sangue é um meio de isolamento enriquecido que permite a multiplicação de microrganismos fastidiosos. Devido à presença de sangue, este meio é também diferencial, permitindo diferenciar as culturas não

hemolíticas das hemolíticas e, de entre estas, o tipo de hemólise apresentado. De referir que existem três tipos de hemólise (Figura 8): Hemólise total (β - beta), em que o halo é transparente; Hemólise parcial (α - alfa), cujo halo é esverdeado (hemoglobina metabolizada até bilirrubina e biliverdina) e sem hemólise (γ - gama).

Em Agar Sangue, as culturas de *Staphylococcus* formam colónias de grande dimensão, brancas a cinzentas ou creme a amarelas, e com ou sem hemólise. No caso de apresentarem hemólise esta pode ser do tipo beta ou alfa.



Figura 8 - Tipos de hemólise
Fonte: Biomedicina & Microbiologia (2014).

Para a realização desta prova foi utilizada uma placa de Agar Sangue, subdividida em quadrículas, em cada quadrícula foi inoculada por picada uma cultura bacteriana. Incubou-se depois a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ e efetuou-se uma primeira leitura dos resultados após 18 a 24 horas. Voltou-se a incubar e efetuou-se nova leitura às 48 horas.

3.2.3. Teste da DNase

Para a realização deste teste foi usado o meio de cultura *DNase Test Agar* (Liofilchem, ref. 620205), o qual contém DNA na sua constituição. As culturas jovens foram inoculadas em número de 6 a 7 por placa de Petri, por riscado central, e foram a incubar a 36°C durante 18 a 24 horas. Após este período, a placa foi coberta com HCl 1M para precipitar o DNA que não foi hidrolisado.

A prova positiva caracteriza-se pela formação de um halo transparente em torno da cultura bacteriana (Figura 9), devido à degradação do DNA pela DNase produzida pelo *Staphylococcus aureus*.

Na prova negativa, o halo não é formado, devido à não produção de DNase pelos microrganismos.

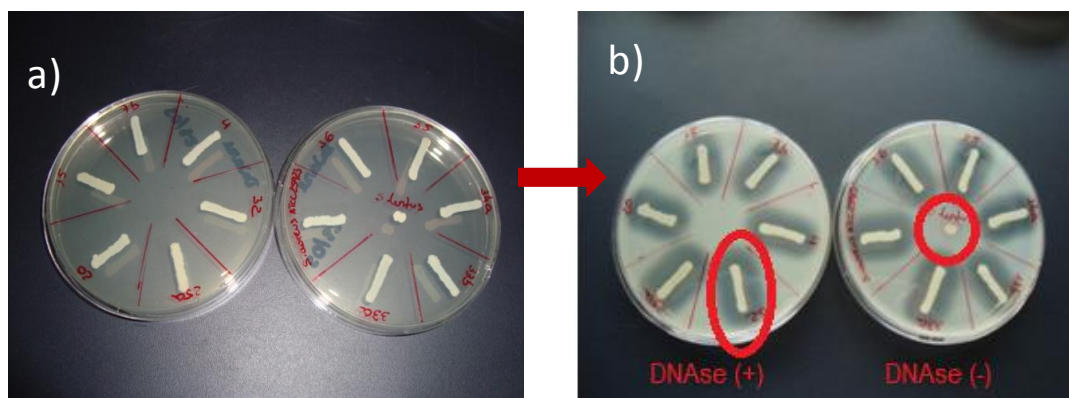


Figura 9 - Teste da DNase antes da adição de HCl 1M (a) e após a adição de HCl 1M (b).

3.3. Detecção de fragmentos de genes enterotoxigênicos por PCR Multiplex

Os 121 isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva previamente caracterizados foram posteriormente sujeitos a caracterização molecular por PCR Multiplex para a detecção de fragmentos dos genes enterotoxigênicos *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*, e de um fragmento do gene *femA*.

O protocolo do PCR Multiplex foi implementado com base no descrito por Mehrotra *et al.* (2000) e no protocolo do Laboratório de Referência Europeu para Estafilococos Coagulase-Positiva (ANSES EU-RL, 2009), com algumas alterações.

Na implementação da técnica foram usadas as seguintes culturas de referência:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (gene *sea*, que codifica para a enterotoxina estafilocócica A)

- *Staphylococcus aureus* EURL 11CEB126STA (gene *seb*, que codifica para a enterotoxina estafilocócica B)

- *Staphylococcus aureus* EURL 12CEB583STA (gene *sec*, que codifica para a enterotoxina estafilocócica C)

- *Staphylococcus aureus* EURL 12CEB502STA (gene *sed* e *ser*, que codificam para, respectivamente, a enterotoxina estafilocócica D e R)

- *Staphylococcus aureus* EURL 09CEB329STA (gene *see*, que codifica para a enterotoxina estafilocócica E)

3.3.1. Extração de DNA

Foram testados alguns procedimentos para otimizar a extração do DNA dos isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva, tendo-se optado pelo método Doumith *et al.* (2004).

Na Figura 10, encontra-se a sequência de procedimentos envolvidos na extração do DNA.

A partir de colónias em meio sólido recolheu-se com ansa estéril (fig. 10A e B), duas a três colónias para um microtubo, onde previamente foi colocado 50µl de uma solução a 0,25% de Dodecil sulfato de sódio em 0,05N NaOH estéril (Anexo II) e emulsionou-se (fig.10C).

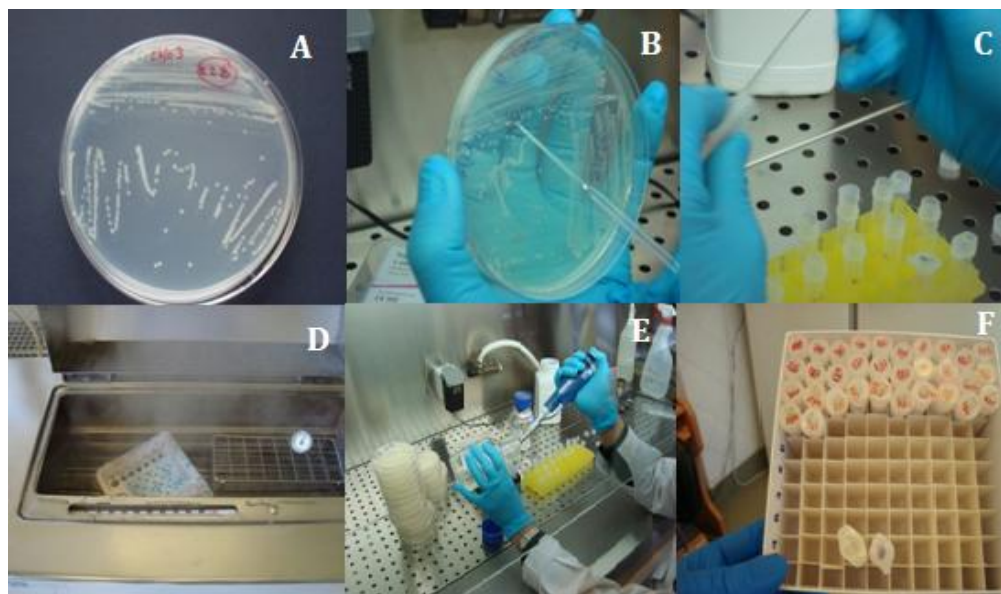


Figura 10 - Sequência de procedimento na extração do DNA genómico.

Colocou-se o microtubo em banho-Maria a 99°C, durante 15 minutos (fig. 10D). Adicionou-se 100µl de água ultra-pura estéril e homogeneizou-se (fig. 10E). Por fim, as amostras de DNA foram colocadas em caixas (fig. 10F) a -20°C até ao momento da sua utilização.

3.3.2. Amplificação do DNA

A realização das etapas de amplificação de DNA até à resolução do gel foram realizadas no Laboratório de Biologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco.

3.3.2.1. Primers

As características dos seis conjuntos de *primers* usados na reação de amplificação encontram-se na Tabela 11. Os *primers* foram adquiridos à empresa Metabion.

Tabela 11 - Sequência de nucleótidos e tamanho dos produtos de amplificação específicos para os fragmentos dos genes de *Staphylococcus coagulase positiva* detectados neste estudo.

Gene	Primer	Sequência oligonucleotídeo (5' - 3')	Tamanho do produto amplificado (bp)
<i>sea</i>	GSEAR-1	GGTTATCAATGTGCGGGTGG	102
	GSEAR-2	CGGCACTTTTTTCTCTTCGG	
<i>seb</i>	GSEBR-1	GTATGGTGGTGTAAGTACTGAGC	164
	GSEBR-2	CCAAATAGTTGACGAGTTAGG	
<i>sec</i>	GSECR-1	AGATGAAGTAGTTGATGTGTATGG	451
	GSECR-2	CACACTTTTAGAATCAACCG	
<i>sed</i>	GSEDR-1	CCAATAATAGGAGAAAATAAAAAG	278
	GSEDR-2	ATTGGTATTTTTTTTCGTTTC	
<i>see</i>	GSEER-1	AGGTTTTTTCACAGGTCCATCC	209
	GSEER-2	CTTTTTTTTCTTCGGGTCAATC	
<i>femA</i>	GFEMAR-1	AAAAAAGCACATAACAAGCG	132
	GFEMAR-2	GATAAAGAAGAAACCAGCAG	

3.3.2.2. Mistura de amplificação

No presente trabalho utilizou-se o *NZYTaq 2 x Green Master Mix* (Nzytech, ref. MB04003) (Figura 11), uma pré-mistura pronta a usar, que contém uma forma modificada recombinante de TaqDNA polimerase purificada a partir de *Escherichia coli* para amplificar sequências alvo de DNA até 3 Kb de tamanho.

O *Master Mix* contém dNTPs e tampão de reação em concentrações ideais para uma eficiente amplificação de amostras de DNA por PCR. A concentração final de MgCl₂ é de 2,5 mM, permitindo a implementação de uma ampla gama de protocolos de PCR. O *NZYTaq 2 x Green Master Mix* contém dois corantes (azul e amarelo) que permitem monitorizar o progresso da eletroforese.



Figura 11 - *NZYTaq 2 x Green Master Mix* da Nzytech

A composição da mistura de amplificação e as respetivas quantidades encontram-se assinaladas na Tabela 12.

Tabela 12- Composição da mistura de amplificação.

Componentes	Volume (μ l)
<i>NZYTaq2 x Green Master Mix</i>	12,5
<i>Primers</i>	3
DNA	1,5
H ₂ O ultra pura, isenta de nucleases	8
Total da mistura	25 μ l

Foi utilizado um controlo “branco”, o qual consiste na mistura de amplificação mas sem DNA. Para perfazer os 25 μ l substituiu-se a quantidade de DNA (1,5 μ l) por H₂O ultra pura, isenta de nucleases.

3.3.2.3. Termociclador

A amplificação de DNA foi realizada no termociclador Biometra, *Tgradient*, disponível no Laboratório de Biologia da Escola Superior Agrária de Castelo Branco (Figura 12).



Figura 12 - Termociclador (Biometra, *Tgradient*).

Os microtubos de PCR, com a mistura de amplificação, foram colocados no termociclador tendo sido submetidos a uma desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos seguida por 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C durante 2 minutos, ligação dos *primers* a 54,6°C durante 2 minutos e extensão a 72°C durante 1 minuto) (Figura 13) e, no fim, por uma extensão final a 72°C durante 7 minutos.

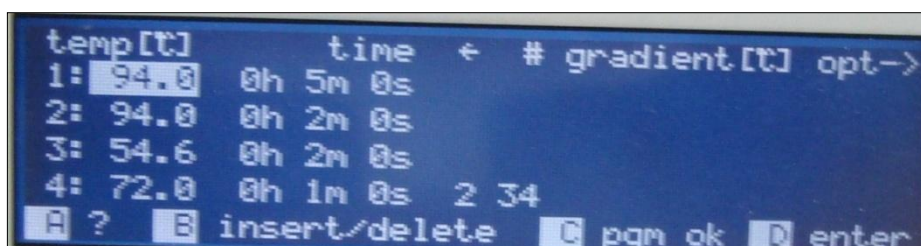


Figura 13 - Imagem do ecrã do termociclador com os dados do programa utilizado.

Terminada a amplificação, que para este programa tem a duração de 3h29m59s, os microtubos permaneceram no termociclador a 4°C (fase de refrigeração/conservação) até ao momento de aplicar os produtos amplificados no gel de agarose.

3.3.3. Separação dos fragmentos de DNA por eletroforese em gel de agarose

A separação dos produtos PCR de cada uma das amostras de DNA foi efetuada por eletroforese em gel de agarose.

O gel de agarose é preparado em função da espessura que se pretende e do tipo de tina a utilizar. Neste estudo foi utilizada uma tina daBIO-Rad (*Widemini-subcell* GT) e um gel com aproximadamente 5,8mm de espessura.

Preparou-se um gel de agarose a 2% conforme descrito no Anexo III. Após preparação, o gel foi colocado na tina de electroforese onde já tinha sido colocado o tampão TBE 1× (Anexo IV).

Carregaram-se os poços, de acordo com a seguinte sequência: no primeiro poço, no poço do meio e no penúltimo poço colocou-se 5µl de marcador (NZYDINA Ladder VI; nzytech) (Anexo V). Nos restantes poços colocou-se 5µl da mistura de amplificação (Figura 14).

Carregados os poços foi iniciada a corrida eletroforética a uma voltagem entre 80V a 90V durante aproximadamente 1 hora e 45 minutos.



Figura 14 - Carregamento dos poços

Após terminada a corrida eletroforética, colocou-se o gel num banho de brometo de etídio (Anexo VI), durante 20 minutos, e posteriormente mergulhou-se em água destilada. Por fim observou-se por transluminação UV e fotografou-se com câmara digital (Kodack DC 290) devidamente adaptada, em formato TIFF.

As imagens obtidas foram analisadas e os isolados de *Staphylococcus coagulase-positiva* foram caracterizados em função dos produtos de amplificação obtidos (Figura 15).

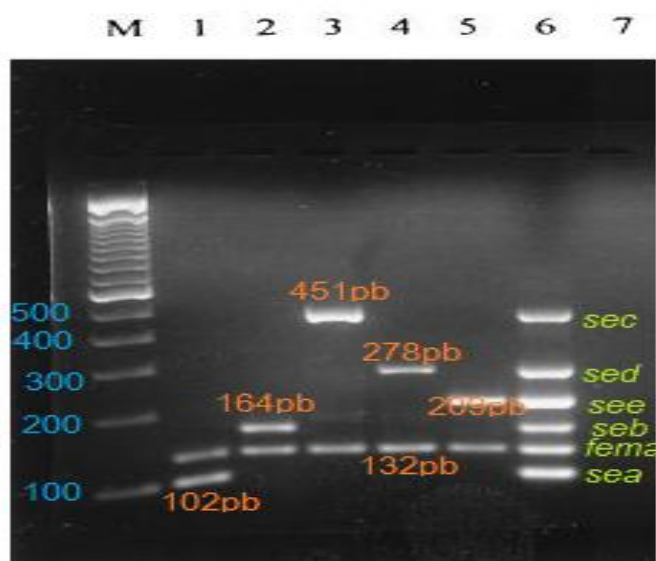


Figura 15- Separação eletroforética dos fragmentos de genes *femA*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*, após amplificação por PCR Multiplex.

Fonte: Mehrotra *et al.* (2000)

Na Figura 15 encontra-se na coluna M o marcador, de peso molecular 100 pb, e da coluna 1 à 6 encontram-se os produtos de amplificação PCR dos fragmentos dos genes que codificam para as enterotoxinas estafilocócicas SEA (coluna 1 - gene *sea*), SEB (coluna 2 - gene *seb*), SEC (coluna 3 - gene *sec*), SED (coluna 4 - gene *sed*) e SEE (coluna 5 - gene *see*). Na coluna 6 encontram-se amplificados todos os fragmentos de gene referidos acima (*sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*) e ainda o fragmento do gene *femA* (também amplificado nas colunas 1 a 5).

