

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE VIRULÊNCIA DE ESTAFILOCOCOS COAGULASE-NEGATIVOS ISOLADOS DE ALIMENTOS PROTEICOS EM SÃO LUÍS-MA

EVALUATION OF THE VIRULENCE PROFILE OF COAGULASE-NEGATIVE STAPHYLOCOCCUS ISOLATED FROM PROTEIN FOODS IN SÃO LUÍS-MA

DOI: <https://doi.org/10.16891/2317-434X.v12.e1.a2024.pp3336-3346> Recebido em: 22.03.2023 | Aceito em: 25.06.2023

Gabrielle Damasceno Costa dos Santos^a, Vivian Serra de Menezes^a, Vitória Serra de Menezes^a, Klenda Mirelly Lima Nascimento^a, Luís Cláudio Nascimento da Silva^a, Adrielle Zagnignan^a,

Universidade Ceuma^a

***E-mail: gabrielledamasceno.nutri@gmail.com**

RESUMO

A presença de patógenos transmitidos por alimentos representa uma grande ameaça à saúde pública. Estafilococos coagulase-negativos (ECN) têm emergido como patógenos alimentares importantes, devido ao elevado número de isolados com características virulentas e resistentes aos antibióticos. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil de virulência de ECN em alimentos de origem animal em São Luís-MA. O estudo foi realizado em julho-setembro de 2019. Foram utilizadas 8 amostras isoladas de alimentos proteicos (carne de porco, caranguejo, camarão, peixe e carne bovina). Inicialmente, foi realizado o ensaio hemolítico e da fosfolipase. Foi analisada a capacidade dos isolados produzirem biofilme em placas de poliestireno. E posteriormente, a resistência das bactérias foi testada mediante o hipoclorito de sódio, analisando também, a sua eficácia. De acordo com os dados obtidos no presente estudo, ECN, apresentaram um perfil de virulência que pode ocasionar riscos a população. Exibiram a produção de fosfolipase e atividade hemolítica. Além disso, formaram biofilme (fracos e moderados) e resistiram a utilização do hipoclorito de sódio na maioria das amostras testadas. Ainda, as larvas de *T. molitor* apresentaram alta taxa de mortalidade. Esses dados destacam a importância do controle e prevenção da contaminação de alimentos por estes patógenos, cabendo ressaltar a necessidade de incluir ECN nas investigações de surtos alimentares.

Palavras-chave: Doenças Transmitidas por Alimentos; Estafilococos Coagulase Negativa; Virulência.

ABSTRACT

The presence of foodborne pathogens represents a major threat to public health. Coagulase-negative staphylococci (CNS) have emerged as important food pathogens due to the high number of isolates with virulent characteristics and resistant to antibiotics. In this context, this study aimed to evaluate the virulence profile of ECN in foods of animal origin in São Luís-MA. The study was carried out in July-September 2019. Eight isolated samples of protein foods (pork, crab, shrimp, fish and beef) were used. Initially, the hemolytic and phospholipase assay was performed. The capacity of the isolates to produce biofilm on polystyrene plates was analyzed. And later, the resistance of the bacteria was tested using sodium hypochlorite, also analyzing its effectiveness. According to the data obtained in the present study, ECN presented a virulence profile that could pose risks to the population. They exhibited phospholipase production and hemolytic activity. Furthermore, they formed biofilm (weak and moderate) and resisted the use of sodium hypochlorite in most of the samples tested. Furthermore, *T. molitor* larvae had a high mortality rate. These data highlight the importance of controlling and preventing food contamination by these pathogens, emphasizing the need to include NEC in food outbreak investigations.

Keywords: Foodborne Diseases; Coagulase Negative Staphylococcus; Virulence.

INTRODUÇÃO

A presença de patógenos transmitidos por alimentos (como *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus spp.* e *Listeria monocytogenes*) em diferentes produtos, representa uma grande ameaça à saúde pública (OSMAN et al., 2017). Dados divulgados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) entre os anos de 2009-2018 relatam 6.809 surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no país (BRASIL, 2019).

Staphylococcus aureus é um dos patógenos alimentares mais comuns em surtos de intoxicação alimentar em todo o mundo (SILVA et al., 2017). Linhagens desta bactéria produzem toxinas denominadas de *enterotoxinas estafilocócicas*, que quando ingeridas podem provocar quadros de diarreia e vômito (NASCIMENTO, 2017). Além de *S. aureus*, outras espécies deste gênero conhecidas como estafilococos coagulase-negativos (ECN) têm emergido como importantes agentes de DTA (MAZZARIOL et al., 2012).

A definição do heterogêneo grupo ECN é tradicionalmente baseada em procedimentos diagnósticos que preenchem a necessidade clínica de diferenciação entre *S. aureus* e outros estafilococos (classificados historicamente como sendo menos ou não-patogênicos) (SCHLEIFER; BELL, 2009; WANG et al., 2017). ECN são encontrados na microbiota da pele, nas membranas das mucosas de humanos e animais, e em alimentos (principalmente em produtos cárneos, leite, queijos e outros produtos lácteos (ARSLAN et al., 2017; RODRIGUES et al., 2016).

As bactérias do grupo ECN consideradas com maior relevância clínica são *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus* e *S. lugdunensis* (NATSIS; COHEN, 2018). Notadamente, estes patógenos possuem menos propriedades de virulência do que *S. aureus*, estando envolvidos em um espectro de doenças diferentes (BECKER; HEILMANN; PETERS, 2014). No entanto, a incidência de ECN pode tornar os alimentos inseguros, uma vez que os isolados clínicos têm revelado características altamente virulentas. Desta forma, medidas de segurança devem ser tomadas para reduzir ou eliminar sua ocorrência em alimentos (FOWOYO; OGUNBANWO, 2016).

