

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

U LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE STAPHYLOCOCCUS COAGULASE
NEGATIVOS ISOLADOS NA CADEIA DE PROCESSAMENTO DE CARNE DE SUÍNO

ALESIA VIEIRA

ORIENTADOR(A):
Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

2023

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

U LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE STAPHYLOCOCCUS COAGULASE
NEGATIVOS ISOLADOS NA CADEIA DE PROCESSAMENTO DE CARNE DE SUÍNO**

ALESIA VIEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SEGURANÇA ALIMENTAR

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutor João Bettencourt Barcelos Cota

VOGAIS:

Doutor Luís Avelino da Silva Coutinho

Patarata

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

ORIENTADOR(A):

Doutora Maria João dos Ramos Fraqueza

2023

DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Nome: Alesia Vieira

Título da Tese ou
Dissertação: Avaliação da resistência a antibióticos de Staphylococcus coagulase negativos isolados na cadeia de processamento de carne de suíno.

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2023

Designação do curso
de Mestrado ou de
Doutoramento: Mestrado em Segurança Alimentar

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- Clínica Produção Animal e Segurança Alimentar
 Morfologia e Função Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de 6 meses, 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 25 de Maio de 2023

(indicar aqui a data da realização das provas públicas)

Assinatura: Alesia Vieira

Agradecimentos

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

A todos aqueles que confiaram no meu trabalho, me deram força quando estava desmotivada e acreditaram na minha capacidade em concretizar este objectivo.

À minha mãe que sempre me motivou e ajudou durante o meu percurso académico e que fez de mim a pessoa que sou hoje.

À minha orientadora, Professora Doutora Maria João Fraqueza por toda a ajuda, simpatia e paciência, pela orientação, disponibilidade, competência e rigor no apoio prestado.

À Faculdade de Medicina Veterinária pela disponibilidade de ceder o Laboratório Tecnológico de Produtos de Origem Animal de Medicina Veterinária bem como todo o material necessário à realização da parte prática do presente trabalho.

À Equipa Técnica do Laboratório Tecnológico de Produtos de Origem Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa pela amabilidade em partilhar o seu espaço comigo, pela disponibilidade, simpatia e ajuda prestada.

Este trabalho foi financiado pelos projetos FARM2FORK PTDC/CVT-CVT/29510/2017 e UIDB/00276/2020 através de Fundação para Ciência e a Tecnologia.

The logo consists of the letters 'FCT' in a bold, dark green, sans-serif font. The 'F' and 'T' are tall and narrow, while the 'C' is wider and shorter, creating a balanced, blocky appearance.

Fundação para a Ciência e a Tecnologia

MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS DE STAPHYLOCOCCUS COAGULASE NEGATIVOS ISOLADOS NA CADEIA DE PROCESSAMENTO DE CARNE DE SUÍNO

RESUMO:

O objectivo geral deste trabalho foi avaliar a resistência a antibióticos de *Staphylococcus* coagulase-negativos isolados numa cadeia de processamento de carne de suíno, da linha de abate e desmancha até ao consumidor. Efetuou-se a caracterização genotípica e fenotípica da colecção de isolados de *Staphylococcus* coagulase negativos (n=145). A colecção de *Staphylococcus* foi obtida de amostras de suínos e ambientais (superfícies de equipamentos e mãos de trabalhadores, antes e após higienização) recolhidas por zaragatoa na linha abate (etapa de sangria), na desmancha (mesas e tapetes de transporte), de peças de carne (pá e entremeada) e carne entregue a famílias (crua e cozinhada) e ainda das mãos de consumidores (antes, após lavagem e após a preparação culinária).

Os isolados foram identificados por PCR Multiplex desenvolvido por Morot-Bizot et al. (2004). Foi possível identificar 36% como *Staphylococcus saprophyticus*, 14% como *Staphylococcus carnosus*, 14% como *Staphylococcus epidermidis*, 9% como *Staphylococcus equorum* e 3% isolados como *Staphylococcus xylosus*; cerca de 19% dos isolados foram do género *Staphylococcus spp.*

Os perfis genéticos dos 145 isolados foram obtidos com recurso a PCR *Fingerprinting* tendo-se efetuado a sua análise através do software BioNumerics. A identificação de vários *clusters* permitiu a seleção de 37 *Staphylococcus spp.* de perfil genético diferente pertencentes a diferentes espécies. Estas estirpes foram avaliadas quanto à sua suscetibilidade a antibióticos através do método de difusão em disco, tendo-se testado 16 antibióticos de classes diferentes. Os 37 isolados foram suscetíveis aos antibióticos teicoplanina e linezolid, 16% dos isolados apresentaram resistência apenas a um antibiótico, 62% dos isolados mostraram-se multirresistentes. Foram as espécies *S. epidermidis* e *S. equorum* que apresentaram o maior número de isolados multirresistentes. A frequência de isolados resistentes à gentamicina foi de 51% e à oxacilina de 58%.

Não existe uma clara relação entre os perfis genéticos dos isolados de espécies SCN presentes na carne e nos consumidores, nem sobre a potencial transferência de estirpes com resistência a antibióticos entre os dois. No entanto, o fato de as estirpes serem resistentes a antibióticos e de existirem muitas que são multirresistentes aumenta o perigo de transmissão de genes de resistência na cadeia de produção de carne de suíno.

Palavras-chave: *Staphylococcus* coagulase - negativos; carne de suíno; resistência a antibióticos; multirresistência.

ANTIBIOTIC RESISTANCE ASSESSMENT OF STAPHYLOCOCCUS COAGULASE-NEGATIVE ISOLATES FROM THE PORK MEAT CHAIN

ABSTRACT:

The general objective of this work was to evaluate the antibiotic resistance of coagulase-negative *Staphylococcus* isolated in a swine meat processing chain, from the slaughter and cutting line to the consumer. The same was performed genotypic and phenotypic characterization of the collection of coagulase-negative *Staphylococcus* isolates (n=145). The *Staphylococcus* collection was obtained from swine and environmental samples (equipment surfaces and workers' hands, before and after cleaning) collected by swab at the slaughter line (bleeding step), at cutting/deboning process (tables and transport mats), from pieces of meat (shoulder and belly bone rind on) and meat delivered to families (raw and cooked) and even from consumers' hands (before, after washing and after cooking).