De salientar que foram efetuados vários ensaios até se obterem os resultados pretendidos, tendo assim sido efectuadas algumas alterações nos protocolos consultados. Na extracção de DNA pelo método de Doumith *et al.* (2004) optou-se por reduzir o número de colónias utilizadas, de três a cinco para duas a três.

Nos ciclos de amplificação do DNA, na fase da ligação dos *primers*, Mehrotra *et al.* (2000) indicam a temperatura de ligação de 57°C no entanto, e após se terem testado várias temperaturas de ligação, optou-se por usar no nosso trabalho a temperatura de 54,6°C.

A voltagem utilizada foi de 80V embora também se tenham conseguido bons resultados a 90V. Nos protocolos aconselham voltagem de 90V ± 10V.

3.4. Identificação de isolados

3.4.1. Microgen™ Staph-ID

Do total de isolados avaliados neste estudo, sete deles (referências O33a, S96, S100, S130, S221, S222 e S224) apresentaram uma reação coagulase positiva e, nos casos em que foi efetuada, também uma reação DNase positiva, mas não se obteve amplificação do fragmento de gene *femA*, característico de isolados de *Staphylococcus aureus*. Sendo assim, optou-se por efetuar a identificação ao nível da espécie destes isolados, usando para tal a galeria bioquímica *Microgen™ Staph-ID*, da Microgen.

Esta galeria consiste num conjunto de testes bioquímicos desenvolvidos para a identificação de isolados de *Staphylococcus*, a partir de amostras clínicas e veterinárias. O sistema *Microgen Staph-ID* compreende uma única tira de micropoços com 12 substratos bioquímicos padronizados. Os substratos desidratados de cada poço são reconstituídos com uma suspensão do organismo a ser identificado preparado num meio de suspensão fornecido. Se os substratos individuais são metabolizados pelo organismo, uma mudança de cor ocorre durante a incubação ou após a adição de reagentes específicos (Figura 16).



Figura 16 - Substratos depois de rehidratados, já com alteração de cor

A permutação de substratos metabolizados pode ser interpretado usando o *Microgen Software System* (MID-60). Para a identificação do organismo em teste foi seguido o procedimento do fabricante.

Os resultados foram escritos na folha de registo *Microgen Staph-ID Report Form*, na qual os substratos foram organizados em trios (conjuntos de 3 reacções) a cada substrato foi atribuído um valor numérico (1, 2 ou 4). A soma é efectuada com os valores positivos. As reacções para cada triplete, formam um único dígito do número do perfil, que é utilizado para determinar a identidade do isolado (Figura 17).

Substrato	Staphylococcus ID														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
Reaction	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
4-6 Group	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Reaction Index	4	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2			
Sum of Positive Reactions	5			7			7			6			6		
Profile No.	57+66														
Final Identification															

Número do perfil a introduzir no software

Figura 17 - Folha de registo *Microgen Staph-ID Report Form*.

O número do perfil inseriu-se no software do sistema de identificação Microgen (MID-60). O software forneceu uma identificação, indicando a probabilidade de identificação do organismo, bem como testes adicionais de confirmação que se poderão efectuar (Anexo VI).

3.5. Prova do manitol

O *S. aureus* tem a capacidade de fermentar o manitol em meio contendo 7,5% de cloreto de sódio, denominado Agar Manitol-Sal ou Meio de Chapman. O indicador de pH é o vermelho de fenol, que determina uma reação positiva quando o meio ao redor das colónias se torna amarelo, e negativa quando permanece avermelhado (Figura 18). Esta prova foi testada em dois meios comerciais: o meio *Mannit- Kochsolz- Phenolrot Agar* (Biokar, ref. 1.05404) e o meio *Bacillus cereus Agar* (Biokar, ref. BK116HA).



Figura 18 - Prova do manitol positivo para *S. aureus*
Fonte: Pinterest (2014).

3.6. Prova Voges Proskauer - Methyl Red (VP - MR)

Esta prova tem como objectivo determinar a capacidade dos microrganismos para oxidar a glicose com produção e manutenção de concentrações altas de produtos finais ácidos.

A reacção de Voges Proskauer (VP) ou teste de produção de acetoína testa a formação do acetilmetilcarbinol, também conhecido como acetoína, a partir da glicose. Em presença de oxigénio atmosférico e hidróxido de potássio a 40%, a acetoína é convertida a diacetil e o alfa-naftol actua como catalisador para produzir um complexo de cor vermelha. As estirpes de *S. aureus* apresentam elevada produção de acetoína (90%), quando comparadas às estirpes de *S. intermedius* e *S. hyicus*.

Suspenderam-se duas colónias a partir de cultura pura no meio de VP / MR (Merck, ref. 1.05712) e incubou-se a 37°C durante 24-48 h. Após o período de incubação, dividiu-se a cultura por dois tubos e em cada um deles adicionou-se os reagentes específicos para revelar a reação VP e a reação MR.

Na reação Voges Proskauer (VP), adicionou-se 0,2 ml de KOH (4 gotas) a 40% e, em seguida, 0,6 ml de solução de alfa-naftol (12 gotas). O desenvolvimento de uma cor rosa/vermelha na cultura, 15 minutos após a adição do reagente representa uma prova positiva. A ausência dessa cor é uma prova negativa.

Na reacção Methyl - Red (MR), o reagente usado é o vermelho de metilo (5 gotas), o qual deteta a presença de grandes concentrações de produtos finais ácidos, pois tem um ponto de viragem a valores de pH inferiores a 4,5.

3.7. Teste de suscetibilidade a antibióticos -Técnica de Kirby-Bauer

A metodologia utilizada para os testes de suscetibilidade a antibióticos encontra-se na norma M100-S22 e M02-A11 da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), que descreve técnicas padronizadas de difusão em agar a serem utilizadas para determinar a sensibilidade *in vitro* de bactérias aeróbias a compostos antimicrobianos.

Os antibióticos selecionados para a realização deste estudo foram os indicados na Tabela 13.

Tabela 13 - Lista de antibióticos testados neste trabalho.

Antibiótico	Classe	Designação/ Concentração	Marca / Referência
Sulfametoxazol/ Trimetoprim	Sulfonamidas	SXT - 25µg	Liofilchem 9042
Ampicilina	β-lactâmicos	AMP - 10µg	Oxoid CT0003B
Amoxicilina	β-lactâmicos	AML - 10µg	Liofilchem 9133
Penicilina G	β-lactâmicos	P - 10IU	Liofilchem 9037
Enrofloxacina	Fluorquinolonas	ENR - 5µg	Oxoid CT0639B
Neomicina	Aminoglicósidos	N - 30µg	Liofilchem 9032
Eritromicina	Macrólidos	E- 15µg	Oxoid CT0020B
Estreptomicina	Aminoglicósidos	S - 10µg	Liofilchem 9040
Cefazolina	Cefalosporina 1 ^a geração	Kz - 30µg	Liofilchem 9015

O material a utilizar neste teste, tal como: as placas de Petri com o meio de Mueller Hinton, os tubos com os discos de antibióticos e a escala Mac Farland retiraram-se do frio cerca de 20-30 minutos antes da execução da prova para que estivessem à temperatura ambiente no momento em que fossem usadas.

Na Figura 19 encontra-se a sequência do procedimento para a realização de um antibiograma.

Preparação da suspensão bacteriana:

Arrastou-se, com uma ansa descartável esterilizada, 4 a 5 colónias da cultura jovem (18-24h) esuspenderam-se as colónias em 5 ml de solução salina estéril (NaCl 0,85%) até se obter uma turvação comparável com o grau 0,5 da escala Mac Farland (equivalente a 1x10⁶ UFC/ml) (bioMérieux, ref. 70900).

Para a inoculação em meio sólido Mueller-Hinton:

Embebeu-se uma zaragatoa estéril na suspensão bacteriana, comprimindo-a contra as paredes do tubo para tirar o excesso da suspensão.

O esgotamento à superfície foi feito de forma suave em todas direcções na placa (cinco direcções), procurando abranger toda a superfície e tendo o cuidado de fazer as estrias o mais apertado possível.



Figura 19 - Sequência de passos para a realização dos antibiogramas.

Após proceder ao esgotamento à superfície, aguardou-se que a superfície do agar secasse (não mais que 15 minutos).

Aplicação dos discos de antibióticos:

Com o auxílio do distribuidor de discos, estes foram colocados sobre a superfície do meio previamente inoculado. Não se aconselha a colocação de mais do que 6 discos por placa. Assim, e como dispnhamos de 9 antibióticos a testar para cada cultura bacteriana, utilizámos duas placas, uma com 5 e outra com 4 antibióticos. Com o auxílio de uma pinça esterilizada exerceu-se uma ligeira pressão sobre cada disco para que fosse garantido o contacto completo com a superfície do disco. Incubou-se na estufa a 36°C por 16 a 24 horas.

Leitura e interpretação dos resultados:

Após o período de incubação, foi medido o diâmetro dos halos inibitórios de cada disco (zona de inibição), com o auxílio de um paquímetro (Figura 20). Para facilitar a medição utilizou-se um fundo escuro onde se colocaram as placas.

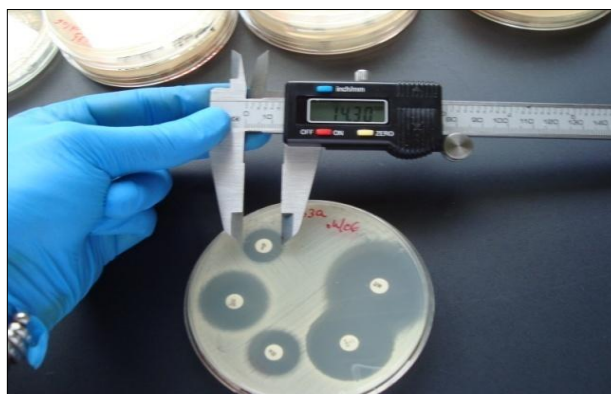


Figura 20 - Medição dos diâmetros das zonas de inibição.

A interpretação dos resultados foi efetuada através da consulta de tabelas padronizadas presentes na norma M100-S22 (CLSI, 2012), sendo as estirpes classificadas em sensível (S), intermédia (I) ou resistente (R) ao antibiótico testado, consoante o diâmetro, em milímetros, das zonas de inibição.

Para controlo de qualidade da execução da prova foi utilizada a estirpe de referência *S. aureus* ATCC 25923, estirpe esta que é a indicada como controlo na norma utilizada.

Na Tabela 14 encontram-se os valores de referência indicados por CLSI (2012).

Tabela 14 - Valores de referência para interpretação dos diâmetros das zonas de inibição para os antibióticos utilizados.

Antibiótico	Diâmetros padrão das zonas de inibição (mm)			Estirpe de referência <i>S.aureus</i> ATCC 25923
	S ≥	I	R ≤	
Ampicilina	29	-	28	27-35
Amoxicilina	20	-	19	28-36
Cefazolina	18	15-17	14	29-35
Eritromicina	23	14-22	13	22-30
Penicilina G	29	-	28	26-37
Estreptomicina	15	12-14	11	14-22
Neomicina	17	13-16	12	18-26
Enrofloxacina	18	15-17	14	27-31
Trimetropim-sulfametoxanol	16	11-15	10	24-32

S – Sensível; I – Intermédio; R – Resistente.

Fonte: CLSI (2012)

3.8. Tratamento de dados

O tratamento de dados foi efetuado com o auxílio do programa informático Microsoft Excel 2007 e o programa R. 3.0.1 – Package R Comander Rcmdr, de forma a poder ser verificada a existência ou não de dependência entre a ação dos antibióticos testados e a origem alimentar dos isolados em estudo. Estas ferramentas informáticas também foram utilizadas no estudo das médias do diâmetro das zonas de inibição (em mm) para cada antibiótico testado.

4. Resultados e Discussão

4.1. Provas da coagulase, hemólise e DNase

Nos 121 isolados em estudo, efetuou-se a prova da coagulase em meio BP+RPF, confirmando-se serem todos coagulase positiva (Anexo VIII), característica da espécie *Staphylococcus aureus* e de algumas estirpes das espécies *Staphylococcus hyicus* e *Staphylococcus intermedius*.

Todos os 121 isolados se revelaram hemolíticos e DNase positivos.

4.2. Deteção de genes enterotoxigénicos e *femA* por PCRMultiplex

A segunda parte do trabalho focou-se na deteção, por PCR Multiplex, dos fragmentos dos genes enterotoxigénicos que codificam para as enterotoxinas SEA, SEB, SEC, SED e SEE, ou seja, dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*, e do fragmento do gene *femA* (usado como marcador específico na deteção de *S. aureus*), a todos os 121 isolados referidos no ponto anterior.

As estirpes enterotoxigénicas de *S.aureus* apresentam diferentes conteúdos em genes codificadores de enterotoxinas. Neste trabalho foram apenas pesquisados os genes codificadores de enterotoxinas clássicas, uma vez que estas são responsáveis por 95% dos casos de intoxicação estafilocócica em humanos (Zoche *et al.*, 2009)

Na implementação da técnica de PCR Multiplex foram usadas cinco culturas de referência, uma para cada tipo de enterotoxina estafilocócica avaliada (SEA, SEB, SEC, SED e SEE). Na Figura 21 podemos observar a amplificação dos fragmentos dos genes esperados para cada cultura de referência de *Staphylococcus aureus*. Os pesos moleculares dos produtos de amplificação gerados foram os esperados para os fragmentos dos genes *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* e o gene codificador *femA*, ou seja, 102pb, 164pb, 451pb, 278pb, 209pb e 132pb respetivamente.

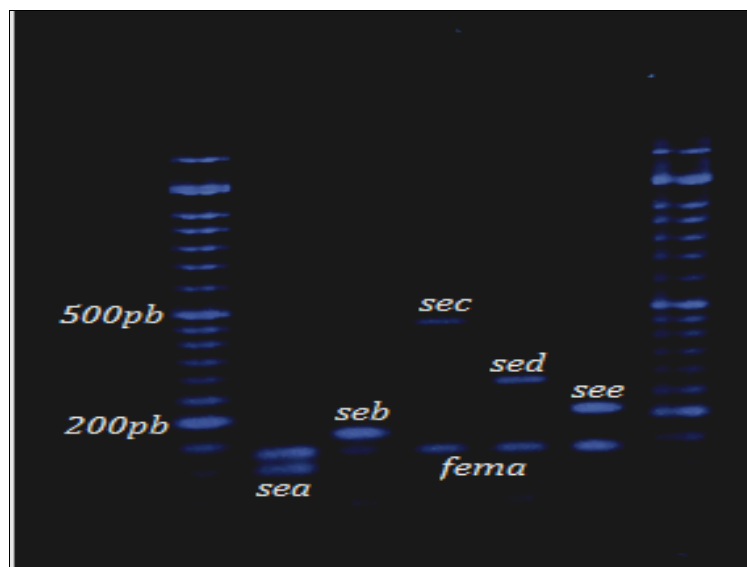


Figura 21-Separação eletroforética dos fragmentos dos genes *femA*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*, após amplificação por PCR Multiplex do DNA das culturas de referência *S. aureus* ATCC 29213 (coluna 1), *S. aureus* EURL 11CEB126STA (coluna 2), *S. aureus* EURL 12CEB583STA (coluna 3), *S. aureus* EURL 12CEB502STA (coluna 4) e *S. aureus* EURL 09CEB329STA (coluna 5). M - Marcador de 50pb.

Foi efetuado o PCR Multiplex aos 121 isolados em estudo. Em todos os isolados foi amplificado o fragmento de gene *femA*, à exceção de 7 isolados com prova coagulase positiva e DNase positiva (quando efetuado), para os quais não houve amplificação de qualquer fragmento de gene (Figura 22).

Foi amplificado o gene *femA* (31,4%) e as combinações *sea* e *femA* (1,7%), *sec* e *femA* (57%) e *see* e *femA* (4,1%). Existiram isolados em que não foi amplificado qualquer gene enterotoxigênico (5,8%). Não existiu amplificação dos fragmentos dos genes *seb* e *sed*.