Terapeuticamente, os ECN são desafiadores devido à grande proporção de cepas resistentes à meticilina e ao aumento do número de isolados com menor suscetibilidade aos glicopeptídeos (SABER et al., 2017).

De fato, o risco de contaminação por ECN tem sido destacado devido aos diversos relatos recentes de intoxicação alimentar (NATSIS; COHEN, 2018).

Em adição, espécies de ECN foram citadas como vetores de transporte para genes de virulência e de resistência a antibióticos (ARTINI et al., 2015). Como as linhagens portadoras do gene *mecA*, que funcionam como reservatórios deste fator de virulência, podendo ser transmitido para outras cepas, incluindo *S. aureus* (BHARGAVA; ZHANG, 2014; CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA et al., 2015; TULINSKI et al., 2012).

Assim, a presença de ECN pode não ser um perigo imediato para a saúde pública, mas pode se tornar um fator de risco (NATSIS; COHEN, 2018). Além disso, os ECN são conhecidos por serem produtores fortes de biofilme e isso também é um fator de risco para a saúde pública (ARTINI et al., 2015).

Diante do exposto, embora esteja comprovada a relação doença e ingestão de alimentos contaminados por ECN, este trabalho se mostra importante pela escassez de estudos locais que investiguem o patógeno em alimentos. Assim, este estudo tem como objetivo isolar e avaliar o perfil de virulência de estafilococos coagulase negativa isolados de alimentos de origem animal em São Luís-Maranhão.

METODOLOGIA

Tipo de estudo e origem das amostras

Trata-se de uma pesquisa de caráter analítico, experimental, desenvolvido no Laboratório de Patogenicidade da Universidade Ceuma, no período de julho a setembro de 2019. Foram utilizadas 8 amostras de ECN isoladas de alimentos de origem proteica proveniente de carne de porco, caranguejo, camarão, peixe e carne bovina, de mercados e feiras livres da cidade de São Luís, Maranhão, cedidas do Laboratório de Patogenicidade da Universidade Ceuma. Por essa razão, a amostra foi caracterizada como não probabilística. As amostras de ECN foram divididas em dois grupos, sendo o primeiro grupo carnes e o segundo pescados. As bactérias do grupo dos pescados foram identificadas como: p1 (caranguejo), p2 (caranguejo), p3 (camarão) e p4 (peixe) e as do grupo das carnes: C1 (carne bovina), C2 (carne bovina), C3 (carne bovina) e C4 (carne de porco).

Ensaio hemolítico

Os eritrócitos (sangue de carneiro), foram

isolados por centrifugação. Após a remoção do plasma, foram lavados três vezes com PBS, suspensos em caldo BHI. Alíquotas de 20 μ L de cada amostra ECN foram adicionadas a 180 μ L de caldo BHI suplementado com eritrócitos (2%), transferidos para uma placa de 96 poços, incubados por 24h a 37°C. Após 24h, a placa foi centrifugada e o sobrenadante tomado para atividade hemolítica. Os resultados foram expressos como porcentagem (%) em relação à atividade hemolítica de cada cepa bacteriana incubada. Como controle positivo foi utilizado *S.aureus* ATCC 6538 e como controle negativo PBS (FERRO *et al.*, 2016).

Ensaio de fosfolipase

Para a determinação da atividade enzimática da fosfolipase foi utilizado o método ágar gema de ovo em placa, com algumas modificações (PRICE *et al.*, 1982) Para a realização do experimento foi preparado Nutrient Broth misturado com 20 gramas de gema de ovo, atingindo o total de 200 mL. Em seguida, as amostras de ECN foram adicionadas nas respectivas placas com o auxílio de uma pipeta contendo 3 μ L de cada bactéria, *S. aureus* ATCC 6538 foi utilizada como controle positivo.

Formação de biofilme

Foram adicionados 200 μ L das suspensões bacterianas de ECN, em placas de poliestireno, em quadruplicada, sendo utilizado como controle negativo o caldo BHI e, como controle positivo, a cepa *S. aureus* ATCC 6538. As placas foram então incubadas a 37 °C durante 24 horas. Após este período, as suspensões bacterianas foram removidas, e os processos seguintes realizados conforme metodologia já estabelecida. Os isolados foram classificados, considerando o ponto de corte da Densidade Óptica (DOc), em três desvios padrões acima da média das DOs dos controles, nas categorias: $DO \leq DOc$ = não formadora; $DOc < DO \leq 2x DOc$ = fraca formadora; $2x DOc < DO \leq 4x DOc$ = Moderada Formadora e $4x DOc < DO$ = forte formadora (STEPANOVIC *et al.*, 2000).

Perfil de sobrevivência in vivo em larvas de *Tenebrio molitor*

Larvas *Tenebrio molitor* de aproximadamente 100 mg foram randomizadas em grupos de no mínimo 10 indivíduos. Foram injetados 10 μ L da suspensão microbiana em concentrações de 0.3 e 0.5 a 630 nm, próximo a calda das larvas. Larvas inoculadas com tampão fosfato salina (PBS) foram utilizadas como controle negativo e larvas inoculadas com *S. aureus* ATCC 6538 como controle positivo. A viabilidade foi avaliada diariamente pela ausência de movimento (ARMITAGE E SILVA, 2005).