The isolates were identified to species by Multiplex PCR which had been developed by Morot-Bizot et al. (2004). It was possible to identify 36% as *Staphylococcus saprophyticus*, 14% as *Staphylococcus carnosus*, 14% as *Staphylococcus epidermidis*, 9% as *Staphylococcus equorum*, 3% isolates as *Staphylococcus xylosum*; about 19% of the isolates were *Staphylococcus* spp.

The genetic profiles of the 145 isolates were obtained using PCR *Fingerprinting* and their analysis was performed with the BioNumerics software. The identification of several clusters allowed the selection of 37 *Staphylococcus* spp. with different genetic profile belonging to different species. These strains were evaluated for their susceptibility to antibiotics by the disk diffusion method and 16 antibiotics of different classes were tested. The 37 isolates were susceptible to the antibiotics teicoplanin and linezolid, 16% of the isolates showed resistance to only one antibiotic, 62% of the isolates were multiresistant. The species *S. epidermidis* and *S. equorum* presented the highest number of multiresistant isolates. The frequency of gentamicin resistant isolates was 51% and oxacillin was 58%.

There is no clear relationship between the genetic profiles of SCN species isolates present in meat and consumers, and for the potential transfer of antibiotic resistant strains between the two. However, the fact that the strains are resistant to antibiotics and that there are many that are multidrug-resistant increases the danger of transmission of resistance genes in the pork production chain.

Key words: *Staphylococcus* coagulase - negative; pork chain; antibiotic resistance, multiresistance.

Índice	
Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Índice de Figuras.....	ix
Índice de Tabelas	xi
Lista de Abreviaturas.....	xii
I. Introdução.....	1
II. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. Caracterização e Classificação do gênero <i>Staphylococcus</i>.....	3
2.1.1. Caracterização do grupo <i>Staphylococcus</i> coagulase – negativos.....	5
2.1.2. Epidemiologia, transmissão e potenciais infecções.....	6
2.2. O uso de antibióticos na produção animal e transmissão de genes associados à resistência aos antimicrobianos na cadeia alimentar.....	8
2.2.1. Classes dos antibióticos.....	14
2.3. Modo de ação dos antibióticos.....	18
2.3.1. Inibidores da síntese da parede celular.....	19
2.3.2. Inibidores da síntese proteica.....	21
2.3.3. Inibidores da síntese de ácidos nucleicos.....	23
2.3.4. Antagonistas metabólicos.....	23
2.4. Mecanismos de resistência bacteriana.....	24
2.4.1. Resistência aos antibióticos β – lactâmicos.....	25
2.4.2. Resistência aos Aminoglicosídeos.....	26
2.4.3. Resistência aos antibióticos Tetraciclina.....	27
2.4.4. Resistência às Fluoroquinolonas	28
2.4.5. Resistência à Mupirocina.....	29
2.4.6. Resistência aos Glicopeptídeos.....	29
2.4.7. Resistência às Oxazolidinonas.....	30
2.4.8. Resistência aos Macrolídeos.....	31
2.5. Identificação dos <i>Staphylococcus</i> coagulase-negativos.....	31
III. Trabalho experimental: Avaliação da resistência a antibióticos de <i>Staphylococcus</i> coagulase negativos isolados na cadeia de processamento de carne de suíno.....	36
3.1. Coleção de Isolados.....	36
3.2. Armazenamento.....	37

3.3. Cultivo dos isolados para caracterização morfológica e posterior processo de extração de DNA.....	37
3.4. Extração de DNA.....	37
3.5. Tipificação Genómica por PCR <i>Fingerprinting</i>	38
3.6. Identificação genética de espécies.....	39
3.6.1. Identificação de <i>Staphylococcus carnosus</i> , <i>Staphylococcus equorum</i> e <i>Staphylococcus simulans</i>	40
3.7. Teste de sensibilidade aos antibióticos.....	41
3.8. Análise dos resultados.....	43
IV. Resultados e Discussão.....	43
4.1. Caracterização da diversidade genética dos isolados.....	43
4.2. Identificação de isolados de <i>Staphylococcus coagulase</i> negativos.....	45
4.2.1. Espécies identificadas de <i>Staphylococcus coagulase</i> negativos e sua relação com a fonte.....	48
4.3. Caracterização fenotípica dos isolados: morfologia das colónias e utilização do manitol.....	59
4.4. Caracterização da resistência aos antibióticos de <i>Staphylococcus coagulase</i> negativos isolados da cadeia de abate de suínos.....	61
Conclusões	71
V. Referências Bibliográficas	72

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 2.1. Linha do tempo da descoberta das espécies pertencentes ao género <i>Staphylococcus</i>	4
Figura 2.2. Esquema das espécies estafilocócicas, baseado na categorização da coagulase como principal fator de virulência e sua associação as fontes animal e humana.	5
Figura 2.3. Vias de disseminação de resistência aos antibióticos entre os potenciais reservatórios: o homem, os animais e o ambiente (adaptada de Tânia Salgueiro 2020)	12
Figura 2.4. Principais modos de ação de antibióticos sobre bactérias (adaptado de Tenover 2006).	19
Figura 2.5. Locais de ação dos vários antibióticos inibidores da síntese proteica sobre o ribossoma (adaptado de McDermott et al. 2003)	22
Figura 2.6. Mecanismos de Resistência aos Antimicrobianos (adaptado de Nogueira 2016)	25
Figura 2.7. As estruturas de resistência às tetraciclinas (adaptado de Speer, Shoemaker, Salyers 1992)	28
Figura 4.1. PCR <i>Fingerprinting</i> de estirpes de <i>Staphylococcus</i> em estudo (com primer OPC-19)	44
Figura 4.2. PCR <i>Fingerprinting</i> de estirpes de <i>Staphylococcus</i> em estudo (com primer GTG-5)	44
Figura 4.3. Identificação de <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus xylosus</i> e <i>Staphylococcus saprophyticus</i> e <i>Staphylococcus spp.</i> pela técnica Multiplex PCR: fotografia do gel de agarose após electroforese.	46
Figura 4.4. Identificação de <i>Staphylococcus carnosus</i> pela técnica PCR: fotografia do gel de agarose após electroforese.	46
Figura 4.5. Identificação de <i>Staphylococcus simulans</i> pela técnica PCR: fotografia do gel de agarose após electroforese.	47
Figura 4.6. Identificação de <i>Staphylococcus equorum</i> pela técnica PCR: fotografia do gel de agarose após electroforese.	47
Figura 4.7. Identificação da espécie dos isolados	48
Figura 4.8. Distribuição entre as espécies e da origem de recolha	52