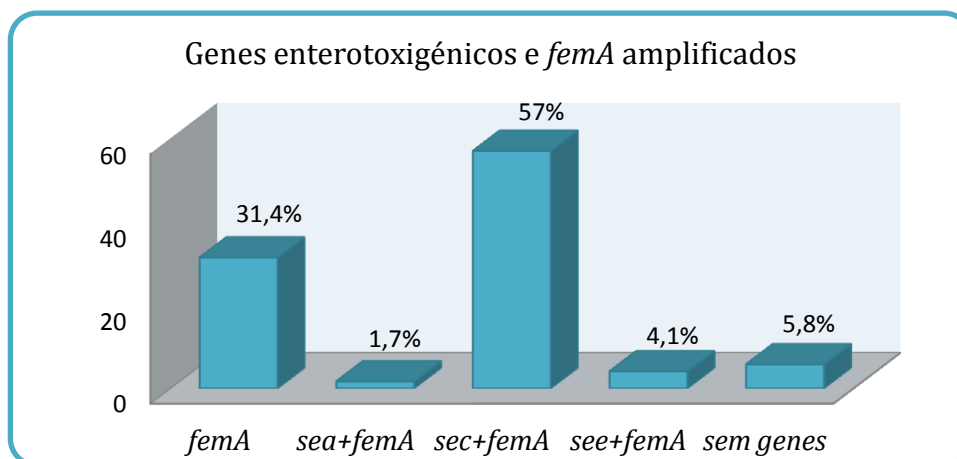


Figura 22 - Percentagem de isolados com amplificação de genes enterotoxigênicos e *femA*.

Considerando que apenas 62,8% (76) dos isolados amplificaram fragmentos de genes que codificam para as enterotoxinas estafilocócicas, SEA, SEB, SEC, SED e SEE (Figura 23), verifica-se que destes 76 isolados, 90,8% (69) amplificaram o fragmento de gene *sec*, 6,6% (5) amplificaram o fragmento de gene *see* e 2,6% (2) amplificaram o fragmento de gene *sea*.

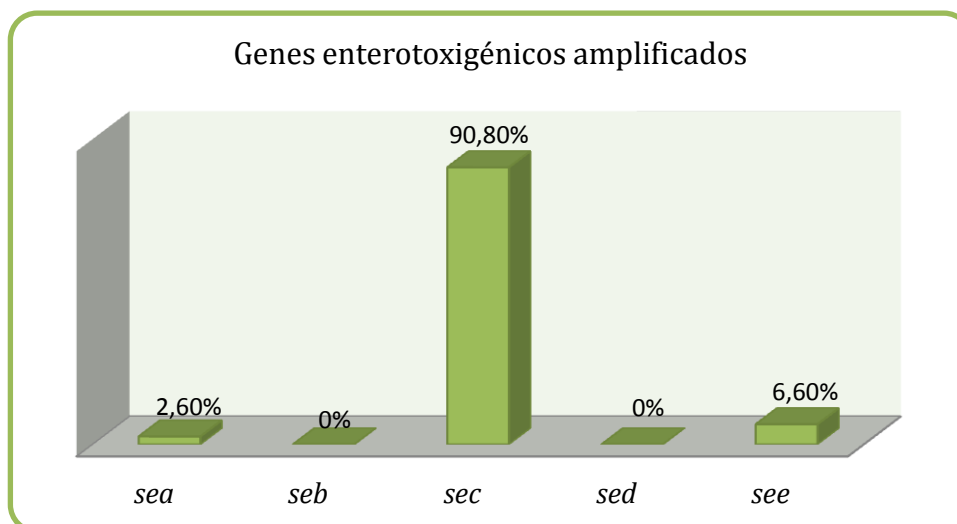


Figura 23- Percentagem de isolados com amplificação para *sea*, *seb*, *sec*, *sed* e *see*.

Tendo em conta os isolados obtidos de queijos (n=95), produzidos em duas queijarias diferentes (Tabela 15), apenas obtivemos amplificação do fragmento do gene *femA* e da combinação *sec* e *femA*. No produtor S observou-se que para seis isolados não houve amplificação dos fragmentos de genes testados.

Tabela 15- Frequência de amplificação dos fragmentos de genes tendo em conta a proveniência dos isolados de queijo de duas queijarias diferentes (n=95).

Genes	Soalheira (S)		Zebras (Z)		Total
	Nº	%	Nº	%	
<i>femA</i>	8	10,5	16	80	25,3
<i>sea+femA</i>	0	0	0	0	0
<i>seb+femA</i>	0	0	0	0	0
<i>sec+femA</i>	61	81,6	4	20	68,4
<i>sed+femA</i>	0	0	0	0	0
<i>see+femA</i>	0	0	0	0	0
<i>sem genes</i>	6	7,9	0	0	6,3
Total	75	100	20	100	100

Na Tabela 16, relativa aos isolados de leite e de outros alimentos, verifica-se uma maior diversidade de fragmentos de genes amplificados, por comparação com o grupo de isolados de queijo. Para o grupo do leite e o grupo de outros alimentos, verificou-se amplificação do fragmento de gene *femA* e das combinações *sea* e *femA*, *sec* e *femA* e *see* e *femA*. Verificou-se ainda ausência de amplificação em um isolado.

O fragmento do gene *femA* foi o mais frequentemente amplificado de forma isolada, com maior incidência em isolados de leite de vaca.

O gene *sea* e *femA* foi amplificado apenas nos isolados de salada de atum (100%). O gene *sec* e *femA* foi amplificado em leite de vaca, cozido à portuguesa e salmoura. O gene *see* e *femA* foi amplificado em isolados de diferentes origens: leite ovelha, leite de cabra, cozido à portuguesa e salmoura.

Tabela 16- Frequência de amplificação dos fragmentos de genes em isolados de leite e outros alimentos

Gene	Leite (16)			Outros alimentos (10)				Total
	V	O	C	J	Cp	S	Sa	
<i>femA</i>	8	3	0	2	0	1	0	14
<i>sea+femA</i>	0	0	0	0	0	0	2	2
<i>seb+femA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>sec+femA</i>	1	1	0	0	1	1	0	4
<i>sed+femA</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>see+femA</i>	0	1	2	0	1	1	0	5
<i>sem genes</i>	0	0	0	1	0	0	0	1
Total	9	5	2	3	2	3	2	26

V - vaca; O - ovelha; C - cabra; J - bolojesuíta; Cp - cozido à portuguesa; S - salmoura; Sa - salada de atum

Agrupando os isolados alimentares em Leite, Queijo e Outros alimentos (Tabela 17), verifica-se que para o leite o gene mais frequentemente amplificado foi o *femA* (68,8%) e para o queijo a combinação *sec* e *femA* (68,4%). Em outros alimentos foi onde se verificou a maior variabilidade de amplificações.

Tabela 17- Número e percentagem de isolados de *Staphylococcus coagulase positiva* com amplificação de genes enterotoxigênicos e *femA*.

	Leite (16)		Queijo (95)		Outros (10)		Total (121)	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<i>femA</i>	11	68,8	24	25,3	3	30	38	31,4
<i>sea+femA</i>	0	0	0	0	2	20	2	1,7
<i>sec+femA</i>	2	12,5	65	68,4	2	20	69	57
<i>see+femA</i>	3	18,7	0	0	2	20	5	4,1
<i>sem genes</i>	0	0	6	6,3	1	10	7	5,8

Na Tabela 18 encontra-se de forma resumida, todas as amplificações de fragmentos de genes enterotoxigênicos e fragmento de gene *femA* obtidas no PCR Multiplex de todos os isolados em estudo.

Tabela 18 - Resumo das ampliações obtidas em todos os isolados em estudo.

	Queijo (n=95)			Leite (n=16)				Outros alimentos (n=10)				Total	
	S (n=75)	Z (n=20)	T (%)	V (n=9)	C (n=2)	O (n=5)	T (%)	J (n=3)	CP (n=2)	S (n=3)	SA (n=2)		T (%)
Sem amplificação de fragmentos de genes enterotoxigénicos													
<i>femA</i>	8	16	25,3	8	0	3	68,8	2	0	1	0	30	38
<i>s.genes</i>	6	0	6,3	0	0	0	0	1	0	0	0	10	7
Com amplificação de fragmentos de genes enterotoxigénicos													
<i>Sea</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	20	2
<i>Seb</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Sec</i>	61	4	68,4	1	0	1	12,5	0	1	1	0	20	69
<i>Sed</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>See</i>	0	0	0	0	2	1	18,7	0	1	1	0	20	5
Total	75	20	100	9	2	5	100	3	2	3	2	100	100

S - Soalheira; Z - Zebras; V - vaca; C - cabra; O - ovelha; J - bolo jesuita; CP - cozido à portuguesa; S - salmoura; SA- salada de atum; T - total; s.genes - sem genes.

Os fragmentos de genes enterotoxigénicos amplificados neste estudo, vão de encontro aos resultados obtidos por vários autores entre eles: Fonte (2012), Normanno *et al.* (2005), Rahimi e Alian (2013) e Zoche *et al.* (2009), à exceção de não ter existido a amplificação de fragmentos dos genes enterotoxigénicos *seb* e *sed*.

Pelisser *et al.* (2009) verificaram que em 102 isolados de queijo e derivados de carne, 91 foram positivos para o gene *femA*, tendo-se observado que o gene *femA* é marcador específico de *S. aureus*, uma vez que esteve presente em todas as estirpes identificadas como *S. aureus*. Estes autores, concluem que o gene *femA* constitui, uma ferramenta útil na diferenciação de espécies de *Staphylococcus* sendo uma alternativa rápida e segura para a identificação desta bactéria.

De entre os 95 isolados de queijo, 68,4% apresentaram o fragmento do gene *sec*, que amplifica para a enterotoxina estafilocócica C, SEC. Estes valores chamam a atenção para a necessidade de melhorar a gestão das explorações a nível animal, nomeadamente através da implementação de programas de controlo específicos destinados a reduzir a mastite subclínica, que é muitas vezes a causa da contaminação do leite com esta enterotoxina estafilocócica. Um nível de contaminação reduzido poderia ser conseguido através da melhoria dos procedimentos de saneamento e higiene nas explorações (Pinchuck *et al.*, 2010).

Nestes isolados não foram amplificados outros fragmentos de genes enterotoxigénicos.

Nos isolados de leite de cabra e de ovelha obtivemos amplificação do gene *see*. Dado que este gene amplifica para a enterotoxina E, SEE, podemos pensar que a contaminação não foi por parte dos animais mas sim por parte dos manipuladores e/ou equipamentos da exploração (Zoche, 2008).

O fragmento de gene *sea* associado à produção da SEA, foi apenas detetado nos isolados da salada de atum. Podemos pensar na possibilidade de ter havido uma contaminação de origem humana, no processamento dos alimentos, higiene dos manipuladores e/ou dos equipamentos (Zoche, 2008).

Na Figura 24 encontra-se uma imagem correspondente aos produtos de amplificação resultantes de um ensaio PCR Multiplex, onde podemos observar o M que corresponde ao marcador de 50pb, nos poços de 1 a 5 temos consecutivamente os produtos de amplificação dos fragmentos de genes *sea* e *femA*, *seb* e *femA*, *sec* e *femA*, *sed* e *femA* e *see* e *femA*; nos poços 6, 11, 13 e 14 não se observa produtos de amplificação; nos poços 7,8, 9 e 17 observa-se amplificação de *sec* e *femA*; no poço 10 há amplificação de fragmentos dos genes *see* e *femA*; no poço 12 há amplificação apenas do fragmento de gene *femA* e nos poços 15 e 16 há amplificação dos fragmentos de genes *sea* e *femA*.

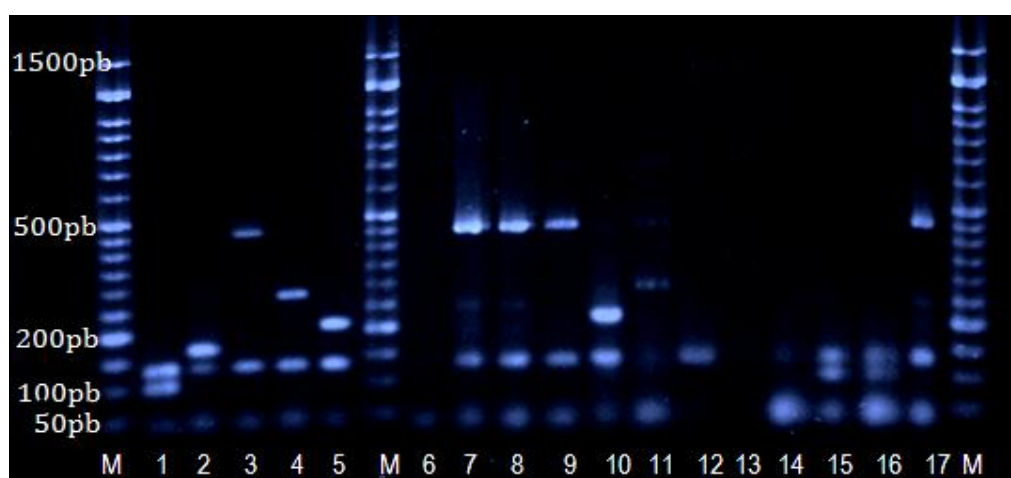


Figura 24 - Amplificações obtidas num ensaio PCR Multiplex

4.2.1. Isolados sem amplificação de genes enterotoxigénicos e *femA*

Foi efetuada uma análise detalhada sobre os 7 isolados em que não existiu amplificação de qualquer um dos cinco fragmentos de genes enterotoxigénicos em estudo e do fragmento do gene *femA*. Uma vez que estes isolados são coagulase positiva, DNase positiva e não amplificaram o gene *femA*, colocámos a hipótese de serem isolados de outra espécie que não *S. aureus*. Para essa análise foram efetuadas provas bioquímicas de confirmação indicadas na Tabela 19.

Através dos testes bioquímicos não foi possível concluir se estes isolados pertencem à estirpe de *S. aureus*.

Assim, foi efetuada uma caracterização bioquímica, com base na galeria bioquímica *Microgen TM Staph-ID*, para a identificação específica dos sete isolados em questão. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 19 e no Anexo VIII. Para os isolados S96, S100, S130, S224 e O33a o teste indica-nos que existe 95,89% de probabilidade de se tratar de *S. aureus* e 4,11% de ser *S. intermedius*, recomendando fazer as provas bioquímicas do VP, hemólise e manitol (Tabela 19).

Para os isolados S 221 e S 222 o teste indica que existe 83,66% probabilidade de se tratar de *S. aureus* e 16,34% *S. intermedius*, recomendando efetuar o teste bioquímico VP (Tabela 19).

Tabela 19 - Isolados sem amplificação de genes enterotoxigénicos e *femA*.

Isolado	Origem	Provas Bioquímicas					
		Coagulase	DNase	Hemólise	Microgen™ Staph-ID Código do perfil	VP	Manitol (anaerobiose)
S96	Queijo	(+)	NF	(+)	57766	(+)	(+)
S100	Queijo	(+)	(+)	(+)	57766	(+)	(+)
S130	Queijo	(+)	(+)	(+)	57766	(+)	(+)
S221	Queijo	(+)	(+)	(+)	57762	(+)	(+)
S222	Queijo	(+)	NF	(+)	57762	(+)	(+)
S224	Queijo	(+)	NF	(+)	57766	(+)	(+)
O33a	Bolo Jesuíta	(+)	(+)	(+)	57766	NF	NF

NF – não se efectuou prova

Uma vez que já tínhamos excluído a hipótese de estes isolados serem *Staphylococcus aureus* devido ao facto de não terem amplificado o fragmento de gene *femA*, considerado um bom marcador para esta espécie e tendo ainda em conta que estes isolados podem ter origem veterinária, pensamos poder tratar-se de isolados de *Staphylococcus intermedius*, os quais também são coagulase e DNase positiva. Há no entanto discordância quanto ao teste VP, uma vez que apenas 1% das estirpes de *S. intermedius* são VP positivas.