Efeito após utilização do hipoclorito de sódio

A eficácia dos sanitizantes hipoclorito de sódio, solução de 100 partes por milhão (ppm) frente aos ECN foram avaliados utilizando o método descrito por Milan *et al.*, (2015). Placas de petri com formação de biofilme de ECN foram imersas em frascos contendo sanitizantes, onde permaneceram durante 10 minutos. Alcançado o tempo de contato estabelecido, as placas foram imersas em solução neutralizante por 30 segundos. Após lavagem com PBS, amostras foram plaqueadas em Ágar Mueller Hilton através da utilização de um *swab* estéril. O teste foi feito em triplicata.

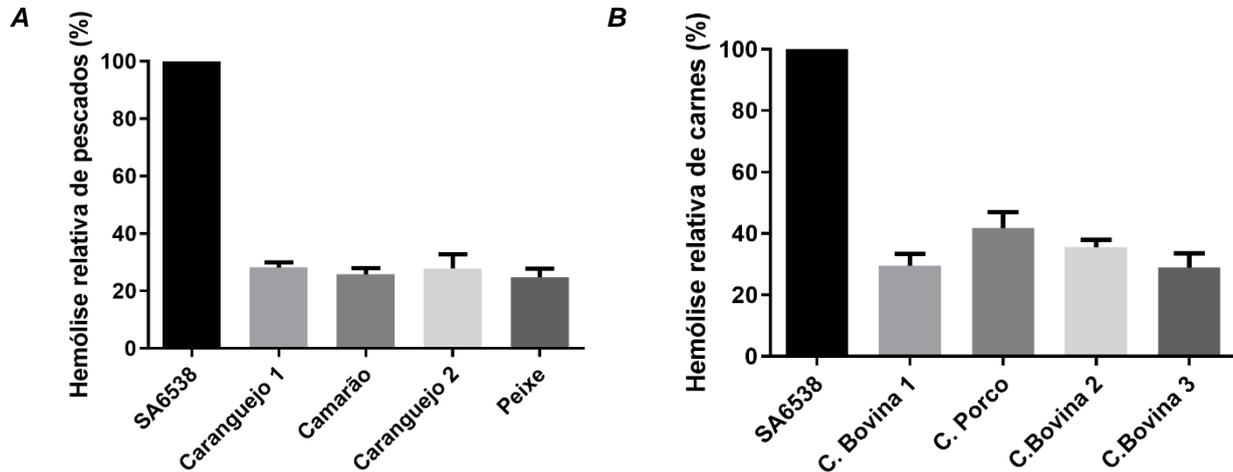
Análise dos resultados

Os dados foram avaliados por meio dos gráficos e tabelas feitos pelo programa Excel e pelo software, *GraphPad Prism versão 6.0*.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

No teste de hemólise foi possível observar que entre as bactérias testadas, 100% das amostras de estafilococos coagulase negativa apresentaram atividade hemolítica. Contudo, o isolado C4 (carne de porco) apresentou maior atividade hemolítica (41,7%), em comparação aos outros isolados, seguido por C2 (carne bovina) com 35,6% de hemólise.

Figura 1. Atividade hemolítica de ECN de isolados de pescados e carnes de feiras livres em São Luís – MA. (A) ECN isolados de pescados; (B) ECN isolados de carnes.



Legenda: SA6538 (*S. aureus* ATCC 6538), C.Boniva1,2,3 (Carne Bovina), C.Porco (Carne Porco).

As toxinas hemolíticas causam lise em eritrócitos. O papel proposto para as hemolisinas bacterianas é a liberação do grupo heme presente na hemoglobina e mioglobina dos eritrócitos. As toxinas alfas, beta, delta e gama tem efeito citotóxico frente a várias células do hospedeiro (PINHEIRO et al., 2015). O fator de virulência toxina α hemolítica (Hla), toxina β hemolítica (Hlb) e toxina γ hemolítica (Hlg) estão presentes em *S. aureus*. Toxinas como delta toxina (Hld), são produzidas por 50 a 70% dos estafilococos coagulase negativos. Estas toxinas atuam como agentes surfactantes, destruindo a membrana celular (PINHEIRO et al., 2015; ACOSTA, et al., 2017).

Assim, esses fatores de virulência podem causar, destruição de leucócitos, intoxicação gastrointestinal e auxiliar na evasão de células fagocitárias, na adesão às células epiteliais e na colonização dos tecidos do

hospedeiro, carreando perigo potencial à saúde da população (PINHEIRO et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2018).

Alguns estudos relatam a atividade hemolítica de estafilococos coagulase negativa, como no estudo de isolados derivados de leite e queijos. Dos 77 isolados de ECN, 22% demonstraram atividade hemolítica do tipo (b-hemolise) elevada (RUARO et al., 2013).

Ensaio de fosfolipase

No ensaio de fosfolipase, das 8 amostras testadas, 7 foram classificadas como positivas. A bactéria não produtora de fosfolipase foi a P2 (caranguejo), pertencente ao grupo dos pescados. Assim, 87% dos isolados foram produtores de fosfolipase.

Tabela 1. Produção da enzima fosfolipase por ECN isolados de pescados e carnes de feiras livres em São Luís – MA.

Isolados	Ação fosfolipase (+)	Ação fosfolipase (-)
Carne Bovina	+	
Porco	+	
Caranguejo	+	
Camarão	+	
Peixe	+	
Caranguejo		-
<i>S.aureus</i> ATCC 6538	+	

Um dos fatores de virulência relacionados aos ECN é a produção de enzimas. As fosfolipases pertencem a uma família de enzimas que tem como principal objetivo degradar diversos tipos de substratos fisiologicamente importantes, tais como componentes celulares das mucosas. Ao invadir os tecidos, a fosfolipase pode prejudicar a estabilidade das membranas epiteliais do hospedeiro. Isso ocorre devido a clivagem dos fosfolipídios, que causam a lise celular (ANDREOLA et al., 2016).