Figura 4.9.	Dendrograma da análise do perfil genético obtido por PCR <i>Fingerprinting</i> das estirpes de <i>Staphylococcus carnosus</i> (A escala acima do dendrograma mostra a percentagem do nível de semelhança obtido).	53
Figura 4.10.	Dendrograma da análise do perfil genético de estirpes <i>Staphylococcus epidermidis</i> obtido por PCR <i>Fingerprinting</i> .	54
Figura 4.11.	Dendrograma da análise do perfil genético de estirpes <i>Staphylococcus xylosus</i> obtido por PCR <i>Fingerprinting</i> .	54
Figura 4.12.	Dendrograma da análise do perfil genético de estirpes <i>Staphylococcus equorum</i> obtido por PCR <i>Fingerprinting</i> .	55
Figura 4.13.	Dendrograma da análise do perfil genético de estirpes <i>Staphylococcus saprophyticus</i> obtido por PCR <i>Fingerprinting</i> .	57
Figura 4.14.	Dendrograma da análise do perfil genético de <i>Staphylococcus spp.</i> obtido por PCR <i>Fingerprinting</i> .	58
Figura 4.15.	Isolados 116-2 (1) e 117-3 (2) de <i>Staphylococcus spp.</i> que fermentavam o manitol	59
Figura 4.16.	Isolado <i>Staphylococcus</i> 113-1 que não utilizou o manitol	60
Figura 4.17.	Isolado <i>Staphylococcus</i> F16Cc-4 que evidenciaram uma utilização lenta do meio Manitol Salt Agar	60
Figura 4.18.	Isolado OS1L 113-2 operário na zona sangria (<i>S. equorum</i>)	61
Figura 4.19.	Isolado TS 1-1 tapete sujo (<i>S. saprophyticus</i>)	61
Figura 4.20.	Dendrograma dos perfis de antibioresistência de 37 SCN	69
Figura 4.21.	Dendrograma do perfil genético e de antibioresistência dos isolados SCN	70

INDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 2.1. Os antibióticos de importância médica utilizados em animais de produção que integram a cadeia alimentar, incluem os antibióticos de importância crítica (Prioritários e de Elevada Prioridade), elevada Importância e importantes (adaptado de WTO 2019, OIE 2015)	13
Tabela 2.2. Classificação dos antimicrobianos a partir de diversas variáveis	14
Tabela 2.3. Categorização das classes de antibióticos para uso veterinário (adaptado de EMA 2020)	16
Tabela 2.4. Antibióticos que inibem a síntese da parede celular (Medley 2007)	20
Tabela 2.5. Antibióticos que inibem a síntese proteica nos ribossomas (Medley 2007)	22
Tabela 3.1. Descrição da origem e recolha dos isolados em estudo.	36
Tabela 3.2. Primers utilizados na reação PCR <i>Fingerprinting</i> (Versalovic 1994)	38
Tabela 3.3. Primers utilizados na reacção PCR multiplex <i>Staphylococcus</i> género e dimensão dos produtos de amplificação (Morot-Bizot 2004)	39
Tabela 3.4. Primers utilizados na reacção PCR para identificação <i>Staphylococcus carnosus</i> , <i>Staphylococcus simulans</i> , <i>Staphylococcus equorum</i> e dimensão dos produtos de amplificação (Blaiotta 2005)	40
Tabela 3.5. As condições operatórias de amplificação no termociclador para identificação <i>Staphylococcus carnosus</i> , <i>Staphylococcus simulans</i> , <i>Staphylococcus equorum</i> (Blaiotta 2005)	41
Tabela 3.6. Lista dos antibióticos em testes, respetivas concentrações e cutoff points utilizados como critério de classificação da suscetibilidade (EUCAST 2022)	42
Tabela 4.1. Identificação de estirpes relacionadas com a fonte da cadeia de processamento	49
Tabela 4.2. Identificação genotípica versus capacidade de fermentação do manitol	60
Tabela 4.3. Percentagem de Isolados com Resistência e Suscetibilidade a cada um dos antibióticos testados	62
Tabela 4.4. Perfil de resistência dos 37 isolados de SCN com fenótipos de resistência	63
Tabela 4.5. Perfil de resistência dos isolados por espécies	66

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC	Acetiltransferases
AMH	Agar Muller Hinton
APC	Promotores de crescimento
APH	Fosfotransferases
ATP	Adenosine triphosphate
ATTC	The Global Bioresource Center
BHI	Infuso Cérebro Coração
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
CCS	Contagem de Células Somáticas
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DDS	Difusão em disco simples
DHPS	Enzima dihidropteroato sintetase
DHFR	Enzima dihidrofolato redutase
DSMZ	German Collection of Microorganisms and Cell Cultures
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	desorribonucleotídeo trifosfatado
ECN	Estafilococos Coagulase-Negativos
ECP	Estafilococos Coagulase-Positivos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar
EMA	Agência Europeia do Medicamento
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FAO	Organização para a Alimentação e Agricultura
fMET	Formilmetionina
g	Gram
h	Horas
HCl	Ácido clorídrico
H ₂ O	Água
IC	Índice de conversão alimentar
KOH	Hidróxido de potássio
KCl	Cloreto de potássio
LCR	Líquido cefalorraquidiano

mARN	Ácido ribonucleico mensageiro
MALDI-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption with Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry / Técnica de espectrometria de massa por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz e associada a um analisador do tempo de voo
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MH	Müller-Hinton
min	Minuto
mL	Mililitros
MLST	Tipagem de sequência de múltiplos locus
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MSA	Manitol Salt Agar
n	Número, quantidade
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanogramas
O ₂	Oxigênio
OIE	Organização Mundial da Saúde Animal
OMC	Organização Mundial do Comércio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PABA	Ácido p-aminobenzóico
pb	Pares de base
PBP	«Penicillin Binding Protein» - Proteína Ligadora de Penicilina
PCR	«Polymerase Chain Reaction» - Reação em Cadeia da Polimerase
PCR-RFLP	Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis
PFGE	Pulsed-field gel electrophoresis
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomoles
PYR	Pirrolidonil arilamidase
RAM	A resistência antimicrobiana
rpm	Rotações por minuto
SCN	<i>Staphylococcus</i> Coagulase-Negativos
SENTRY	O Programa de Vigilância de Resistência
TBE	Tris-Borate-EDTA buffer