4.3. Caracterização da suscetibilidade aos antibióticos

Para a realização dos antibiogramas de forma a verificar a suscetibilidade dos isolados a 9 antibióticos, foram seleccionados 76 isolados dos 121 *Staphylococcus* coagulase positiva. Foram igualmente usados 4 isolados coagulase negativa, perfazendo assim um total de 80 isolados.

Os isolados foram agrupados em: Leites, Queijos e Outros alimentos.

Os antibióticos testados foram: Penicilina G 10IU; Ampicilina 10 µg; Amoxicilina 10 µg; Cefazolina 30 µg; Enrofloxacin 5 µg; Neomicina 30 µg; Eritromicina 15 µg; Estreptomicina 10 µg e Sulfametoxazol/Trimetoprim 25 µg.

4.3.1. Controlo da técnica Kirby-Bauer a partir da estirpe de referência

No intuito de verificar se a técnica de difusão foi corretamente implementada, foram efetuados antibiogramas em duplicado, para a estirpe de referência *S. aureus* ATCC 25923. Os valores médios dos diâmetros das zonas de inibição estão indicados na Tabela 20.

Tabela 20 - Resultados médios de dois ensaios para os diâmetros de inibição (mm) obtidos para os nove antibióticos testados para a estirpe de referência *S. aureus* ATCC 25923

	P	AMP	AML	KZ	ENR	N	E	S	SXT
Valores de Referência	26-37	27-35	28-36	29-35	27-31	18-26	22-30	14-22	24-32
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	35,1	32,8	33,2	33,8	31	20	27,8	15,1	25,8

P - Penicilina G 10IU; AMP - Ampicilina 10 µg; AML - Amoxicilina 10 µg; KZ - Cefazolina 30 µg; ENR - Enrofloxacin 5 µg; N - Neomicina 30 µg; E - Eritromicina 15 µg; S - Estreptomicina 10 µg e SXT - Sulfametoxazol/Trimetoprim 25 µg.

Os resultados estão de acordo com o esperado demonstrando que a técnica foi bem implementada.

4.3.2. Suscetibilidade aos antibióticos dos isolados em estudo

Utilizando os valores padrão indicados na Tabela 14, classificaram-se os isolados em estudo em resistente (R), intermédio (I) e sensível (S) tendo em conta o diâmetro das zonas de inibição (em mm) para cada antibiótico testado. Todos os valores obtidos encontram-se registados no Anexo IX.

A maioria dos isolados de *Staphylococcus*, mostraram-se sensíveis aos antibióticos em estudo, como se pode verificar na Figura 25.

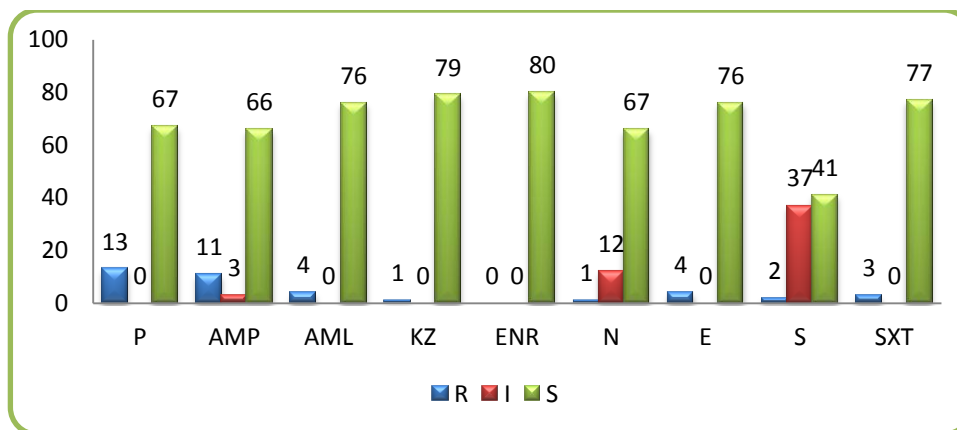


Figura 25- Número de isolados suscetíveis, resistentes ou intermédios aos antibióticos em estudo.

No grupo Queijo, verifica-se uma baixa percentagem de resistência. Com um valor máximo de resistência encontrado para os antibióticos Eritromicina e Sulfametoxazol/Trimetoprim, com 5,3% de isolados a cada um destes antibióticos (Tabela 21). Verificou-se 0% de resistência aos antibióticos Ampicilina, Amoxicilina e Enrofloxacin. Para a Estreptomicina existem 47,3% de isolados que se manifestaram intermédios mas com valores muito próximos do valor mínimo de sensibilidade, à excepção deste antibiótico a percentagem de isolados sensíveis para os restantes antibióticos é igual ou superior a 94,7%.

Tabela 21 - Percentagem de isolados suscetíveis a cada antibiótico, tendo em conta a origem dos isolados.

	Queijo (n=57)			Leite (n=13)			Outros (n=10)			Total R %
	R %	I %	S %	R %	I %	S %	R %	I %	S %	
P	1,8	0	98,2	69,2	0	30,8	30	0	70	16,3
AMP	0	1,8	98,2	69,2	0	30,8	20	20	60	13,8
AML	0	0	100	23,1	0	76,9	10	0	90	5
KZ	1,8	0	98,2	0	0	100	0	0	100	1,3
ENR	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0
N	1,8	8,8	89,4	0	38,5	61,5	0	20	80	1,3
E	5,3	0	94,7	0	0	100	10	0	90	5
S	1,8	47,3	50,9	0	38,5	61,5	10	50	40	2,5
SXT	5,3	0	94,7	0	0	100	0	0	100	3,8

P - Penicilina G 10IU; AMP - Ampicilina 10 µg; AML - Amoxicilina 10 µg; KZ - Cefazolina 30 µg; ENR - Enrofloxacin 5 µg; N - Neomicina 30 µg; E - Eritromicina 15 µg; S - Estreptomicina 10 µg; SXT - Sulfametoxazol/Trimetoprim 25 µg; R - resistente; I - intermédio; S - sensível.

Para o grupo Leite, destaca-se a resistência de uma elevada percentagem de isolados à Penicilina G (69,2%), à Ampicilina (69,2%) e à Amoxicilina (23,9%), ou seja, aos antibióticos

testados do grupo β -lactâmicos. Os restantes isolados manifestaram-se maioritariamente sensíveis aos restantes antibióticos em estudo.

No grupo de “Outros produtos alimentares” os isolados apresentaram percentagens de resistência de 10% (para a Amoxicilina, Eritromicina e Estreptomicina), 20% (para a Ampicilina) e 30% (para a Penicilina). Para os restantes antibióticos a percentagem de resistência foi nula.

Devido à elevada resistência verificada à Penicilina G e à Ampicilina nos isolados obtidos de leite, fomos verificar se havia alguma associação à espécie leiteira (Tabela 22).

Tabela 22- Suscetibilidade aos 9 antibióticos testados nos isolados de leite.

	Leite de Vaca (n=8)			Leite de Ovelha (n=3)			Leite de Cabra (n=2)		
	R %	I %	S %	R %	I %	S %	R %	I %	S %
P	100	0	0	33,3	0	66,7	0	0	100
AMP	100	0	0	33,3	0	66,7	0	0	100
AML	25	0	75	33,3	0	66,7	0	0	100
KZ	0	0	100	0	0	100	0	0	100
ENR	0	0	100	0	0	100	0	0	100
N	0	37,5	62,5	0	66,7	33,3	0	0	100
E	0	0	100	0	0	100	0	0	100
S	0	25	75	0	100	0	0	0	100
SXT	0	0	100	0	0	100	0	0	100

P - Penicilina G 10IU; AMP - Ampicilina 10 μ g; AML - Amoxicilina 10 μ g; KZ - Cefazolina 30 μ g; ENR - Enrofloxacin 5 μ g; N - Neomicina 30 μ g; E - Eritromicina 15 μ g; S - Estreptomicina 10 μ g; SXT - Sulfametoxazol/Trimetoprim 25 μ g; R - resistente; I - intermédio; S - sensível.

Todos os isolados de leite de vaca apresentam 100% de resistência à Penicilina G e à Ampicilina, e 25% destes é igualmente resistente à Amoxicilina. Nos isolados de leite de ovelha também se verifica resistência à Penicilina G, à Ampicilina e à Amoxicilina, embora numa menor percentagem de isolados. Não foi verificada qualquer resistência para os isolados de leite de cabra.

Em Portugal, Pereira *et al.* (2009), ao avaliarem o perfil de resistência a antibióticos para *S. aureus* em isolados de leite de vacas com mastite e de leite cru proveniente de vacas saudáveis, encontraram 70% dos isolados resistentes aos antibióticos Penicilina G e à Ampicilina. Estes autores referem a resistência aos antibióticos β -lactâmicos como consequência dos tratamentos utilizados na mastite bovina e a capacidade das estirpes de *S. aureus* produzirem uma barreira de exo - polissacáridos, aumentando a parede celular e dificultando a ação destes antibióticos. Esta conclusão poderá também justificar o alto perfil de resistência apresentado no presente estudo.

Num estudo efectuado a 72 isolados de leite de vaca, por Filho *et al.* (2007), foram encontrados aproximadamente 90% de isolados resistentes à Penicilina G e à Ampicilina e uma sensibilidade próxima dos 100% para a Eritromicina e à Estreptomicina.

Bassani (2009), ao estudar 30 isolados de leite de vaca, também identificou 100% de resistência à Penicilina G e à Ampicilina e uma sensibilidade intermédia à Eritromicina e ao

Sulfametoxazol/Trimetoprim. Por outro lado, em 201 isolados de leite, Araújo (1998) verificou uma resistência aproximada de 45% à Penicilina G e à Ampicilina e uma sensibilidade de 98% à Eritromicina.

Também Rapini (2004) observou 100% de resistência à Penicilina, em 45 isolados de queijo tipo coalho.

Tendo em conta os três grupos de isolados (Leite, Queijo e Outros) analisou-se o perfil de resistência dos mesmos, onde se identificou o antibiótico ou grupo de antibióticos a que se mostraram resistentes (Tabela 23).

Verifica-se que 17,5% dos isolados testados mostram resistência a mais do que um antibiótico em simultâneo, sendo designados como multiresistentes. Destaca-se a incidência de isolados multiresistentes à Penicilina G e Ampicilina (8,8%) e à Penicilina G, Ampicilina e Amoxicilina (5%). Esta multiresistência aos β -lactâmicos, acredita-se ser atribuída ao frequente uso destes antibióticos nas explorações de produção animal e leiteira, sendo por vezes utilizados inadequadamente.

A resistência a apenas um antibiótico verifica-se em 5% dos isolados.

Ao analisarmos os perfis de resistência dos quatro isolados coagulase negativa verifica-se resistência de um isolado ao Sulfametoxazol/Trimetoprim e de um outro à Penicilina, Cefazolina, Neomicina, Estreptomicina e ao Sulfametoxazol/Trimetoprim. Os restantes dois isolados manifestaram-se 100% sensíveis a todos os antibióticos. O isolado que apresenta resistência à maior parte dos antibióticos (isolado com a ref. S 216) é de diferente proveniência, tratando-se de um isolado de queijo de ovelha cru proveniente do produtor S.

Tabela 23 - Perfil de resistência dos grupos de isolados em estudo.

Perfil de Resistência	Leites (n=13)	Queijos (n=57)	Outros (n=10)	Total (n=80)
Sem resistência	30,7%	91,1%	60%	77,5% (62)
P	-	-	10%	1,25% (1)
E	-	3,5%	-	2,5% (2)
SXT	-	1,8%	-	1,25% (1)
P, AMP	46,2%	-	10%	8,75% (7)
E, S	-	-	10%	1,25% (1)
E, SXT	-	1,8%	-	1,25% (1)
P, AMP, AML	23,1%	-	10%	5% (4)
P, KZ, N, S, SXT	-	1,8%	-	1,25% (1)
Total	100%	100%	100%	

P - Penicilina G 10IU; AMP - Ampicilina 10 μ g; AML - Amoxicilina 10 μ g; KZ - Cefazolina 30 μ g; ENR - Enrofloxacin 5 μ g; N - Neomicina 30 μ g; E - Eritromicina 15 μ g; S - Estreptomicina 10 μ g; SXT - Sulfametoxazol/Trimetoprim 25 μ g; R - resistente; I - intermédio; S - sensível.

4.3.3. Análise estatística da suscetibilidade dos isolados aos antibióticos

Para verificar a existência ou não de dependência entre a ação dos antibióticos em estudo e a origem alimentar dos isolados recorreu-se ao teste de Pearson's qui-quadrado χ^2 (Tabela 24).

Tabela 24 - Teste de independência das variáveis, χ^2

Antibiótico	χ^2 calculado	<i>p-value</i>	$\alpha = 0,05$
P	64,2085	2,169 ⁻¹¹	As variáveis são dependentes $\alpha < 0,05$
AMP	87,1558	1,304 ⁻¹²	
AML	23,8596	0,001206	
KZ	0,4086	0,9997	As variáveis são independentes
ENR	255,2	<2,2 ⁻¹⁶	As variáveis são dependentes $\alpha < 0,05$
N	15,434	0,3491	As variáveis são independentes
E	6,1311	0,5245	
S	25,1595	0,03302	As variáveis são dependentes $\alpha < 0,05$
SXT	1,2577	0,9895	As variáveis são independentes

P - Penicilina G 10IU; AMP - Ampicilina 10 μg ; AML - Amoxicilina 10 μg ; KZ - Cefazolina 30 μg ; ENR - Enrofloxacina 5 μg ; N - Neomicina 30 μg ; E - Eritromicina 15 μg ; S - Estreptomicina 10 μg e SXT - Sulfametoxazol/Trimetoprim 25 μg .

Na análise dos resultados obtidos, este teste diz-nos que, para um nível de significância de 5%, a ação dos antibióticos Penicilina G, Ampicilina, Amoxicilina, Enrofloxacina e Estreptomicina é dependente da origem alimentar dos isolados em estudo. Para a Cefazolina, Neomicina, Eritromicina e Sulfametoxazol/Trimetoprim é totalmente independente da origem dos isolados, ou seja, não é relevante a origem.

Foram efetuados testes para verificar se existem diferenças estatisticamente significativas entre dois ou mais grupos, tendo em conta os antibióticos testados e os três grupos de alimentos: leite, queijo e outros. A finalidade deste estudo é verificar se existem diferenças significativas na ação dos antibióticos nos isolados dos três grupos de alimentos.

Efetuuou-se o teste de Bartlett para verificar se as variâncias eram homogêneas. Para o caso em que existiu homogeneidade efetuou-se o teste ANOVA e quando não se verificou homogeneidade efetuou-se o teste de Kruskal - Wallis (Tabela 25).

Através destes testes concluiu-se que existem diferenças significativas na ação dos antibióticos nos isolados dos três grupos de alimentos, isto é, a ação dos antibióticos Penicilina G, Ampicilina e Amoxicilina é diferente em pelo menos um grupo de alimentos. Não existem diferenças significativas na ação dos restantes antibióticos sobre os três grupos de alimentos.

Tabela 25 - Teste da homogeneidade das variâncias.

Antibiótico	Bartlett teste	<i>p-value</i>	$\alpha= 0,05$	ANOVA Pr(>F)	$\alpha= 0,05$	Kruskal-Wallis teste	<i>p-value</i>	$\alpha= 0,05$
P	46,8878	6,583 ⁻¹¹	Há diferenças significativas, variâncias heterogêneas			12,7827	0,001676	Há diferenças significativas
AMP	54,4874	1,473 ⁻¹²				16,0613	0,0003253	
AML	60,3814	7,732 ⁻¹⁴	$\alpha < 0,05$			13,8715	0,0009724	$\alpha < 0,05$
KZ	0,4627	0,7935	Não há diferenças significativas, variâncias homogêneas	0,141	Não há diferenças significativas, médias homogêneas			
ENR	0,4605	0,7943	$\alpha > 0,05$	0,0462	$\alpha > 0,05$			
N	9,3362	0,00939	Há diferenças significativas, variâncias heterogêneas			5,5077	0,06368	Não há diferenças significativas
E	19,3761	6,202 ⁻⁰⁵				2,9853	0,2248	
S	6,1741	0,04564	$\alpha < 0,05$			1,3913	0,4988	$\alpha > 0,05$
SXT	27,4906	1,073 ⁻⁰⁶				4,9382	0,084466	

P - Penicilina G 10IU; AMP - Ampicilina 10 µg; AML - Amoxicilina 10 µg; KZ - Cefazolina 30 µg; ENR - Enrofloxacina 5 µg; N - Neomicina 30 µg; E - Eritromicina 15 µg; S - Estreptomicina 10 µg e SXT - Sulfametoxazol/Trimetoprim 25 µg.