Outros estudos relatam produção de enzimas por ECN, como o estudo realizado no Paraguai com amostras clínicas de pacientes hospitalizados que identificou isolados e sua virulência. Em seus resultados observou que a produção de lipase foi de 53,8% para *S. epidermidis*,

61,5% para *S. haemolyticus* e 60% para *S. lugdunenses*. Uma produção importante de lipase em todas as espécies (NORMA FARINÁ, 2013).

Formação de biofilme

Com relação a capacidade da formação de biofilme em placas de poliestireno, os isolados mostraram-se fracos e moderados formadores de biofilme. Destes, 5 (62,5%) foram classificados como fracos formadores, 3 (37,5%) como moderados. Todos os isolados de carne bovina e de porco, obtiveram fraca formação de biofilme. Enquanto os isolados do caranguejo, obtiveram 50% da capacidade de formar fraca e moderada aderência, respectivamente

Amostras	Nº de cepas testadas	Nº de cepas apresentadas			
		Não aderentes (0)	Fraca Aderência (+)	Moderada aderência (++)	Forte Aderência (+++)
Carne bovina	3	-	3	-	-
Carne suína	1	-	1	-	-
Caranguejo	2	-	1	1	-
Peixe	1	-	-	1	-
Camarão	1	-	-	1	-
TOTAL	8 (100%)	0	5	3	0

Tabela 2. Isolados formadores de biofilme de isolados de pescados e carnes de feiras livres em São Luís – MA.

Os estafilococos têm a capacidade de adesão às proteínas da matriz extracelular como fibrinogênio, fibronectina e colágeno (GHASEMIAN et al., 2015). O biofilme é designado como o crescimento bacteriano em superfícies, constituindo um conjunto de pequenos isolados bacterianos de fenótipos diferentes que ficam aderidas umas às outras, envolvidas por uma matriz extracelular que se fixam em superfícies bióticas e abióticas (LIU et al., 2018).

O gene *bap* (biofilm-associated protein) já foi identificado em diversas espécies de ECN, incluindo *S. epidermidis*, *S. chromogenes*, *S. simulans* e *S. hyicus*. Além disso, o fator que gera a fixação do biofilme é chamado de adesina intercelular polissacarídica (PIA), sintetizada no operon do gene *ica* (SENG et al., 2017; ARTINI et al., 2015).

Estes biofilmes são caracterizados como grande fator contaminante justamente pelo fato de se aderirem muito facilmente a uma superfície ou em alimentos, o que faz dele um grande transmissor de patógenos de origem alimentar (PUAH et al., 2018). Confere a bactéria

resistência a modificações ambientais, a antibióticos, e se tornam menos suscetíveis às defesas imunológicas do hospedeiro. Por este motivo, é mais difícil a sua erradicação (BATISTAO et al., 2016; ÔCAL et al., 2017).

A incidência de estafilococos coagulase-negativos (ECN) pode tornar os alimentos inseguros, uma vez que os isolados clínicos têm revelado características virulentas (FOWOYO; OGUNBANWO, 2016). Apesar de no presente estudo as amostras se apresentarem fracas formadoras, houve aderência, como nas carnes bovinas. Dados de isolamento de ECN foram encontrados no estudo de Soares et al (2015), no qual 57% e 50% das linhagens possuíam múltiplos genes de enterotoxinas. No salame comercial foram encontrados (*S. saprophyticus*, *S. sciuri*, *S. xylosus* e *S. carnosus*) e no salame artesanal (*S. succinus*, *S. epidermidis* e *S. hominis*).

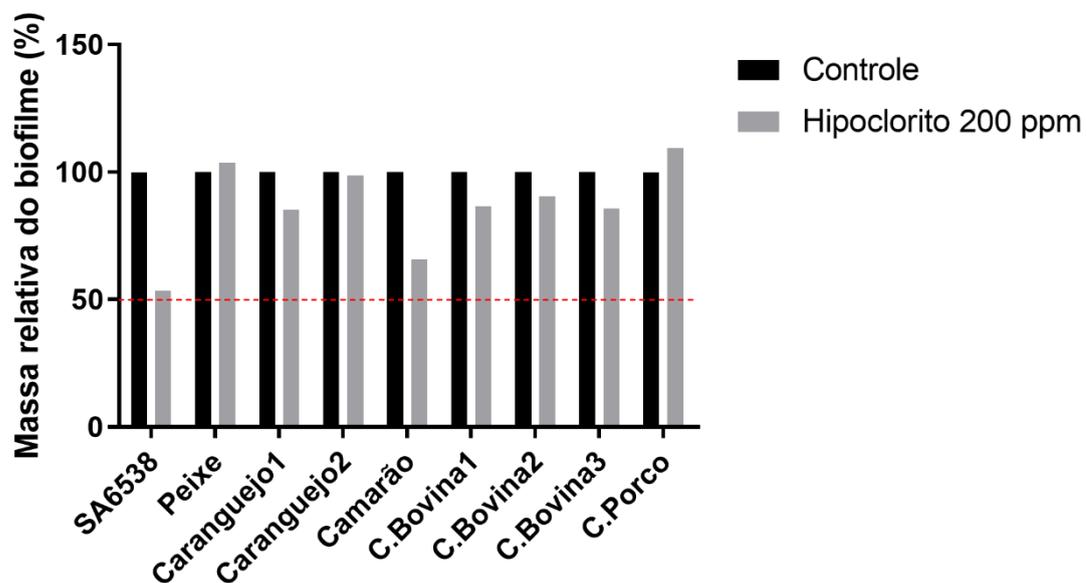
Os isolados provenientes de caranguejo, embora tenham sido classificados como fracos formadores, obtiveram aderência, fato que pode ser justificado pela alta manipulação nesses alimentos, com elevado fator contaminante (PINHEIRO, 2017). Existem também

outros fatores que podem vir a contribuir para a contaminação destes alimentos, como a temperatura, ph, a atividade de água, e ainda, as condições higiênico-sanitárias dos manipuladores (SILVA JÚNIOR, 2013).