TSA	Teste de suscetibilidade a antibióticos
U	Unidade
UI	Unidades Internacionais
UPC	Unidade de população corrigida
UPGMA	Distância média não ponderada
V	Voltagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar

I. Introdução

A contaminação da carne com agentes patogénicos representa uma grande ameaça para a saúde pública. O crescente volume de transações comerciais de alimentos é considerado um potencial fator de risco, facilitado pelo transporte global e disseminação de bactérias patogénicas nos alimentos. A importação de produtos de origem animal é um exemplo da potencial disseminação de agentes patogénicos recorrendo-se à análise de risco para caracterizar esses produtos em relação à existência de potenciais perigos causadores de doença no Homem (MacDiarmid 1993).

A aplicação de medidas sanitárias e fitossanitárias resultantes do Acordo sobre a «Aplicação de Medidas Sanitárias e Fitossanitárias (SPS)» (WTO 2016) exige que os membros da Organização Mundial do Comércio (OMC) removam as barreiras ao comércio de produtos agrícolas, exceto em situações em que tal comércio possa potencialmente criar um risco para os animais, vegetais ou para a saúde humana no país importador.

Staphylococcus aureus é um dos agentes patogénicos de origem alimentar mais comuns, causando surtos de intoxicação alimentar em todo o mundo (Hennekinne 2012). Além da espécie *S. aureus*, a importância clínica e veterinária dos estafilococos coagulase-positivos (SCP) e estafilococos coagulase-negativos (SCN) tem sido frequentemente negligenciada. Nos últimos anos, o risco de SCP e SCN foi destacado por relatórios recentes (Bhumbra 2014; Giormezis 2014; Pinheiro 2015), com referência especial aos SCN que tem sido comumente encontrados em alimentos (Osman 2015). Os SCN foram reconhecidos como vetores de transmissão de genes de virulência e as espécies *S. aureus*, *S. epidermidis* foram implicadas em alguns casos de intoxicação alimentar (Veras 2008).

Além disso, considera-se que os estafilococos relacionados com alimentos podem atuar como vetores de disseminação de genes de resistência a antibióticos a outros microrganismos potencialmente patogénicos, causando uma ameaça à saúde pública. Foi relatado que o gene *mecA* estava presente em SCN (MRSCN) isolados de instalações em explorações pecuárias e em produtos de carne, podendo ocorrer a sua potencial transmissão para *S. aureus* (Bhargava 2014; Tulinski 2012).

O uso de antibióticos em animais produtores de alimentos pode afetar a saúde humana pela presença de resíduos de antibióticos e também devido à emergência de bactérias resistentes a antibióticos que poderão estar presentes em alimentos de origem animal. As consequências de tal seleção incluem (WTO 2001):

- o aumento do risco de microrganismos patogénicos 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 presentes em bactérias isoladas de animais para a microbiota humana.

Os fatores associados com o aparecimento de resistência aos antibióticos em agentes bacterianos presentes em animais produtores de alimentos e na indústria parecem ser semelhantes aos responsáveis pela resistência a antibióticos nos humanos, aumentando assim o risco do aparecimento e propagação de bactérias resistentes, incluindo as capazes de causar infecções em animais e seres humanos (WTO 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 (WTO 2001). A partir da presença de determinados genes que estão associados ao desenvolvimento de resistência, a bactéria será capaz de inibir os efeitos das substâncias antimicrobianas pelos principais mecanismos descritos: inativação direta da molécula ativa; perda da suscetibilidade bacteriana ao antimicrobiano por modificação do alvo de ação; e redução da concentração do fármaco que atinge a molécula alvo sem modificação do próprio composto (Lambert 2012; Leclercq 2002).

O objectivo geral deste trabalho foi avaliar a frequência da resistência a antibióticos em isolados de *Staphylococcus* coagulase-negativos presentes na cadeia de processamento de carne de suíno, na linha abate e desmancha até ao consumidor. Foram realizadas as avaliações genotípicas e fenotípicas de *Staphylococcus* coagulase-negativos. A diversidade genética de *Staphylococcus* coagulase-negativos foi estudada para estabelecer possíveis relações com as contaminações ao longo da cadeia de produção de carne e sua transmissão ao homem.

No presente estudo foram caracterizados 145 isolados de *Staphylococcus* provenientes de amostras recolhidas na linha abate (etapa de sangria) e desmancha, das superfícies das máquinas, tapetes de transporte, das mãos dos trabalhadores, peças de carne resultantes da desmancha de carcaças e das mãos de consumidores em diferentes fases de preparação da carne para ser consumida.

II. Revisão Bibliográfica

2.1. Caracterização e Classificação do género *Staphylococcus*

Os membros do género *Staphylococcus* são bactérias cocos Gram-positivos, com diâmetro de 0,5 a 1,5 microns, anaeróbias facultativas, não móveis, catalase positivas, oxidase negativas, fermentadoras de glucose e são frequentemente encontradas na pele e mucosas de animais de sangue quente (Willey, Sherwood, Woolverton 2008; Santos 2007).