Este tipo de testes (ANOVA e Kruskal–Wallis), embora nos indique existirem ou não diferenças entre as variáveis em estudo, não nos indica em que grupo não existe essas diferenças. Por esse motivo recorreu-se ao teste *t-student* onde existe a comparação das médias dos isolados por grupo de alimentos, duas a duas, permitindo verificara ação dos antibióticos entre Leite e Queijos (L&Q), Leite e Outros (L&O) e Queijos e Outros (Q&O) (Tabela 26).

O teste *t-student* foi apenas realizado para as variáveis que se mostraram heterogéneas, tendo-se verificado existirem diferenças significativas na ação da Penicilina, Ampicilina e Amoxicilina sobre os três grupos de alimentos.

Tabela 26- Verificação da acção da Penicilina, Ampicilina e Amoxicilina sobre os isolados dos três grupos de alimentos através do Teste *t-student*.

Antibiótico	L&Q		L&O		Q&O	
	<i>p-value</i>	$\alpha=0,05$	<i>p-value</i>	$\alpha=0,05$	<i>p-value</i>	$\alpha=0,05$
P	0,0004666	$\alpha<0,05$	0,03887	$\alpha<0,05$	0,1731	$\alpha>0,05$
AMP	0,0001928	$\alpha<0,05$	0,04944	$\alpha>0,05$	0,06817	$\alpha>0,05$
AML	0,0002892	$\alpha<0,05$	0,06342	$\alpha>0,05$	0,07508	$\alpha>0,05$

P - Penicilina G 10IU; AMP - Ampicilina 10 µg; AML - Amoxicilina 10 µg; L&Q - Leite e Queijos; L&O - Leite e Outros e Q&O - Queijos e Outros.

Conclui-se, assim existirem diferenças significativas na ação da Penicilina no grupo Leite & Queijos e Leite & Outros. Verificam-se diferenças significativas na ação da Ampicilina e Amoxicilina sobre o grupo Leite & Queijos.

Foram efetuadas as médias e mais alguns parâmetros estatísticos, da medida dos halos de inibição dos dois ensaios dos antibiogramas (Tabela 27 e Anexo IX).

A partir da análise do desvio padrão pode-se concluir sobre a média dos halos de inibição obtidos, ou seja um baixo desvio padrão indica que os dados tendem a estar próximos da média, um desvio padrão alto indica que os valores médios estão espalhados por uma variada gama de valores. De uma maneira geral os valores encontram-se próximos da média, existindo um desvio padrão mais elevado nos halos de inibição dos antibióticos Penicilina, Ampicilina e Amoxicilina no grupo do Leite e no grupo Outros e no antibiótico Eritromicina no grupo do Queijo e no grupo Outros.

O coeficiente de variação (*cv*) é uma outra forma de podermos verificar a variabilidade das médias dos halos de inibição da ação de cada antibiótico sobre cada um dos três grupos.

Para os β -lactâmicos existe uma baixa dispersão de valores médios no grupo Queijo, valores médios homogéneos. O grupo Outros apresenta uma média dispersão e uma heterogeneidade de valores é verificada no grupo Leite, ou seja uma dispersão alta.

A Cefazolina, Enrofloxacina, Neomicina e Estreptomicina apresentam uma boa homogeneidade em todos os grupos. Na Eritromicina uma dispersão alta para o grupo Leite é verificada. Para o Sulfametoxazol/Trimetoprim o grupo queijo é o que apresenta uma variabilidade mais alta embora apresente uma dispersão média.

Podemos também verificar e confirmar estes dados através dos gráficos boxplots que se encontram no Anexo X. O boxplot é um gráfico construído com base no resumo dos cinco números, constituído por: Valor mínimo; Primeiro quartil (Q1); Mediana (segundo quartil Q2), Terceiro quartil (Q3) e Valor máximo. Estes valores encontram-se na Tabela 27.

Tabela 27 - Resultados de alguns parâmetros estatísticos analisados tendo em conta as médias dos halos da zona de inibição (em mm) de cada antibiótico testado.

Antibiótico	Origem	Média	Desvio padrão	IQR (Q ₃ -Q ₁)	Coefficiente de Variação	Mínimo	Q ₁	Mediana	Q ₃	Máximo
	Alimentar									
P	Leite	23,3	11,224508	19,35	0,48173855	11,2	15,85	17,8	35,2	42,6
	Outros	33,29	10,142459	17,19	0,30471560	16,6	23,93	37,8	41,11	42,05
	Queijo	38,06	3,33	2,18	0,08753003	20,3	37,21	38,38	39,39	45,7
AMP	Leite	23,24	9,435529	14,35	0,40595008	12,9	16,9	18,9	31,35	39,7
	Outros	31,27	8,745223	16,44	0,27971286	18,35	22,73	34,63	39,16	39,65
	Queijo	37,02	2,588331	1,85	0,06992638	27,3	36,25	37,1	38,1	44,8
AML	Leite	26,89	9,597067	13,75	0,35687032	17,45	20,35	22,9	34,1	43,65
	Outros	34,57	8,921952	16,36	0,25808365	19,85	26,34	37,08	42,7	43,65
	Queijo	40,27	2,456310	2,35	0,06100333	33,15	39,2	40,6	41,55	48,45
KZ	Leite	32,73	3,726512	3,45	0,11385348	24,75	31,15	33,05	34,6	38,55
	Outros	33,85	3,827604	7,34	0,11307546	29,7	30,15	33,3	37,49	38,65
	Queijo	34,8	3,337284	1,45	0,09590235	13,8	34,35	35,1	35,8	41,9
ENR	Leite	29,85	1,777459	1,8	0,05955402	26,75	28,9	30,3	30,7	32,65
	Outros	30,13	2,108218	1,53	0,06998234	27	29,31	29,98	30,84	30,20
	Queijo	28,26	2,078503	1,75	0,07353652	20,55	27,2	27,9	28,95	35,05

Antibiótico	Origem Alimentar	Média	Desvio padrão	IQR (Q ₃ -Q ₁)	Coefficiente de Variação	Mínimo	Q ₁	Mediana	Q ₃	Máximo
N	Leite	17,54	1,347196	2,2	0,07679694	15,4	16,3	18,2	18,5	19,2
	Outros	18,12	1,051771	0,54	0,05804476	16,3	17,69	18,1	18,23	19,8
	Queijo	18,58	2,25	1,1	0,12111206	9,8	17,9	18,65	19	26,6
E	Leite	27,94	1,970853	2,6	0,07054555	24,35	27	27,59	29,6	31,35
	Outros	25,08	9,005407	1,14	0,35913888	0	26,4	27,33	27,54	31,45
	Queijo	25,63	6,329276	1,15	0,24690399	0	26,45	27,15	27,6	32,55
S	Leite	14,36	1,462896	0,95	0,1018621	10,85	14,4	14,85	15,35	15,9
	Outros	13,89	1,458462	1,36	0,1050009	10,50	13,51	14,35	14,88	15,05
	Queijo	14,39	2,403523	0,9	0,1670558	0	14	14,45	14,9	20,4
SXT	Leite	25,96	1,778711	1,75	0,06851333	22,3	25,35	26,55	27,1	28,6
	Outros	26,82	1,826533	2	0,06810339	23,2	26,11	26,48	28,11	29,7
	Queijo	24,48	5,97	1,32	0,23300887	0	25,24	25,85	26,56	27,8

P - Penicilina G 10IU; AMP - Ampicilina 10 µg; AML - Amoxicilina 10 µg; KZ - Cefazolina 30 µg; ENR - Enrofloxacin 5 µg; N - Neomicina 30 µg; E - Eritromicina 15 µg; S - Estreptomicina 10 µg e SXT - Sulfametoxazol/Trimetoprim 25 µg.

5. Conclusão

Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam que a PCR multiplex é um método rápido e sensível para a detecção de SE. Considerando o baixo custo e o tempo reduzido necessário para detetar os genes de *S. aureus*, acredita-se que esta seja uma poderosa ferramenta para estudar os genótipos de isolados de *Staphylococcus*.

Isolados resistentes aos antibióticos podem ser transmitidos para os seres humanos pelo consumo de produtos alimentares que contenham tais bactérias resistentes e multirresistentes. Deve ser evitado o uso de antibióticos como promotores de crescimento na criação de animais, especialmente daqueles vulgarmente utilizados tanto para cuidados animais como humanos.

Tendo em conta a origem dos isolados em estudo, a maior percentagem de isolados resistentes foi detectada em isolados de leite de vaca, em que 100% dos isolados foram resistentes à Ampicilina e Penicilina G e 25% à Amoxicilina. Estes resultados levam-nos a questionar o uso inadequado de antibióticos na produção leiteira. Apesar do controlo que já existe a nível da restrição de antibióticos em produção animal, ainda há muito a ser feito, incluindo o estabelecimento de programas de vigilância epidemiológica, a fim de controlar o surgimento de estirpes resistentes.

No caso dos produtos alimentares de origem animal, principalmente em leite e seus derivados, a qualidade inicia-se na produção primária e depende da adoção de Boas Práticas Agropecuárias em todas as etapas de produção. Tais medidas visam garantir a higiene, a segurança e a qualidade do produto, além de incluir cuidados com a saúde dos trabalhadores envolvidos na produção. O estado sanitário do rebanho, a higiene do ordenhador e as condições das instalações e dos equipamentos são alguns dos fatores que afetam a qualidade higiénico-sanitária do leite, permitindo a presença ou não de microrganismos no produto final.

Com base nos resultados neste e em outros trabalhos do mesmo âmbito, teria todo o interesse a criação de um sistema de vigilância epidemiológica a nível nacional, onde fossem divulgados todos os dados acerca da prevalência de *S. aureus* bem como de outros microrganismos de elevada importância (*E. coli*, *L. monocytogenes*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter*, entre outros). De igual interesse e importância a divulgação de padrões de resistência e a sua evolução em todos os pontos da cadeia alimentar, podendo ao mesmo tempo ser criadas estratégias de controlo de forma a diminuir a incidência das zoonoses e toxinfecções provocadas por estes microrganismos.

6. Bibliografia

- André, M. C., M. R. H. Campos, L. J. Borges, A. Kipnis, F. C. Pimenta e A. B. Serafini. 2008. Comparison of *Staphylococcus aureus* isolates from food handlers, raw bovine milk and Minas Frescal cheese by antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis following Smal digestion. *Food Control*, 19: 200– 207.
- Anvisa, 2014. Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo5/introducao2.htm. Acedido em Janeiro 2014.
- Araújo, W. P. 1998. A Fagotipagem de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a antibióticos, isoladas de leite. *Braz J. vet. Res. anim. Sci.* 35 (4): 161-165.
- Baptista, M. 2013. Mecanismos de resistência aos antibióticos. Diss. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia. Faculdade de Ciências e Tecnologias da Saúde. Lisboa.
- Bacteria in photos, 2014. Disponível em <http://www.bacteriainphotos.com/bacteria-photo-gallery.html#staphylococcus>. Acedido em Maio 2014.
- Bassani, M. T. 2009. Caracterização de grupos agr e sua relação com perfil enterotoxigênico e antimicrobiano em *Staphylococcus aureus* isolados de diferentes origens. Diss. Universidade Federal de Pelotas. Brasil.
- Biomedicina& Microbiologia, 2014. Disponível em <http://biomedicinaemicro.blogspot.pt/p/culturas-bacterianas.html>. Acedido em Maio 2014.
- Borges, M., E. F. Arcuri, J. L. Pereira, T. Feitosa e A. Y. Kuaye. 2008(a). *Staphylococcus* enterotoxigênicos em leite e produtos lácteos, suas enterotoxinas e genes associados: revisão. *B.CEPPA, Curitiba* 26 (1): 71-86.
- Borges, M., R.Nassu,J.Pereira, A.Andrade e A. Kuaye. 2008(b). Perfil de contaminação por *Staphylococcus* e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. *Ciência Rural*. 38:1431-1438.
- Casman, E. P., R. W. Bennett, A. E. Dorsey e J. E. Stone. 1969. The micro-slide gel double diffusion test for the detection and assay of staphylococcal enterotoxins. *Health Lab. Sci.* 6: 185-98.
- Centerlab. 2009. Antibiograma. Centerlab News, informático técnico-científico ed.24. Central de artigos para laboratórios LTDA.
- Chambers, H. F. 1997. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev.* 10(4): 781-91.
- CLSI. 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-second. Clinical and Laboratory Standards Institute.M100-S22.32(3).
- Cordeiro, M. 2011. Caracterização molecular de cepas de *Staphylococcus aureus* isoladas no Hospital Municipal de Ipatinga-MA. Diss. Universidade Federal de Ouro Preto, Núcleo de pesquisa em Ciências Biológicas. Brasil.
- Coyle, M. 2005. Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing. American Society for Microbiology.
- Doumith M., C. Buchrieser, P. Glaser, C. Jacquet e P. Martin, 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 42 (8): 3819-3822.
- ECHCP.2003. Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on staphylococcal enterotoxins in milk products, particular lycheeses. European Commission Health & Consumer Protection Directorate-general.

EFSA. 2014. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. European Food Safety Authority. EFSA Journal 12(2):3547.

Fonte, A. 2012. Queijo de Coalho do Sertão Alagoano: Enterotoxigenicidade de *S. aureus* pela reacção em cadeia da polimerase (PCR). Diss. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa.

Furtado, R., A. Coelho, C. Correia, M. Saraiva, I. Cunha e M. Calhau. 2014. Enterotoxinas estafilocócicas em géneros alimentícios. Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge. Boletim Epidemiológico 13.

Gandra, T., M. Oliveira, M. Milena e W. Silva. 2009. Perfil de Resistência/Sensibilidade a antibióticos em cepas de Estafilococos coagulase positiva isoladas de embutidos e de queijos. XI ENPOS I Mostra Científica. Brasil.

Hennekinne, J., A. Ostyn, F. Guillier, S. Herbin, A. Pruger e S. Dragacci, 2010. How Should Staphylococcal Food Poisoning Outbreaks Be Characterized?. Toxins 2:2106-2116.

Hui, Y. H., M.D. Pierson, e J. R. Gorham. 2001. Disease Handbook. Second Edition. Vol. I. New York. Marcel Dekker, inc. p.347-372.

ICMSF: International Commission on Microbiological Specifications for Foods. 1996. Microorganismos de los alimentos: Características de los Patógenos Microbianos. Editorial Acirbia, S.A., Zaragoza - Espana: cap 17; p. 349-385.

Infarmed. 2013. Prontuário terapêutico 11. Lisboa: Infarmed, Ministério da Saúde.

Jorgensen, J. e M. Ferraro. 2009. Antimicrobial Susceptibility Testing: A review of General Principles and Contemporary Practices. Medicinal Microbiology. 49:1749-55.

Katzung, B. 2007. Farmacologia Básica e Clínica 10ª ed. Brasil: McGraw Hill.

Khan, A. S., C. J. Cao, R. G. Thompson e J. J. Valdes. 2003 A simple and rapid fluorescence-based immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin B. Mol. Cell. Probes. 17: 125-126.

Laborclin. 2011. Manual para Antibiograma Difusão em Disco (Kirby & Baur). Laborclin Produtos para laboratório Ltda.