Efeito após utilização do hipoclorito de sódio

Do total de isolados (8) que foram submetidos ao teste de resistência ao sanitizante, os únicos que não se mostraram resistentes foram os isolados de camarão e o S.A (*S. aureus* ATCC 6538, controle positivo). Todos os outros isolados resistiram a utilização do sanitizante.

Figura 2. Avaliação da resistência dos isolados (carne, peixe, porco, caranguejo, camarão) a sanitizantes em São Luís – MA.



O teste de avaliação da resistência aos sanitizantes tem como principal objetivo avaliar a resistência da bactéria mediante um agente sanitizante, testando também, a sua eficácia. Existem vários tipos de sanitizantes que são utilizados para higienização de alimentos, utensílios e equipamentos.

ECN foram resistentes aos sanitizantes, fato este que demonstra a possível capacidade de resistência deste patógeno. Os alimentos podem ser considerados uma fonte importante de transmissão de bactérias resistentes a antibióticos e essa resistência dificulta o tratamento de infecções decorrentes dessas bactérias (WANG et al., 2017).

Mundialmente há uma preocupação em relação a disseminação de alimentos contaminados com microrganismos que são capazes de perpetuar a resistência a antimicrobianos, o que levou a Comissão do Codex Alimentarius, em 2007, a uma avaliação do risco dos antimicrobianos na prática clínica (OSMAN, 2016). Essas bactérias resistentes são encontradas em hospitais e na comunidade, ocasionando alta taxa de mortalidade e

morbidade (SENG et al., 2017).

A detecção de isolados de *Staphylococcus* spp. resistentes a antibióticos, é importante do ponto de vista do monitoramento e prevenção da propagação de resistência antimicrobiana (SENG et al., 2017; OSMAN et al., 2016). Os elementos de resistência são transferidos através de mecanismos da própria bactéria por aquisições horizontais, como transdução, transformação e conjugação (YU et al., 2017).

Estudos relatam que animais contaminados com ECN podem servir de reservatório para infectar humanos através da ingestão de alimentos (TULINSKI et al., 2012; PARK et al., 2013). É demonstrado também a capacidade dos ECN na disseminação dos genes de resistência a antibióticos para outras bactérias, ocasionalmente patogênicas, constituindo um fator de risco à saúde pública (YU et al., 2017).

Há hipóteses de que o MRSA (*S. aureus* Resistente à Meticilina) tenha surgido dos ECN. Essa proposição foi reforçada quando foi encontrado um homólogo do gene *mecA* em *S. fleurettii*, com cerca de

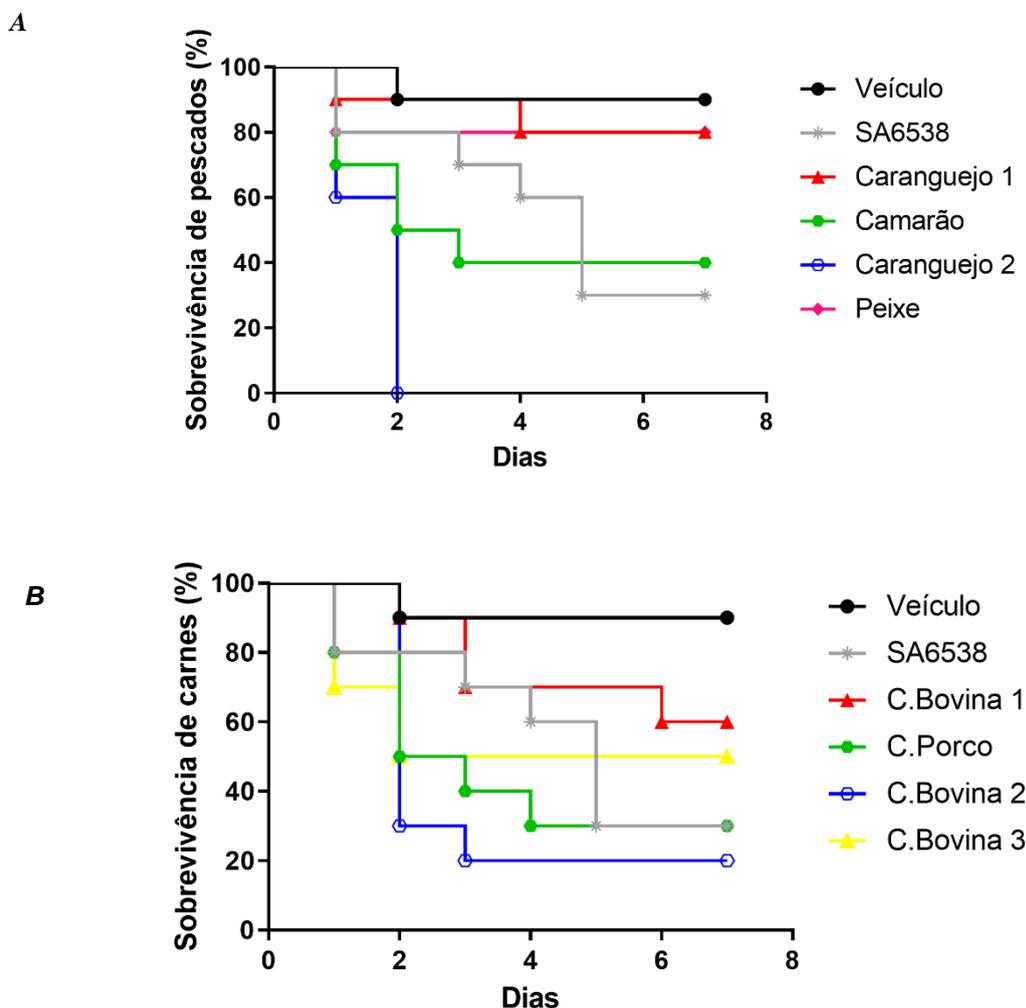
99% de homologia com o *mecA* de MRSA N315. (TSUBAKISHITA et al., 2010; TULINSKI et al., 2012). Ainda, existem mais relatos da prevalência de resistência à meticilina em ECN do que em *S. aureus* (ÜNAL et al., 2012).