Os estafilococos apresentam-se isoladamente, em pares ou em grupos, tolerando melhor do que outras bactérias a exposição ao calor, à luz solar (10-12 horas), à secagem e a agentes químicos (etanol puro e fenol). Quando expostos ao calor podem suportar a sua acção letal até aos 60°C por uma hora, ou até aos 80°C por meia hora, ou ainda quando sujeitos a 150°C durante 10 min. É conhecida a sua tolerância a concentrações elevadas de cloreto de sódio (superior a 10%). A temperatura ótima para a multiplicação de estafilococos é 30–37°C (Carvalho 2010).

Estas bactérias possuem uma parede celular sob a forma de uma monocamada justaposta à membrana celular (Willey et al. 2008), permeável à passagem de macromoléculas, não oferecendo, por isso, resistência à difusão de antibióticos (Sousa 2006). Contudo, é referida a sua resistência à bacitracina (Piessens 2011a).

A descrição de um número limitado de espécies estafilocócicas chegou ao fim na década de 1970, com 10 espécies identificadas (por exemplo, *S. haemolyticus*, *S. hominis* e *S. intermedius*). Em 1985, mais de 15 espécies de *Staphylococcus* já haviam sido descritas sendo que nos últimos anos este número tem aumentado, especialmente as de origem animal (Taponen et al. 2012; Riesen et al. 2009; Supré et al. 2010; Spargser et al. 2003; Vernozy-Rozand et al. 2000).

No início de 2014, mais de 40 espécies estavam validamente descritas (Figura 2.1).

As espécies coagulase-negativas estão evidenciadas a verde; as espécies coagulase-positivas e coagulase-variáveis são as amarelas (observe que apenas *S. schleiferi* subsp. coagulans é coagulase-positiva). Veja-se que na época do estabelecimento das três primeiras designações de espécies, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*, estes termos possuíam um conteúdo mais amplo do que o atual. Em particular, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* foram usados para descrever estafilococos saprofíticos não patogénicos (e outros cocos Gram-positivos que ocorrem em grupos).

Atualmente, o género *Staphylococcus* é constituído por 49 espécies e 26 subespécies, das quais a maioria são *Staphylococcus* coagulase-negativos (SCNs) (Euzéby 2014).

As espécies de *Staphylococcus* coagulase-positivos (*Staphylococcus aureus*, *S. delphini*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, *S. lutrae*, *S. schleiferi* subsp. coagulans e algumas estirpes de *S. hyicus*) e de *Staphylococcus* coagulase-negativos são separadas pela

prova fenotípica da coagulase, uma enzima que está associada à patogenicidade e realiza a conversão do fibrinogênio em fibrina, resultando na coagulação do plasma (Soares 2010).

De modo geral, os SCNs são microrganismos comensais de humanos e animais, com um grau de patogenicidade relativamente baixo e que causam infecções de caráter predominantemente oportunista. Excepcionalmente, destaca-se o microrganismo típico da pele humana *S. epidermidis*, agente de infecções nosocomiais, cuja importância se encontra bem estabelecida devido à sua eficiência na produção de biofilmes e à frequência com que apresenta resistência aos antimicrobianos. Entretanto, o interesse pelas espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos tem aumentado também na medicina veterinária (Verdayes et al. 2012; Piessens 2011a).

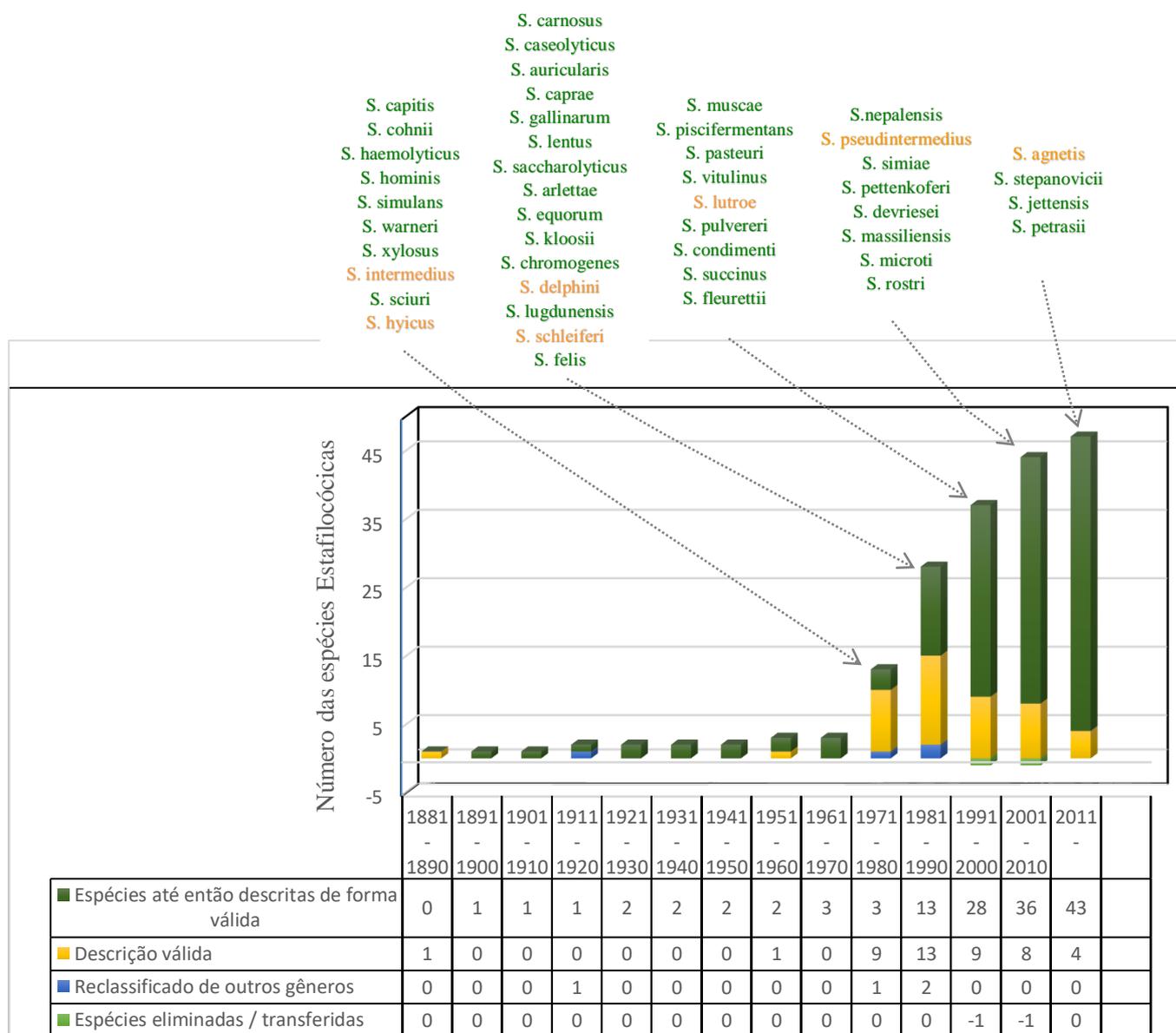


Figura 2.1. Linha do tempo da descoberta das espécies pertencentes ao gênero *Staphylococcus*