Lee, J. H., J. M. Jeong, Y. H. Park, S. S. Choi, Y. H. Kim e J. S. Chae. 2004. Evaluation of the methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) -screen latex agglutination test for detection of MRSA of animal origin. J. Clin. Microbiol. 42: 2780-2782

Martins, P. 2012. Análise da distribuição das espécies, da prevalência de genes de enterotoxinas e do perfil de resistência a antibióticos de isolados Estafilococos coagulase positiva de carne de frango resfriada e congelada. Diss. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

Medley. 2007. Antibióticos. Programa de Desenvolvimento Profissional ao Farmacêutico. Ano II nº9.

Mehrotra, M., G. Wang e W. M. Johnson. 2000. Multiplex PCR for detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Exfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin Resistance. Journal of Clinical Microbiology 38(3): 1032-1035.

Microbiologia online, 2014. Disponível em <http://microbiologiaonlineblog.blogspot.pt/>. Acedido em Abril 2014.

Molina, A. e P. Tobo. 2004. Série - Biologia Molecular, actualização. Parte 2 - Uso das técnicas de biologia molecular para diagnóstico. Einstein, 2 (2): 139-142.

- Nader Filho, A., L. M. Ferreira, L. A. Amaral, O. D. Rossi Junior e R. P. Oliveira. 2007. Sensibilidade antimicrobiana dos *Staphylococcus aureus* isolados no leite de vacas com mastite. Arq. Inst. Biol. São Paulo. 74 (1): 1-4.
- Novick, R. P., P. Schlievert e A. Ruzin. 2001. Pathogenicity and resistance islands of staphylococci. Microbes and Infection, 3 (7): 585-594.
- Onoue, Y. e M. Mori. 1997. Amino acid requirement for growth and enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* in chemically defined media. Int. J. Food Microbiol. 36: 77 – 82
- Ortega, E., H. Abriouel e R. Lucase Gálvez. 2010. Review Multiple Roles of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins: Pathogenicity, Superantigenic Activity, and Correlation to Antibiotic Resistance. Toxins. 2:2117-2131.
- Pelisser, M. 2008. Clonagem, expressão e purificação de lipase de *Staphylococcus xylosus* e detecção de genes de enterotoxinas de *Staphylococcus aureus* isolados de produtos de origem animal. Diss. Universidade federal de Santa Catarina, Centro de ciências agrárias, departamento de ciência e tecnologia de alimento. Florianópolis. Brasil.
- Pereira, M. L., L. Carmo, E. J. Santos, J. L. Pereira e M. S. Bergdoll. 1996. Enterotoxin H in staphylococcal food poisoning. J. Food Prot. 59: 559 – 561.
- Pereira, V., A. Lopes, A. Castro, J. Silva, P. Gibbs e P. Teixeira. 2009. Characterization for enterotoxin production, virulence factors, and antibiotic susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolates from various foods in Portugal. Food Microbiology 26: 278-282.
- Pinchuk, I., E. Beswick e V. Reyes. 2010. Review Staphylococcal Enterotoxins. Toxins. 2:2177-2197.
- Pinterest, 2014. Disponível em <http://www.pinterest.com>. Acedido em Junho 2014.
- PNCI. 2004. Orientações para a elaboração de um manual de boas práticas em Bacteriologia. Programa Nacional de Controlo de Infecção. Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.
- Pond5, 2014. Disponível em <http://www.pond5.com/illustration/22841498/staphylococcus-aureus-bacterium.html>. Acedido em Maio de 2014.
- Rahimi, E. e A. Forough. 2013. Presence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in cow, camel, sheep, goat, and buffalo bulk tank milk. Veterinarski arhiv. 83 (1): 23 – 30.
- Rapini, L., J. Teixeira, N. Martins, M. Cerqueira, M. Souza e F. Penna. 2004. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus sp.* isoladas de queijo tipo coalho. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 56 (1): 130-133.
- Santiliano, F.C., B.R. Alemida, M. D. C. Ignacchiti e O. S. P. Pereira Junior. 2011. Análise comparativa dos métodos de detecção de enterotoxinas estafilocócicas de importância. Pubvetmédica e veterinária, 5 (3): 1327-1342.
- Santos, A., O. Santos, C. Freitas, B. Ferreira, I. Afonso, C. Rodrigues e H. Castro. 2007. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. JBrasPatolMedLab. 43(6): 413-423.
- Serafim, M. 2013. Identificação e perfil de resistência a antimicrobianos de bactérias isoladas de diferentes amostras provenientes do aterro controlado da cidade de Campos dos Goytacazes- RJ. Diss. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro Campos dos Goytacazes/RJ. Brasil.
- Souza, M., C. Reis e F. Pimenta. 2005. Revisão sobre a aquisição gradual de resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos. Revista de Patologia Tropical. 34(1): 27-36.

Su, Y. e A. C. Wong. 1995. Identification and Purification of a New Staphylococcal Enterotoxin. H. Applied and Environmental Microbiology 61 (4):1438- 1443.

Tavares, W. 2000. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. Rer. Sociedade Brasiseleira de Medicina Tropical. 33 (3): 281- 301.

Tenover, F. 2006. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. The American Journal of medicine. 119(6A): S3-S9.

Velázquez, M. E. 2005. *Staphylococcus aureus* methicillin-resistant: emergence and dissemination. Salud Pública de México. 47: 381-7.

Vernozy-Rozand C., C. Mazuy, G.Prevost, C. Lapeyre, M. Bes, Y. Brun e J. Fleurette. 1996. Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci isolated from goats milk and cheese. Int. J Food Microbiol. 30(3): 271-80.

Vernozy-Rozand, C., C. Mazuy-Cruchaudet, C. Bavai e Y. Richard. 2004. Comparison of tree immunological methods for detecting staphylococcal enterotoxins from food. Letters in Applied Microbiology. 39: 490-494.

WHO. 2001. Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2.

WHO. 2014. Antimicrobial Resistance: Global Report on surveillance. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.

Zoche, F. 2008. *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos: PCR para detecção em queijo minas frescal e caracterização do agrupamento *egc* em isolados obtidos em alimentos de origem animal. Diss: Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Universidade Federal de Pelotas. Brasil.

Zoche, F., R. C. França, J. A. Guimarães Aleixo, A. N. Moreira e W. P. Silva. 2009. PCR Multiplex para detecção de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos isolados de alimentos de origem animal no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. I nterciencia 34(7): 487-491.

Anexos

Anexo I- Métodos clássicos de avaliação do perfil bacteriano de suscetibilidade a antibióticos

Método	Vantagens	Desvantagens
Macrodiluição em tubos	A determinação do resultado quantitativo, a CIM	A quantidade de reagentes utilizada; O espaço necessário para o armazenamento dos tubos; A possibilidade da ocorrência de erros durante a preparação das concentrações antimicrobianas; O trabalho manual dispendioso na preparação do teste.
Microdiluição em caldo	A economia de espaço e de reagentes em razão da miniaturização do teste dilucional; A reprodutibilidade dos resultados devido à possibilidade de preparação de grande quantidade de placas a partir da mesma série de diluições de antimicrobianos; A geração de um resultado quantitativo (CIM); A conveniência de poder utilizar placas pré-fabricadas e sistemas computadorizados, fornecidos pelos fabricantes das placas, para o relato dos resultados.	A inflexibilidade na escolha dos antimicrobianos a serem testados quando se utilizam as placas pré-fabricadas; O custo de cada placa de microdiluição.
Ágar-diluição	A habilidade de testar um grande número de amostras simultaneamente; O custo relativamente baixo; Permitir a determinação quantitativa da CIM; Testar bactérias fastidiosas que não apresentam bom crescimento em caldo.	Método muito trabalhoso tanto no que se refere à preparação das placas como do inóculo bacteriano. As placas de agar contendo antimicrobianos devem ser preparadas preferencialmente no dia em que são utilizadas, porque pode haver perda da potência antimicrobiana durante o armazenamento das placas.

Método	Vantagens	Desvantagens
Etest®	<p>A flexibilidade na escolha dos agentes antimicrobianos a serem testados;</p> <p>A fácil execução e o fornecimento de um resultado quantitativo (CIM).</p>	<p>O alto custo das fitas;</p> <p>O número limitado de antibióticos testados por placa.</p>
Disco-difusão	<p>É um dos métodos de sensibilidade mais simples e confiáveis</p> <p>A fácil execução;</p> <p>A reprodutibilidade;</p> <p>A utilização de reagentes de baixo custo;</p> <p>Resultados de fácil interpretação clínica;</p> <p>Flexibilidade quanto à escolha dos antimicrobianos e a não exigência de equipamentos especiais.</p>	<p>A falta de mecanização ou automatização do teste;</p> <p>A não-padronização deste método para algumas combinações de microrganismos e agentes antimicrobianos (<i>S. pneumoniae</i> versus cefalosporinas e <i>Acinetobacter</i> spp. versus polimixinas, por exemplo);</p> <p>Muitas vezes este método pode não ser adequado para a detecção de mecanismos de resistência resultantes da produção de β-lactamases (enterococos versus ampicilina) e de outros mecanismos mais complexos, como o estafilococo com sensibilidade diminuída a glicopeptídeos.</p>

Anexo II- Preparação da solução de lise - Dodecil sulfato de sódio a 0,25% em 0,05N NaOH estéril

Partindo de uma concentração de NaOH a 0,1N e, recorrendo à equação das diluições:
 $C_i \times V_i = C_f \times V_f$

C_i = Concentração inicial

C_f = Concentração final

V_i = Volume inicial

V_f = Volume final

Para obter por exemplo 250ml de solução de NaOH a 0,05N temos:

$$V_i = (C_f \times V_f) / C_i$$

$$C_i = 0,1N$$

$$C_f = 0,05N$$

$$V_f = 250ml$$

Então:

$$V_i = (0,05N \times 250ml) / 0,1N$$

$$V_i = \underline{125 \text{ ml}}$$

Logo, 125 ml é a quantidade de NaOH a 0,1N que é necessário medir, para um balão volumétrico de 250ml, perfazendo com água destilada até à marca.

Para preparar por exemplo 100ml de solução de Dodecilsulfato de sódio a 0,25% em 0,05N NaOH, pesa-se 0,25g de Dodecil sulfato de sódio e adiciona-se a 100ml de NaOH a 0,05N, esterilizando-se a seguir por filtração.

Anexo III - Preparação do gel de agarose

Características da Agarose:

Agarose da marca Bioron, ref^a60400

Deverá ter-se em conta o tipo de agarose, pois a qualidade do trabalho e a velocidade da corrida de electroforese podem ser influenciados pelas características da agarose.

O gel é preparado em função da espessura, da percentagem de agarose que se pretende usar e do tipo de tina.

Se for utilizada a Tina Bio-Rad (*Wide Mini-Sub Cell GT*) pode tomar-se como referencia os volumes de tampão necessários para obter uma determinada espessura, como pode ser visto na tabela seguinte:

Tabela 28- Volume de tampão/ espessura do gel

Espessura do gel (mm)	Volume de tampão (ml)	Volume da tina (ml)	Dimensão do gel (mm)
2,5	30	650-900	150×100
5,0	60		
7,5	90		
10	120		

Modo de preparação

Figura 26):

Para obter um gel a 2% e com uma espessura de 5 mm, pesar 1,2g de agarose colocar num frasco apropriado e adicionar 60ml de tampão TBE 1×.

Levar ao microondas até dissolver completamente, até ficar transparente sem grumos, tendo o cuidado de não deixar ferver para evitar a saída do recipiente.

Deixar arrefecer à temperatura ambiente naturalmente (não se deve arrefecer de forma brusca).

Depois de arrefecido, temperatura que se suporte nas mãos, verter no tabuleiro de preparação do gel já com o pente colocado, para formar os poços, que serão cheios com as amostras de DNA) e deixar solidificar.

Após solidificação do gel, retirar o pente e colocar o gel na tina, cobrir com a solução tampão TBE 1× de modo a que o gel fique submerso, para que a agarose não desidrate.

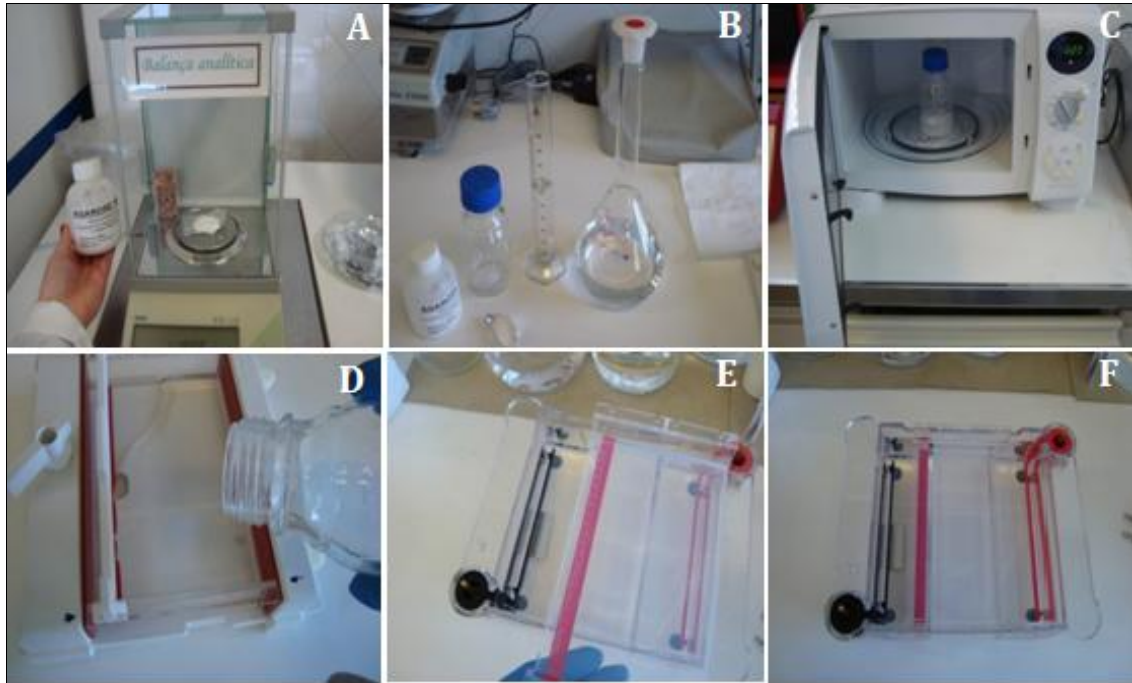


Figura 26 - Preparação do gel de agarose

Anexo IV- Preparação da solução tampão TBE 1×

Características do tampão:

TBE Buffer 10×, pH 8.3 da *nzytech* (ref.^a MB11501) que se encontra em forma de pó (0,89 M de Tris-acetato, 0,89 M de ácido bórico e 0,02 M de EDTA)(

Figura 27).



Figura 27 - Apresentação TBE Buffer 10X antes da sua preparação

Modo de preparação:

Para a preparação dissolver o conteúdo em 1000ml de água destilada obtendo-se uma solução tampão TBE 10×. Tanto para a preparação do gel como para a tina o tampão utilizado é TBE 1×.

Para a preparar 1l de TBE 1× recorre-se à equação das diluições: $C_i \times V_i = C_f \times V_f$

(C_i): concentração inicial

(C_f): concentração final

(V_i): Volume inicial

(V_f): volume final

Em que:

$$V_i = (C_f \times V_f) / C_i$$

$$(C_i) = 10$$

$$(C_f) = 1$$

$$(V_i) = ?$$

$$(V_f) = 1000\text{ml}$$

$$V_i = (1 \times 1000) / 10$$

$$\underline{V_i = 100\text{ ml}}$$

Assim para preparar 1 litro de solução TBE1×, medir 100ml de solução concentrada TBE10× e perfazer num balão volumétrico com água destilada até obter 1000ml.