Perfil de sobrevivência *in vivo* em larvas de *T. molitor*

No teste de sobrevivência *in vivo* com larvas de *T. molitor*, os isolados bacterianos provenientes de pescados

que apresentaram maior índice de virulência, foram os obtidos de caranguejo (todas as larvas infectadas morreram), seguido por aqueles isolados de camarão (com índice de sobrevivência de 40%) (Figura 3A). Dentre os isolados bacterianos provenientes das carnes, foi possível observar maiores índices de virulência nas amostras de Carne bovina, com sobrevivência de 20%, seguido da amostra Carne suína. O grupo infectado com *S. aureus* ATCC 6538 apresentou 30% de sobrevivência (Figura 3B).

Figura 3. Avaliação do perfil de sobrevivência das larvas de *T. molitor* infectadas com ECN isoladas de pescados (A) e ECN isolados de carnes (B) de feiras livres em São Luís - MA.



Legenda: SA6538 (*S. aureus* ATCC 6538), C.Boniva1,2,3 (Carne Bovina), C.Porco (Carne Porco).

Durante muitos anos, ECN eram considerados espécies de microrganismos inofensivos. Os estudos tratam de publicações predominantemente para *S. aureus*,

por ser um dos principais microrganismos causadores de infecções graves e surtos alimentares (LEE et al., 2018).

Atualmente, estafilococos coagulase negativos

vêm sendo associados a infecções graves e intoxicações alimentares, provenientes da produção de enterotoxinas por certas cepas pertencentes a seguintes espécies: *S. capitis*, *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* (OSMAN et al., 2017; FARIÑA et al., 2013).

Em um estudo recente 37,5% dos isolados apresentaram produção de beta-lactamases e 40% apresentaram resistência à metilicina (KARIGOUDAR et al., 2016; MEHRI et al., 2017).

Algumas espécies (*S. epidermidis*, *S. auricularis*, *S. haemolyticus*, *S. capitis*, *S. simulans* e *S. saprophyticus*) estão comumente relacionadas com infecções oftalmológicas como conjuntivite ou endoftalmite (TEWELDEMEDHIN et al., 2017; DEGUCHI et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018). Outras patologias pertinentes causadas por ECN estão presentes no sistema nervoso central e a peritonite em pacientes com diálise peritoneal contínua (BHATIA et al., 2017).

S. capitis, reside principalmente na microbiota do couro cabeludo e da face. Desde 1998 foi descrito em cistos, em foliculites, e em episódios de endocardite (NATSIS E COHEN, 2018). *S. saprophyticus* é encontrado em diversas áreas da pele humana, todavia tem facilidade de aderência no trato urinário, especialmente em mulheres. Nos estudos, a prevalência em infecções do trato urinário varia de 3% a 42%, dependendo de alguns fatores, como a idade do paciente (LO et al., 2015; PAILHORIÈS et al., 2017).

Já *S. haemolyticus* é encontrado em humanos e animais, tem infecções mais frequentes entre neonatos em unidades de terapia intensiva. Essa espécie pode ocasionar septicemia, peritonite e infecções do trato urinário, assim como, tem a capacidade de produzir biofilme (RUZAUSKAS et al., 2014; PINHEIRO et al., 2016).

Na literatura, dados semelhantes ao presente estudo são encontrados. Como no estudo que de 52 isolados de ECN, *S. epidermidis* (52%) foi a espécie mais comum, seguida por *S. saprophyticus* (18%) e *S. haemolyticus* (14%). Foi relatado a resistência à cefoxitina e ceftriaxona e a formação de biofilme em torno de 65,38% nos isolados (SHRESTHA, BHATTARAI, KHANAL, 2017).

Com isso, estudos buscando a identificação de ECN em alimentos proteicos como queijo, carnes, leite e alimentos prontos para o consumo estão ganhando destaque (OSMAM et al., 2017; WANG et al., 2017).

CONCLUSÃO

De acordo com os dados obtidos no presente estudo, foi verificado que os ECN isolados de diferentes proteínas, apresentaram um perfil de virulência que possivelmente pode ocasionar riscos a população. ECN analisadas exibem a produção de fosfolipase e atividade hemolítica. Além disso, foi observada a capacidade de formação de biofilme em superfície de poliestireno e resistência ao hipoclorito de sódio na maioria das amostras testadas. Ainda, no teste de sobrevivência em larvas de *T. molitor*, as bactérias obtiveram alta taxa de mortalidade.