2.1.1. Caracterização do grupo *Staphylococcus coagulase* – negativos

Dependendo da capacidade de produzir coagulase, uma enzima extracelular que causa a coagulação do plasma sanguíneo, os estafilococos são divididos em coagulase-positivos e coagulase-negativos (Figura 2.2) (Bannerman et al. 2006).

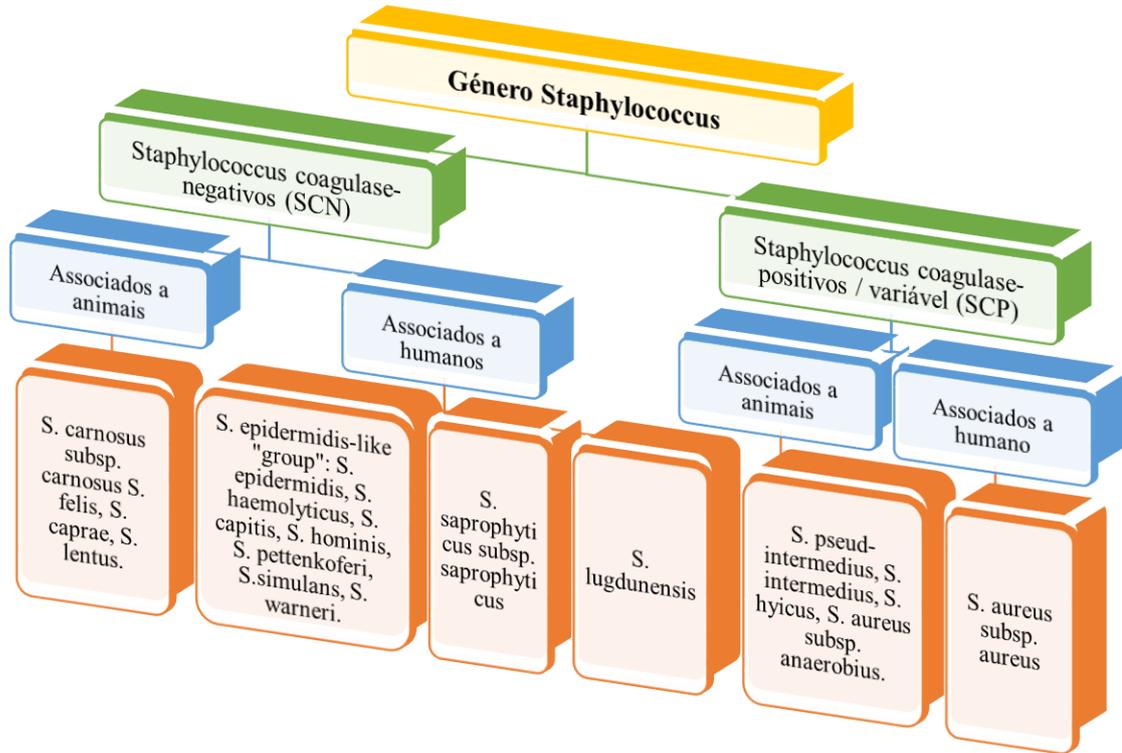


Figura 2.2. Esquema das espécies estafilocócicas, baseado na categorização da coagulase como principal fator de virulência e sua associação as fontes animal e humana

As espécies coagulase-negativas incluem os *Staphylococcus epidermidis* e *Staphylococcus saprophyticus*, bem como *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus pettenkoferi*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus pettenkoferi*, *Staphylococcus schlichus*. Os estafilococos coagulase-negativos são menos patogênicos do que os coagulase-positivos (Kloos and Bannerman 1999; Becker 2014; Euzéby 2018).

Os estafilococos coagulase-negativos fazem parte da microbiota normal da pele humana e geralmente não causam doenças graves. *Staphylococcus lugdunensis* são mais virulentos do que outros estafilococos coagulase-negativos e, no caso de dispositivos médicos implantáveis ou cateteres, *Staphylococcus lugdunensis* pode causar infecções ósseas e articulares graves contínuas em pacientes hospitalizados (Euzéby 2018).

2.1.2. Epidemiologia, transmissão e potenciais infecções

O «Programa de Vigilância Antimicrobiana – SENTRY» faz a monitoração da prevalência dos agentes patogénicos e dos padrões de resistência a antimicrobianos nos Estados Unidos, Canadá, América Latina e Europa. O estudo do programa SENTRY revelou que espécies de SCN foram a terceira causa mais comum de septicémias. Estes dados confirmaram os anteriormente apresentados pelos programas National Nosocomial Infection Surveillance (NNIS) e Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic Importance (SCOPE) em relação à importância emergente dos SCN como causa de bacterémia nosocomial (Diekema et al. 2001; Edmond et al. 1999). Num estudo realizado por Pfaller (1999) *S. epidermidis* foi a espécie mais comum de SCN identificada nas três regiões (Estados Unidos, Canadá, América Latina) provocando doenças sistémicas nosocomiais.

Durante as últimas décadas houve uma mudança na distribuição das espécies causadoras de septicemias tendo-se tornado predominantes as bactérias Gram positivas. Num estudo realizado por Wisplinghof e colaboradores foram analisados 24179 casos de infecções nosocomiais da corrente sanguínea de pacientes hospitalizados nos Estados Unidos, sendo os SCNs os isolados mais comuns (31%) seguindo-se *S. aureus* e *Enterococcus* (Wisplinghoff et al. 2004).