Anexo V-Marcador NZYDNA Ladder VI

Características do marcador:

NZYDNA Ladder VI da marca nzytech

É um marcador de peso molecular pronto a usar (

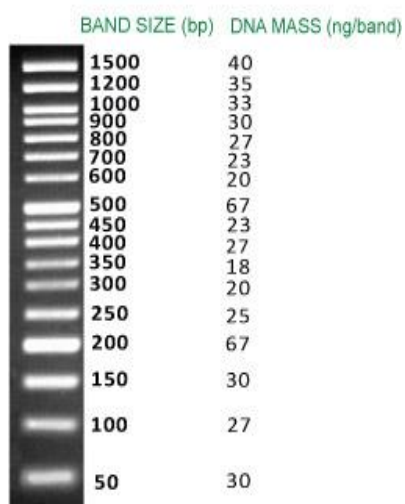
Figura 28), facilita a quantificação e determinação de fragmentos de pequeno tamanho de DNA em gel de agarose.



Figura 28 - NZYDNA Ladder VI, nzytech

O gel precisa de conter pelo menos 2% de concentração de agarose para permitir a identificação clara de cada banda. NZYDNA Ladder VI produz um padrão de 17 bandas espaçadas regularmente, que vão de 50-1500 pb,

Figura 29.



As bandas de 200 e 500 pb apresentam uma mancha brilhante para ajudar na identificação. NZYDNA Ladder VI deve ser armazenado a -20°C até à primeira utilização. Depois disso, o produto pode ser armazenado a 4°C até 6 meses, deve-se evitar vários ciclos de congelamento/descongelamento, pois estes podem danificar o produto.

Para evitar vários ciclos de congelamento e descongelamento o marcador foi dividido por tubos PCR, sendo guardado em cada tubo $20\mu\text{l}$.

Figura 29- Amplificação do marcador

Fonte: <https://www.nzytech.com>

Anexo VI - Preparação do brometo de etídio

Características do Brometo de Etídio:

Brometo de Etídio, ref^a 17-1328-01 da marca Plusone®. É um reagente tóxico por contacto (mutagénico).

Modo de preparação:

A concentração do Brometo de Etídio é de 10mg/ml (Solução Sotck) mas é usado com uma concentração de 0,5µl/ml (Solução de trabalho).

Recorrendo à equação das diluições e para preparar por exemplo um volume de 200ml de solução temos:

$$V_i = (C_f \times V_f) / C_i$$

(C_i): concentração inicial=10mg/ml=10000µg/ml

(C_f): concentração final =0,5µl/ml

(V_i): Volume inicial =?

(V_f): volume final=200ml

em que:

$$V_i = (0,5\mu\text{l}/\text{ml} \times 200\text{ml}) / 10000\mu\text{g}/\text{ml} = 0,01\text{ml}$$

$$1000\mu\text{l} \text{-----} 1\text{ml}$$

$$X \text{-----} 0,01\text{ml}$$

$$X = 10\mu\text{l}$$

Para se obter 200ml de solução de Brometo de Etídio mede-se 10µl de Brometo de Etídio e adiciona-se 200ml de água destilada.

Instruções de utilização:

Usar sempre luvas e bata;

Colocar a solução de Brometo de Etídio preparada, numa tina e mergulhar o gel durante 15 minutos (se a solução já tiver sido usada algumas vezes, prolongar o tempo de permanência do gel);

Após o tempo de coloração o gel deverá ser retirado com muito cuidado para uma tina contendo água destilada, para diluir ligeiramente o Brometo de Etídio e de seguida colocar o gel no transiluminador;

Antes de ligar o transiluminador devem ser colocados óculos de protecção UV, depois de ligado observar a imagem do gel e captar com a câmara digital devidamente adapta

Anexo VII- Resultados obtidos em *Microgen Software System (MID-60)*

No teste Microgen™ Staph-ID da Microgen obteve-se o número de perfil que ao ser introduzido no programa Microgen Software System (MID-60) deu como resultados os indicados na

Figura 30 e Figura 31.

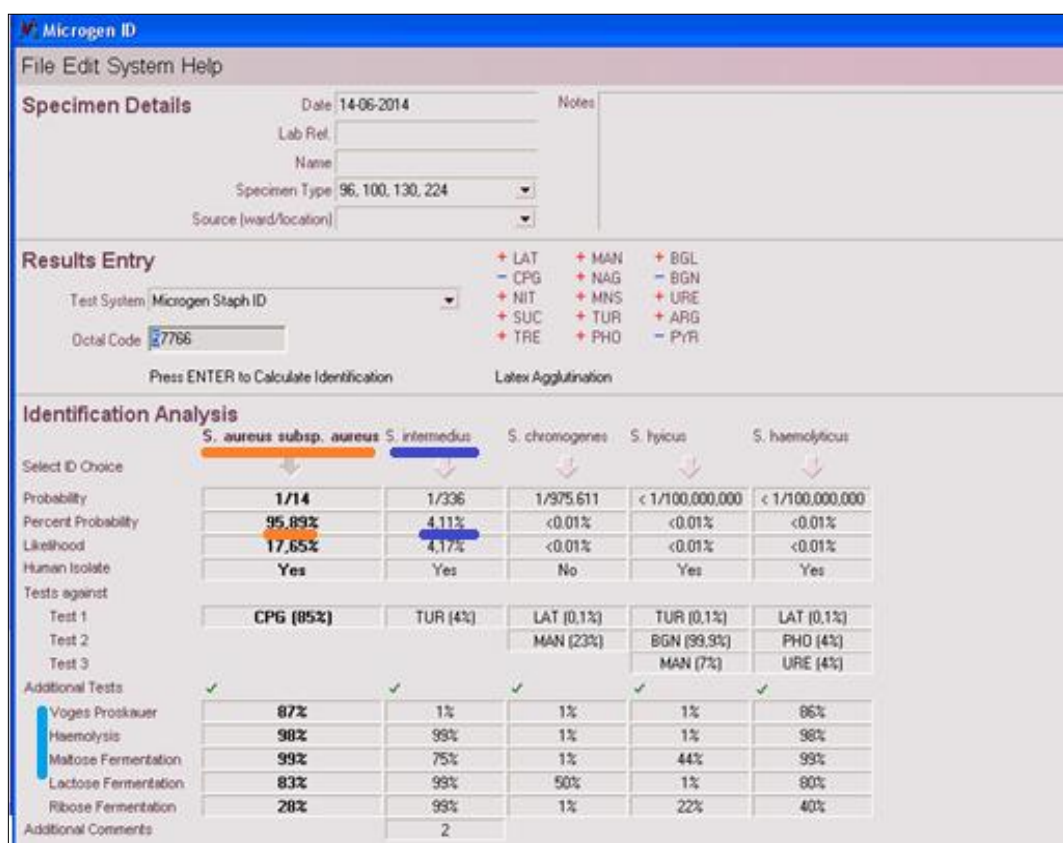


Figura 30 - Isolados S96, S100, S130, S224 e O33a sem amplificação de fragmentos de genes enterotoxigénicos e *femA*.

Microgen ID
File Edit System Help

Specimen Details
Date: 14-06-2014
Lab Ref.:
Name:
Specimen Type: 221, 222
Source (ward/location):

Results Entry
Test System: Microgen Staph ID
Octal Code: 27762
Press ENTER to Calculate Identification
Latex Agglutination:
+ LAT + MAN + BGL
- CPG + NAG - BGN
+ NIT + MNS - URE
+ SUC + TUR + ARG
+ TRE + PHO - PyR

Identification Analysis

	<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	<i>S. intermedius</i>	<i>S. lentus</i>	<i>S. haemolyticus</i>	<i>S. chromogenes</i>
Select ID Choice	↓	↓	↓	↓	↓
Probability	1/66	1/336	1/6,069,022	1/9,396,711	1/18,536,612
Percent Probability	83.66%	16.34%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Likelihood	3.87%	4.17%	<0.01%	<0.01%	<0.01%
Human Isolate	Yes	Yes	No	Yes	No
Tests against					
Test 1	CPG (85%)	TUR (4%)	LAT (0.1%)	LAT (0.1%)	LAT (0.1%)
Test 2	URE (82%)		ARG (0.1%)	PHO (4%)	URE (95%)
Test 3			PHO (20.1%)	MNS (7%)	MAN (23%)
Additional Tests	✓	✓	✓	✓	✓
Voges Proskauer	87%	1%	7%	96%	1%
Raffinose Fermentation	1%	1%	99%	1%	1%
Ribose Fermentation	28%	99%	20%	40%	1%

Figura 31 - Isolados S221 e S222 sem amplificação de fragmentos de genes enterotoxigênicos e *femA*.

Anexo VIII - Registo de resultados de todas as provas efectuadas aos isolados em estudo

Origem	Isolado	Coagulase	DNase	Hemólise	PCR	P	AMP	AML	KZ	ENR	N	E	S	SXT
Queijo	Z 70	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	S
Queijo	Z 71	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Queijo	Z 78	Negativo	Negativo	Negativo	<i>sem genes</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	R
Queijo	Z 86b	Negativo	Negativo	Positivo	<i>sem genes</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Queijo	Z 34	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	S
Queijo	Z 37	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Queijo	Z 45	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Fema</i>	S	S	S	S	S	I	S	I	S
Queijo	Z 188	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	S
Queijo	Z 190	Negativo	NF	Negativo	<i>sem genes</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	Z 191	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Queijo	Z 192	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Fema</i>	S	S	S	S	S	I	S	I	S
Queijo	Z 205a	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	S
Queijo	Z 205b	Positivo	NF	Positivo	<i>Fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	Z 13"	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Fema</i>	S	S	S	S	S	I	S	I	S
Queijo	Z 17"	Positivo	NF	Positivo	<i>Fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	Z 31"	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Fema</i>	S	S	S	S	S	I	S	I	S
Queijo	Z 201	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	S
Queijo	Z 228	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	S
Queijo	Z 273	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Queijo	Z 276	Positivo	NF	Positivo	<i>Fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	Z 277	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Queijo	Z 280	Positivo	NF	Positivo	<i>Fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF

Origem	Isolado	Coagulase	DNase	Hemólise	PCR	P	AMP	AML	KZ	ENR	N	E	S	SXT
Queijo	Z 317	Negativo	Negativo	Positivo	<i>sem genes</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Queijo	Z 334	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Fema</i>	S	S	S	S	S	I	S	I	S
Leite	S 92	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	S
Queijo	S 95	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Queijo	S 96	Positivo	NF	Positivo	<i>sem genes</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Queijo	S 100	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sem genes</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 101	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Queijo	S 106	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	S
Queijo	S 109	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 113	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Queijo	S 114	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 119	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Queijo	S 123	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 125	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 126	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 127	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 124	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 129	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	S
Queijo	S 130	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sem genes</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Queijo	S 131	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	S
Queijo	S 46	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Queijo	S 47	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 50	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Queijo	S 51	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 52	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF

Origem	Isolado	Coagulase	DNase	Hemólise	PCR	P	AMP	AML	KZ	ENR	N	E	S	SXT
Queijo	S 54	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	S
Queijo	S 55	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 56	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	S
Queijo	S 60	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 61	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	S
Queijo	S 64	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 65	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	S
Queijo	S 66	Positivo	NF	Positivo	<i>Fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 67	Positivo	NF	Positivo	<i>Fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 68	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Queijo	S 3	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Queijo	S 6	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 8	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Queijo	S 10	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 13	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	S
Queijo	S 15	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 17	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 18	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 19	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 20	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 22	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Queijo	S 23	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 29	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 30	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	S
Queijo	S 31	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF

Origem	Isolado	Coagulase	DNase	Hemólise	PCR	P	AMP	AML	KZ	ENR	N	E	S	SXT
Queijo	S 197a	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	S
Queijo	S 197b	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 181	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Queijo	S 185	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 216	Negativo	Negativo	Negativo	<i>sem genes</i>	R	I	S	R	S	R	S	R	R
Queijo	S 219	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Queijo	S 221	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sem genes</i>	S	S	S	S	S	S	R	I	S
Queijo	S 222	Positivo	NF	Positivo	<i>sem genes</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 223	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Fema</i>	S	S	S	S	S	S	R	I	S
Queijo	S 224	Positivo	NF	Positivo	<i>sem genes</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 225	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	S
Queijo	S 157	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	S
Queijo	S 159	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 160a	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 204a	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 204b	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 178	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Queijo	S 164	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Queijo	S 167	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Fema</i>	S	S	S	S	S	S	R	I	R
Queijo	S 173	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Queijo	S 246	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	S
Queijo	S 247	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Queijo	S 253	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Queijo	S 262	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Queijo	S 263	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF

Origem	Isolado	Coagulase	DNase	Hemólise	PCR	P	AMP	AML	KZ	ENR	N	E	S	SXT
Queijo	S 253	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 262	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 263	Positivo	NF	Positivo	<i>sec + fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
Queijo	S 367	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
L vaca	L 2	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Fema</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S
L vaca	L 4	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S
L vaca	L 12	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Fema</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S
L vaca	L 13	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Fema</i>	R	R	R	S	S	I	S	S	S
L vaca	L 14	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Fema</i>	R	R	R	S	S	I	S	I	S
L vaca	L 15	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Fema</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S
L vaca	L 16	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Fema</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S
L vaca	L 17a	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Fema</i>	R	R	S	S	S	I	S	I	S
L vaca	L 17b	NF	NF	NF	<i>Fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
L ovelha	L 29	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Fema</i>	R	R	R	S	S	I	S	I	S
L ovelha	L 30a	NF	NF	NF	<i>Fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
L ovelha	L 30b	NF	NF	NF	<i>Fema</i>	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF
L ovelha	L 31	Positivo	Positivo	Positivo	<i>see + fema</i>	S	S	S	S	S	I	S	I	S
L cabra	L 35	Positivo	Positivo	Positivo	<i>see + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
L cabra	L 36	Positivo	Positivo	Positivo	<i>see + fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Jesuíta	O 33a	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sem genes</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	S
Jesuíta	O 33b	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Jesuíta	O 34	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C.Portug.	O 20	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	R	R	R	S	S	S	S	I	S
C.Portug.	O 32	Positivo	Positivo	Positivo	<i>see + fema</i>	S	S	S	S	S	I	S	I	S
S.atum	O 6a	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sea + fema</i>	R	R	S	S	S	S	S	S	S

Origem	Isolado	Coagulase	DNase	Hemólise	PCR	P	AMP	AML	KZ	ENR	N	E	S	SXT
S.atum	O 7b	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sea + fema</i>	R	I	S	S	S	S	S	S	S
Salmoura	O 25a	Positivo	Positivo	Positivo	<i>Fema</i>	S	S	S	S	S	S	S	I	S
Salmoura	O 26	Positivo	Positivo	Positivo	<i>sec + fema</i>	S	I	S	S	S	S	R	R	S
Salmoura	O 28	Positivo	Positivo	Positivo	<i>see + fema</i>	S	S	S	S	S	I	S	I	S

Z - produtor Zebras; S - produtor Soalheira; O - outros alimentos; NF - não foi efectuado; P - Penicilina G 10IU; AMP - Ampicilina 10 µg; AML - Amoxicilina 10 µg; KZ - Cefazolina 30 µg; ENR - Enrofloxacin 5 µg; N - Neomicina 30 µg; E - Eritromicina 15 µg; S - Estreptomicina 10 µg e SXT - Sulfametoxazol/Trimetoprim 25 µg.

Anexo IX - Média dos halos da zona de inibição (em mm) de cada antibiótico testado em todos os isolados em estudo.