Esses dados destacam a importância do controle e prevenção da contaminação de alimentos ocasionados por esses patógenos, cabendo ressaltar a necessidade de incluir estafilococos coagulase negativa nas investigações de surtos alimentares. Dessa forma, a adoção de medidas corretas na manipulação dos alimentos é essencial para prevenir a disseminação do ECN. Além disso, se faz necessário novos estudos, assim como a identificação de genes de resistência, adesão e formação de biofilme.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, A. C., et al. Fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*. *Medicina Veterinária (UFRPE)*, v. 11, n. 4, p. 252-269, 2018.
- ANDREOLA, P. et al. Estudo comparativo entre a produção de fosfolipases extracelulares e proteinases do gênero *Candida* isoladas a partir de infecções de cavidade oral. *Rev Odontol UNESP*, v. 45, n. 4, p. 219-226, 2016.
- ARMITAGE, S. A. O.; SIVA-JOTHY, M. T. Immune function responds to selection for cuticular colour in *Tenebrio molitor*. *Heredity*, v. 94, n. 6, p. 650-651, 2005.
- ARSLAN, S.; ÖZDEMIR, F. Molecular characterization and detection of enterotoxins, methicillin resistance genes and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* from fish and ground beef. *Polish journal of veterinary sciences*, 2017.
- ARTINI, Marco et al. Adhesive behaviour and virulence of coagulase negative staphylococci isolated from Italian cheeses. *International journal of immunopathology and pharmacology*, v. 28, n. 3, p. 341-350, 2015.
- BATISTAO, D., et al. Biofilm formation of Brazilian methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains:

prevalence of biofilm determinants and clonal profiles. *Journal of Medical Microbiology*, v. 65, n. 4, p. 286-297, 2016.

BECKER, Karsten; HEILMANN, Christine; PETERS, Georg. Coagulase-negative staphylococci. *Clinical microbiology reviews*, v. 27, n. 4, p. 870-926, 2014.

BHARGAVA, Kanika; ZHANG, Yifan. Characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRCoNS) in retail meat. *Food microbiology*, v. 42, p. 56-60, 2014.

BHATIA, P. L., et al. Coagulase-negative staphylococci: Emerging pathogen in central nervous system shunt infection. *Indian journal of medical microbiology*, v. 35, n. 1, p. 120, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. 2019. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta---o-Surtos-DTA---Fevereiro-2019.pdf>>. Acesso em: 25 junho. 2019.

CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, W., et al. Coagulase-negative staphylococci (CoNS) isolated from ready-to-eat food of animal origin—phenotypic and genotypic antibiotic resistance. *Food microbiology*, v.46, p.222-226, 2015.

DEGUCHI, H., et al. The trend of resistance to antibiotics for ocular infection of *Staphylococcus aureus*, coagulase-negative staphylococci and *Corynebacterium* compared with 10-years previous: A retrospective observational study. *PLoS one*, v. 13, n. 9, p. e0203705, 2018.

FARINÃ, N. et al. *Staphylococcus coagulase-negativa* clinicamente significativos. Espécies más frecuentes y factores de virulencia. *Chilena Infectol*, v. 30, n. 5, p.480-488, 2013.

FERRO, T. A. F. et al. Cinnamaldehyde inhibits *Staphylococcus aureus* virulence factors and protects against infection in a *Galleria mellonella* model. *Frontiers in microbiology*, v. 7, p. 1-10, 2016.

FOWOYO, P. T.; OGUNBANWO, S. T. Virulence and toxigenicity of coagulase-negative staphylococci in Nigerian traditional fermented foods. *Can J Microbiol*, v.62, n.7, p.572-8, 2016.

GHASEMIAN, A., et al. The Microbial Surface Components Recognizing Adhesive Matrix Molecules (MSCRAMMs) Genes among Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* from Hospitalized Children. *Iranian journal of pathology*, v. 10, n. 4, p. 258–264, 2015.

KARIGOUDAR, R., et al. Characterization and Antibiotic Susceptibility Pattern of Coagulase Negative Staphylococci with Special Reference to Methicillin Resistance. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 2016.

LEE, Andie S. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature reviews Disease primers*, v. 4, n. 1, p. 1-23, 2018.

LIU, Junyan., et al. Transcriptomics study on *Staphylococcus aureus* biofilm under low concentration of ampicillin. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, p. 2413, 2018.

LO, D. S., et al. High frequency of *Staphylococcus saprophyticus* urinary tract infections among female adolescents. *The Pediatric infectious disease journal*, v. 34, n. 9, p. 1023-1025, 2015.

MAZZARIOL, A., et al. Outbreak of linezolid-resistant *Staphylococcus haemolyticus* in an Italian intensive care unit. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 31, n. 4, p. 523-527, 2012.

MEHRI, H., et al. Investigation of glycopeptide susceptibility of coagulase- negative staphylococci (CoNS) from a tertiary care hospital in Gorgan, northern Iran. *Archives of Pediatric Infectious Diseases*, v. 5, n. 1, 2017.

NASCIMENTO, P. L.; MARTINEZ, J. O. Detection of *mecA* and *seh* genes from *Staphylococcus* sp. Isolated from samples of food, sufarces and utensils of na industrial Kitchen in Rio de Janeiro. *Demetra: Food, Nutrition e Health*, v. 12, n. 2, p.483-492, 2017.