O seu potencial patogénico reside na sua capacidade de colonizar biomateriais e causar infecções em dispositivos médicos. SCN, principalmente a espécie *S. epidermidis*, são a principal causa de infecções nosocomiais da corrente sanguínea e são responsáveis por aproximadamente 30% dessas infecções, principalmente devidas a cateteres intravasculares. Da mesma forma, os SCN são a principal causa de várias outras infecções associadas a dispositivos médicos, incluindo enxertos vasculares, shunts de líquido cefalorraquidiano (LCR), articulações protéticas e válvulas cardíacas artificiais. Como o uso de tais dispositivos tem aumentado nos países desenvolvidos, a incidência de infecções por espécies SCN tem aumentado paralelamente (Nguyen et al. 2017; Lee and Anjum 2022).

A conversão do SCN de simbiote para agente patogénico humano tem sido um reflexo direto do uso de dispositivos médicos (Kathie 2009).

A fonte de infecções estafilocócicas pode ser uma pessoa doente ou um portador saudável. As vias de transmissão podem ser por via aérea, poeira aerotransportada, contato directo e ingestão de alimentos. A susceptibilidade à infecção depende do estado geral da saúde e da idade. Os mais suscetíveis são as crianças, especialmente recém-nascidos e bebés. Normalmente, a capacidade dos *Staphylococcus* invadirem e a resistência do hospedeiro são bem equilibradas, de modo que a infecção não se desenvolve até que surja uma situação em que um microrganismo altamente virulento ou uma resistência reduzida seja encontrada.

Os estafilococos causam doenças por invasão direta no tecido, pela produção de uma exotoxina. A invasão direta no tecido é o mecanismo mais comum de doença estafilocócica, incluindo infecções de pele, pneumonia, endocardite, osteomielite, artrite infecciosa (séptica).

As infecções por bactérias *Staphylococcus* coagulase-negativos podem resultar numa variedade de doenças de pele, incluindo celulite, furúnculos, impetigo ou síndrome da pele escaldada estafilocócica (Staphylococcal Scalded Skin Syndrome, SSSS). Algumas espécies SCN, como *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*, compartilham os mesmos habitats que *S. aureus* e colonizam permanente ou transitoriamente as narinas anteriores, vestibulo nasal e outras regiões da pele e membranas mucosas, agindo como uma fonte de infecção (Conlan 2012), o *S. saprophyticus* dá origem a infecções urinárias e processos septicêmicos (Lawal 2021). Portanto, tanto *S. aureus* quanto SCN são frequentemente recuperados da mesma amostra (Becker 2006).

Outros agentes patógenos oportunistas significativos incluem *S. hominis*, *S. warneri*, *S. capitis*, *S. simulans*, *S. cohnii* e *S. saccharolyticus* (Bannerman 2003). *S. lugdunensis* parece estar associado à endocardite após o implante de válvulas protéticas, à peritonite, à infecção de partes moles e à osteomielite vertebral (Osmon et al. 2000).

Em resumo, as manifestações clínicas das doenças estafilocócicas nosocomiais são diversas. Elas podem ser divididas nos seguintes grupos:

- Doenças da pele e do tecido subcutâneo (furúnculos, pioderma, abscessos, flegmão);
- Síndrome da pele semelhante a queimaduras;
- Danos nos ossos e articulações (osteomielite, artrite);
- Síndrome do choque tóxico;
- Angina estafilocócica;
- Endocardite estafilocócica;
- Pneumonia e pleurisia;
- Enterite estafilocócica aguda e enterocolite;
- Envenenamento com enterotoxina estafilocócica;
- Meningite estafilocócica e abscesso cerebral;
- Doenças estafilocócicas do trato urinário;
- Sépsis estafilocócica (Baron 1996; Bush 2021).

2.2. O uso de antibióticos na produção animal e transmissão de genes associados à resistência aos antimicrobianos na cadeia alimentar

Pouco depois da introdução dos antibióticos em medicina humana, os seus efeitos benéficos foram observados em animais de produção no tratamento de doenças. Os antibióticos foram utilizados na medicina veterinária para combater patologias causadas por bactérias, bem como para profilaxia, evitando a propagação das doenças (Thiele-Bruhn 2003; Amaro 2020). O uso de antibióticos na produção animal melhorou o índice de conversão alimentar (IC) e foram usados como promotores de crescimento, devido a alterações da microbiota intestinal, disponibilizando-se para o animal mais calorias provenientes da dieta. Adicionalmente, os antibióticos reduziram a morbidade e a mortalidade causadas por doenças, não só clínicas mas também subclínicas. Consequentemente, desde o início da década de 1950, tornou-se usual administrar doses sub-terapêuticas de antibióticos a animais de produção, para promover o crescimento e prevenir doenças. Assim sendo, os antimicrobianos em produção animal foram utilizados para: 1) promoção do crescimento; 2) prevenção e controlo de doenças (uso profilático); 3) tratamento de doenças (Soares 2018; Amaro 2020).

O uso de antibióticos procurou, historicamente, alcançar quatro objetivos principais:

- Obter maior taxa de produtividade;
- Aumentar a eficiência alimentar;
- Elevar a resistência a doenças e melhorar a saúde em geral;
- Diminuir a taxa de mortalidade (Duarte 2020).

Os mecanismos pelos quais os antibióticos promovem o crescimento estão relacionados com a interferência na síntese da parede celular e a replicação cromossômica bacteriana, além de interferirem no processo de respiração celular e síntese protéica (translação bacteriana) (García 2010), provocando redução da população bacteriana (Boelter 1998) e, consequentemente, redução das perdas energéticas devidas à fermentação microbiana. Estima-se que nos suínos cerca de 6% da energia da dieta seja perdida na fermentação microbiana (Wegener 1999).

Os antibióticos também diminuem a produção de toxinas bacterianas e o consumo de aminoácidos dietéticos pela microbiota, consequentemente aumentam a sua disponibilidade para o desenvolvimento animal. Eles também reduzem a espessura da parede intestinal e melhoram a absorção de monossacarídeos, aminoácidos, vitaminas e minerais (Boelter 1998).