Origem	Isolado	P	AMP	AML	KZ	ENR	N	E	S	SXT
Queijo	Z 70	37,9	39,3	42,9	37,2	29,9	17,6	27,9	13,3	27,2
Queijo	Z 71	37,1	36,1	38,9	33,7	27,6	18,6	26,2	14,9	26,1
Queijo	Z 78	45,7	44,8	48,5	41,9	35,1	23,3	31,1	17,2	0
Queijo	Z 34	40,4	39	42,7	36	29	17	26,1	14,3	26
Queijo	Z 86b	28,9	31,1	33,5	32,3	26,9	22,4	28	20,4	22,6
Queijo	Z 37	38,4	37	40,8	34	29,2	18,8	27,6	14,9	25,6
Queijo	Z 45	34	32,1	36,4	32,3	26,2	15,6	25,1	13,3	25,2
Queijo	Z 188	41,2	40,3	44,6	37	31,2	17,9	28,1	13,7	27,5
Queijo	Z 191	38,5	36,9	40,7	35,3	29,7	19,1	27,8	15,2	27
Queijo	Z 192	37,3	36,3	38	34,2	27,7	16,2	26,5	12	23,3
Queijo	Z 205 ^a	37	34,9	37,6	32,7	26,6	16,5	26,8	14,3	25,5
Queijo	Z 13"	40,1	36,9	41,2	36,6	28,5	15,6	27,3	12,6	26
Queijo	Z 31"	38,3	37,2	39,9	36,3	27,9	16,1	27,2	14,2	25,4
Queijo	Z 201	37,9	34,8	41,1	34,4	30,2	18,5	28,9	14,3	25,8
Queijo	Z 228	41,2	39,6	42,3	37	29	16,5	28,7	14	25,3
Queijo	Z 273	41,3	40,1	42,8	38,2	29,8	16,6	27,5	14,6	27,2
Queijo	Z 277	39,6	38,4	42,1	36,8	29,3	16,8	27,3	14,6	25,9
Queijo	Z 317	33,9	36	41,2	30,5	27	26,6	23,7	18,4	26,9
Queijo	Z 334	38,4	37,6	39,9	35,9	28	15,7	27,1	13,5	24,9
Leite	S 92	38	36,2	39,8	35,7	26,8	18,2	27,4	14,4	22,4
Queijo	S 95	35,8	33,5	35,6	34,5	28,3	17,8	27,1	14,8	25,6
Queijo	S 96	40,4	37	42,4	35,1	27,7	18,9	28,6	14,5	26,2
Queijo	S 101	39,3	39	41,8	35,4	32,1	21,8	28,3	16,8	26,7

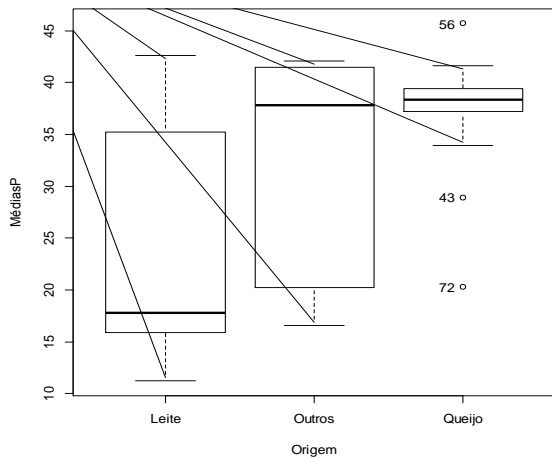
Origem	Isolado	P	AMP	AML	KZ	ENR	N	E	S	SXT
Queijo	S 106	37,9	37,3	38,8	35,1	27,5	18,5	27,1	14,3	26,8
Queijo	S 113	41,7	40,3	43,5	38	32,3	22	25,5	17,8	27,5
Queijo	S 119	37,6	36,6	39,7	35,7	28,3	19,7	26,1	15,5	26,4
Queijo	S 129	37,3	38,9	42,5	34,7	26,8	18,1	27,2	13,6	25,3
Queijo	S 130	37,3	37,6	39,9	34,7	26,1	18,6	27,1	14,5	26,1
Queijo	S 131	39,2	36,7	40,7	34,9	27,7	18,9	26,6	14,4	26,6
Queijo	S 46	39,5	37,7	41,1	35,6	27,9	19,1	27,6	14,5	25,4
Queijo	S 50	38,7	42	40,7	34,1	27,1	18,7	27,1	14,5	24,4
Queijo	S 54	38,7	37,6	40,9	35,6	27,2	18,6	25	13,7	25,9
Queijo	S 56	39	37,1	40,4	38,3	27,5	18,9	27,5	13,9	27,5
Queijo	S 61	39,2	39,2	40,7	34,8	27,1	18,4	26,8	14	24,7
Queijo	S 65	40,9	37	39,4	35,7	26,2	18,3	26,5	14	25,9
Queijo	S 68	38,1	37,3	40,6	37,3	31,6	21,2	27,6	16,8	25,9
Queijo	S 3	38,4	36,5	39,7	34,9	27,5	18,9	27,1	14,5	25,3
Queijo	S 8	38,7	35,7	41,1	34,9	27,4	18,7	27,2	14,6	25
Queijo	S 13	39,9	36,7	39,5	33,6	28,3	18,8	27,9	14,1	26
Queijo	S 22	39,1	37,3	42,3	34,7	26,4	18,7	27,2	14,9	24,9
Queijo	S 30	39,4	35,8	41,3	34,7	27,2	18,4	27,2	14,1	25,3
Queijo	S 197 ^a	36,5	36	39,4	35,2	30,2	18,2	26,6	13,6	25,2
Queijo	S 181	40,2	38,1	42,1	36,1	28,7	19,1	27,8	14,5	26,6
Queijo	S 216	20,3	27,3	33,2	13,8	20,6	9,8	18,8	0	0
Queijo	S 219	38,1	37,6	41,9	35,8	32,7	21,9	32,6	17,1	26,5
Queijo	S 221	36,8	36,3	38,8	33,1	28,4	18,7	0	14	26,2
Queijo	S 223	36,1	34,4	37,8	31,8	28,5	19	0	14,3	27,4
Queijo	S 225	37,4	33,1	38,9	34,1	30,3	18,4	26,6	14,1	25,6
Queijo	S 157	39,3	37,9	41,6	35,4	26,8	18,2	27,5	12,5	24,9

Origem	Isolado	P	AMP	AML	KZ	ENR	N	E	S	SXT
Queijo	S 178	37,1	37,3	38,5	35,7	28,4	18,9	26,7	14,7	26,9
Queijo	S 164	36,7	36,7	39,3	35,4	27,9	19,3	26	15	27,3
Queijo	S 167	37	33,6	37,4	33,2	27,5	18,6	0	14	0
Queijo	S 173	39,3	38,1	40,3	35,8	28,1	20,1	27,5	14,9	27,8
Queijo	S 246	39,7	37,1	41,6	34,6	26,1	17,8	27,2	13,2	22,6
Queijo	S 247	37,1	38,1	37,6	35,2	27,4	18,8	25,7	15,1	26
Queijo	S 253	38,4	39	40,6	34,9	28,5	18,9	27,4	14,9	25,2
Queijo	S 262	40,1	38,6	40,5	35,1	28,5	19,2	28,3	15,5	26
Queijo	S 367	39,2	36,9	39,2	35,2	27,1	18,3	26,3	14,5	25,5
Leite de vaca cru	L 2	17,8	19,6	22,9	34,6	31,9	18,8	31,4	15,4	27,3
Leite de vaca cru	L 4	19,2	20,4	24,2	28,9	32,7	19,2	29,8	14,9	28
Leite de vaca cru	L 12	17,8	16,7	23	34,1	30,7	18,4	30,7	15,4	27,1
Leite de vaca cru	L 13	14,9	15,6	18,9	31,5	29,7	16,3	26,7	15,4	28,6
Leite de vaca cru	L 14	15,2	16,9	19,5	31,2	28,1	16,3	27	14,4	23,4
Leite de vaca cru	L 15	16,2	17,7	20,4	30,1	28,9	18,2	29,6	15,2	25
Leite de vaca cru	L 16	18,7	18,9	22,1	33,3	30,3	18,3	28	15,9	25,5
Leite de vaca cru	L 17	15,9	18,3	21	33,1	30,6	16,3	27,9	12,9	26
Leite de ovelha cru	L 29	11,2	12,9	17,5	24,8	27	15,6	24,4	12,3	25,5
Leite de ovelha cru	L 31	35,2	31,3	34,1	31,8	29,9	15,4	25,7	10,9	24,5
Leite de cabra cru	L 35	40,5	38,1	42,3	38,1	30,6	18,7	27,2	14,8	26,8
Leite de cabra cru	L 36	42,6	39,7	43,7	38,6	31,2	18,5	27,6	15	26,7
Jesuíta	O 33 ^a	41,7	39,5	43,1	37,6	30,2	17,6	27,3	14,3	26,6
Jesuíta	O 33 ^b	41,5	39,7	43,7	38,7	29,8	18,3	27,5	14,8	26,1
Jesuíta	O 34	42,1	39,6	43,5	38,6	30,4	18,1	27,3	15,1	26,4
C.Portug.	O 20	16,6	18,4	19,9	30,3	27	18,2	25,5	14,3	29,7
C.Portug.	O 32	37,6	36,9	37,4	32,5	31	17,2	27,4	13,3	25,9
S.atum	O 6 ^a	20,2	20,7	24,9	29,9	34,2	19,8	30,8	15	28,8

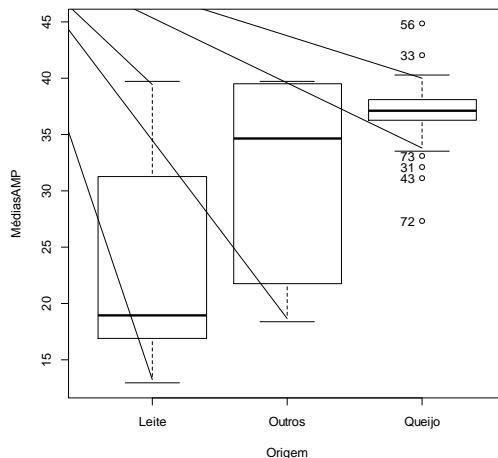
Origem	Isolado	P	AMP	AML	KZ	ENR	N	E	S	SXT
S.atum	O 7b	20,2	21,7	25,15	30,1	32,4	19,8	31,55	14,9	27
Salmoura	O 25 ^a	40	38,2	41,5	37,2	29,3	18	27,6	14,4	26,2
Salmoura	O 26	35,1	25,8	29,8	34,1	27,6	18,1	0	10,5	28,5
Salmoura	O 28	38	32,4	36,8	29,7	29,5	16,3	26,1	12,4	23,2

P - Penicilina G 10IU; AMP - Ampicilina 10 µg; AML - Amoxicilina 10 µg; KZ - Cefazolina 30 µg; ENR - Enrofloxacin 5 µg; N - Neomicina 30 µg; E - Eritromicina 15 µg; S - Estreptomicina 10 µg e SXT - Sulfametoxazol/Trimetoprim 25 µg.

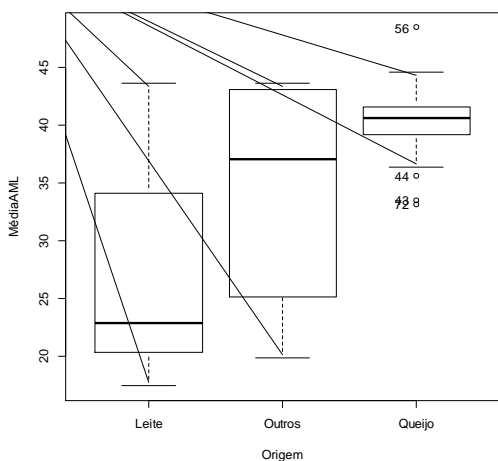
Anexo X-Boxplots obtidos através das médias dos halos da zona de inibição (em mm) de cada antibiótico testado.



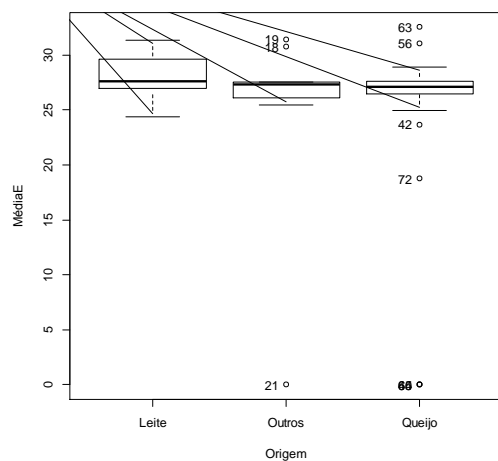
Penicilina



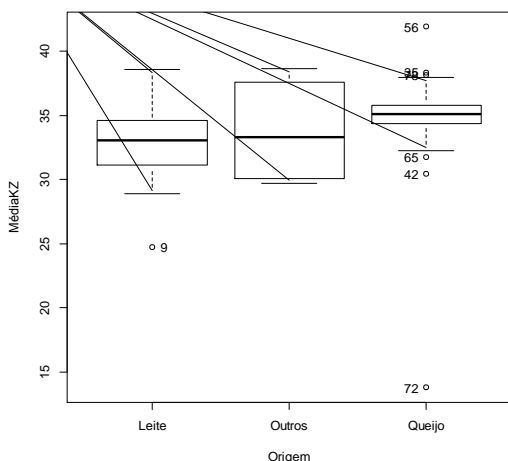
Ampicilina



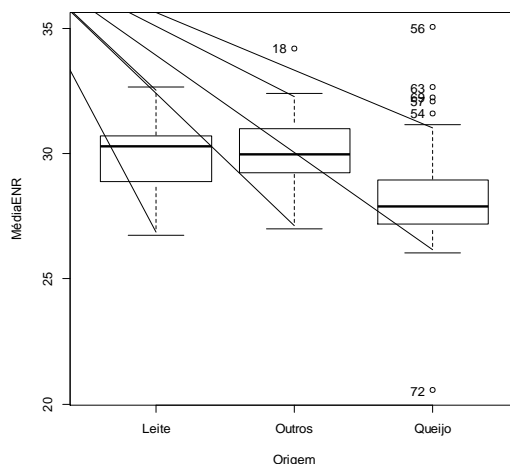
Amoxicilina



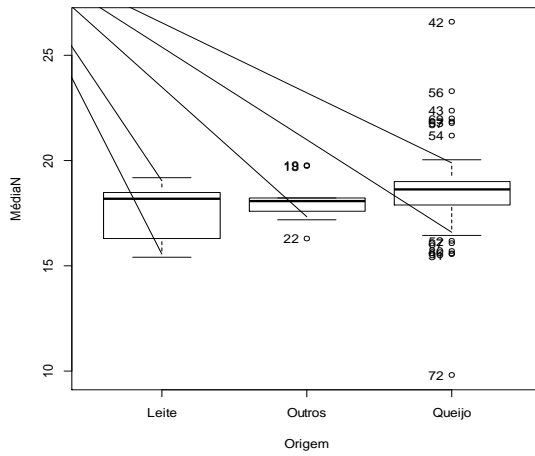
Eritromicina



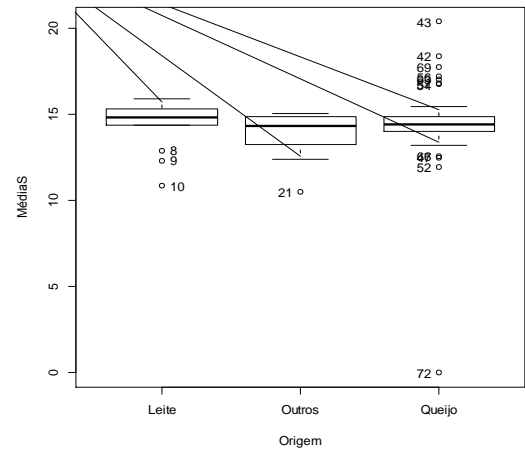
Cefazolina



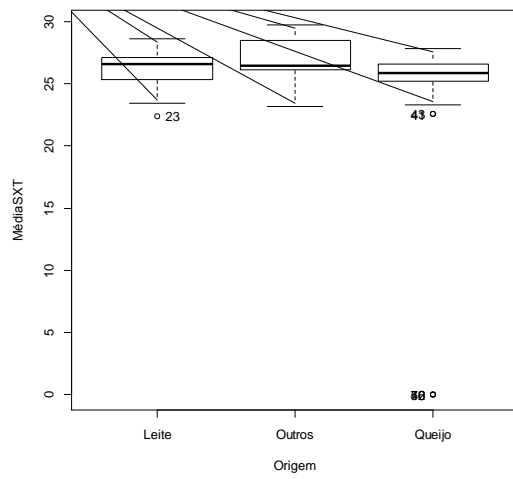
Enrofloxacina



Neomicina



Estreptomicina



Sulfametoxazol/Trimetoprim