NATISIS, Nicola E.; COHEN, Philip R. Coagulase-negative *Staphylococcus* skin and soft tissue infections. *American journal of clinical dermatology*, v. 19, n. 5, p. 671-677, 2018.

ÖCAL, D. N., et al. Investigation of biofilm formation properties of staphylococcus isolates. *Mikrobiyoloji bulteni*, v. 51, n. 1, p. 10-19, 2017.

OLIVEIRA, D., et al. *Staphylococcus aureus* Toxins and

Their Molecular Activity in Infectious Diseases. *Toxins*, v. 10, n. 6, p. 252, 2018.

OSMAN, K., et al. Antimicrobial resistance and virulence characterization of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from imported beef meat. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, v.16, n.1, p.35, 2017.

OSMAN, K., et al. Prevalence of the antibiotic resistance genes in coagulase- positive-and negative-*Staphylococcus* in Chicken meat retailed to consumers. *Frontiers in microbiology*, v. 7, p. 1846, 2016.

PAILHORIÈS, H., et al. *Staphylococcus saprophyticus*: Which beta-lactam?. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 65, p. 63-66, 2017.

PARK, Y. K., et al. Dissimilarity of *ccrAB* gene sequences between methicillin- resistant *Staphylococcus epidermidis* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among bovine isolates in Korea. *Journal of veterinary science*, v. 14, n. 3, p. 299–305, 2013

PINHEIRO, L., et al. *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*: molecular detection of cytotoxin and enterotoxin genes. *Toxins*, v. 7, n. 9, p. 3688-3699, 2015.

PINHEIRO, L., et al. *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*: detection of biofilm genes and biofilm formation in blood culture isolates from patients in a Brazilian teaching hospital. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, v. 86, n. 1, p. 11-14, 2016.

PINHEIRO, M. F. N., et al. Características microbiológicas da carne de Caranguejo-Uçá (*Ucides Cordatus*) comercializada na cidade de São Luís-Ma. *B. Inst. Pesca*, 43(1): 44 - 51, 2017.

PRICE, Margaret F.; WILKINSON, Ian D.; GENTRY, Layne O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. *Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology*, v. 20, n. 1, p. 7-14, 1982.

RODRIGUES, C. R. F., et al. Avaliação da qualidade microbiológica de queijo Minas Padrão produzido no município de Januária-MG. *Caderno de Ciências Agrárias*, v. 8, n. 1, p. 57-61, 2016.

RUARO, A. et al. Biodiversity and characterization of indigenous coagulase-negative staphylococci isolated from raw milk and cheese northern Italy. *Food Microbiology*, v.34, p.106 a 111, 2013.

RUZAUSKAS, M., et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus* in companion animals: a cross-sectional study. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, v. 13, n. 1, p. 56, 2014.

SABER, H., et al. A review of Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) types in coagulase-negative staphylococci (CoNS) species. *The Malaysian journal of medical sciences: MJMS*, v. 24, n. 5, p. 7, 2017.

SCHLEIFER, K. H., et al. Family VIII. *Staphylococcaceae* fam. nov. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, v. 3, p. 392, 2009.

SHRESTHA, Lok Bahadur; BHATTARAI, Narayan Raj; KHANAL, Basudha. Antibiotic resistance and biofilm formation among coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples at a tertiary care hospital of eastern Nepal. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2017.

SENG, R., et al. Biofilm formation of methicillin-resistant coagulase negative staphylococci (MR-CoNS) isolated from community and hospital environments. *PloS one*, v. 12, n. 8, p. e0184172, 2017.

SILVA JR, E.A. *Manual de Controle Higiênico-sanitário em Serviços de Alimentação*. São Paulo: Livraria Varela, 6ª edição, 2013.

SILVA, J. F. M.; FEITOSA, A. C.; RODRIGUES, R. M. *Staphylococcus aureus* em alimentos. *DESAFIOS-Revista Interdisciplinar Da Universidade Federal Do Tocantins*, v. 4, n. 4, p. 15-31, 2017.

SOARES CASAES NUNES, Raquel; MERE DEL AGUILA, Eduardo; PASCHOALIN, Vânia Margaret Flosi. Safety evaluation of the coagulase-negative staphylococci microbiota of salami: superantigenic toxin production and antimicrobial resistance. *BioMed research international*, v. 2015.

STEPANOVIC S., et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Methods*, v. 2, p. 174-9, 2000.

TEWELDEMEDHIN, M., et al. Bacterial profile of ocular infections: a systematic review. *BMC ophthalmology*, v. 17, n. 1, p. 212, 2017.

TSUBAKISHITA S., et al. Origin and molecular evolution of the determinant of methicillin resistance in staphylococci. *Antimicrob Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 54, n. 10, p. 4352–4359, 2010.

TULINSKI, P., et al. Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci on pig farms as a reservoir of heterogeneous staphylococcal cassette chromosome mec elements. *Appl Environ Microbiol*, v.78, n.2, p.299-304, 2012.

ÜNAL, N.; ÇINAR, O. D. Detection of staphylococcal enterotoxin, methicillin-resistant and Panton–Valentine leukocidin genes in coagulase-negative staphylococci isolated from cows and ewes with subclinical mastitis. *Tropical Animal Health and Production*, v. 44, n. 2, p. 369-375, 2012.

WANG, W., et al. Enterotoxigenicity and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from retail food in China. *Frontiers in microbiology*, v. 8, 2017.

YUW., et al. Pathogenic conversion of coagulase-negative staphylococci. *Microbes and infection*, v. 19, n. 2, p. 101-109, 2017.