Embora os promotores de crescimento tenham sido abolidos na União Europeia (UE) em 2006, não se registou uma diminuição do consumo de antimicrobianos na Europa, antes

pelo contrário, ocorreu um aumento da sua utilização como forma metafílica e profilática de tratamento de doença (Woolhouse et al. 2015).

Foi sugerido que os antibióticos quando são administrados aos animais em baixas doses por longos períodos, como promotores de crescimento, ocorre uma pressão seletiva que pode conduzir ao aparecimento de resistências antimicrobianas. Assim, a resistência antimicrobiana dos agentes patogénicos que surgirem em animais de produção pode ser subsequentemente transmitida ao Homem – nomeadamente aquando da ingestão de carne ou outros produtos de origem animal cozinhados insuficientemente, o que leva à persistência de bactérias resistentes a antibióticos (Verraes et al. 2013; Spellberg et al. 2016) as quais podem ainda ser transmitidas para o ambiente.

As tetraciclina e os macrolídeos são exemplos de antibióticos que foram frequentemente administrados a suínos para estabilização da microbiota intestinal no período de desmame e a bovinos no tratamento de doenças respiratórias e mastites (Cervantes 2009). Além do aspecto profilático, os antibióticos foram adicionados à ração animal para melhorar o desenvolvimento animal e reduzir custos de produção tendo um efeito idêntico a promotores de crescimento (Regitano 2010).

Em Maio de 2017, as autoridades Portuguesas e o sector suinícola estabeleceram um acordo de forma a se reduzir em 30% o consumo de antibióticos nos próximos três anos, e, mais recentemente, a diminuir o consumo de colistina dos atuais 12 mg para 5 mg por unidade de população corrigida (mg/UPC).

Os antibióticos mais usados em suinicultura são as tetraciclina, tilosina, bacitracina de zinco, clortetraciclina, sulfametazina e outras sulfamidas (McEwen 2002; Mathew 2007). Este recurso aos antibióticos na produção suinícola tem criado 2 focos de inquietação no consumidor. O primeiro deles é alvo de maior preocupação, advém da ocorrência de bactérias antibiorresistentes devido à utilização de antibióticos nas explorações suínas. O segundo, passa pelo receio da presença de resíduos químicos perigosos nas carnes. Sabendo isto, os produtores de carne de suíno estão alertados sobre a necessidade de ganhar a confiança do consumidor no produto adquirido (Giguère 2013).

A melhor recomendação para minimizar o uso de antibióticos em produção animal consiste em manter os animais em condições confortáveis e livres de situações que afetem o seu bem-estar e saúde. De facto, encontramos-nos perante um desafio multifactorial com vista a minimizar o uso de antibióticos em produção animal, implicando nomeadamente:

1. Condições de manejo: densidade animal, espaço de comedouros e número de bebedouros, iluminação (fotoperíodo e intensidade luminosa), cama;
2. Condições ambientais: temperatura, humidade, ventilação;
3. Biossegurança;
4. Programa vacinal;

5. Nutrição;
6. Qualidade da água;
7. Grau de moenda e forma de apresentação do alimento;
8. Programa alimentar;
9. Melhoramento do estado de saúde dos animais e da erradicação de doenças (Dewulf et al. 2020; NRC 1999).

A alimentação fornecida aos animais é um factor crucial para manter a microbiota intestinal equilibrada, e essencial para evitar o uso de antibióticos. Uma alimentação adequada deve ser conseguida através da manutenção do equilíbrio nutricional que está dependente da espécie animal, da fase de crescimento e produção. Recomenda-se um baixo teor proteico com concentrações adequadas de aminoácidos essenciais, matérias-primas de boa qualidade e adequado balanço electrolítico e fibra dietética. Além disso, é aconselhável complementar a dieta com antioxidantes (vitamina E e selénio), enzimas exógenas, e outros aditivos tais como probióticos, prebióticos e ácidos orgânicos (Amaro 2020).

O uso de antibióticos na medicina veterinária e na produção animal resultou em animais mais saudáveis e produtivos. Contudo, o mau uso de antibióticos (de forma continuada ou desadequada) esteve na base da emergência e disseminação de bactérias resistentes e multiresistentes a antibióticos. O desenvolvimento de resistência aos antibióticos em agentes infecciosos constitui uma das maiores ameaças para a saúde pública e saúde animal (Amaro 2020).

A resistência aos antibióticos tem aumentado de forma preocupante nos últimos anos e algumas atividades antropogénicas têm modificado a distribuição e a quantidade de genes de resistência, alterando assim o resistoma. São exemplos destas atividades: o uso de antibióticos na pecuária, aquacultura e agricultura, o tratamento de águas residuais e efluentes agrícolas e da indústria do fabrico de antibióticos, que libertam para o meio ambiente bactérias resistentes e/ou antibióticos que, embora em quantidades residuais, podem exercer pressão seletiva em bactérias já existentes na água, solo e ar. Por sua vez, estas bactérias presentes no meio ambiente podem passar os seus determinantes de resistência direta ou indiretamente para agentes patogénicos normalmente causadores de infeções em humanos e animais (Marshall and Levy 2011; Finley et al. 2013).

O tratamento metafiláctico é uma administração a curto prazo de antibióticos através de rações ou água potável a animais saudáveis que pertencem a um rebanho ou bando onde estão presentes sinais clínicos de doença. No tratamento profilático também é realizada a administração de antibióticos na água ou ração contudo este acontece quando os animais do bando ou rebanho estão saudáveis mas em risco de infeção. Contudo, a utilização de doses subterapêuticas por períodos prolongados pode levar a efeitos semelhantes aos dos promotores de crescimento (Economou and Gousia 2015; FAO 2016).

Na prática clínica veterinária (de animais de produção e de companhia), os antibióticos são administrados em dose terapêutica para tratamento de infecções específicas, preferencialmente após um diagnóstico bacteriológico e um teste de suscetibilidade aos antibióticos.

A utilização de antibióticos promove a resistência por pressão seletiva, facilitando a disseminação de bactérias resistentes. As bactérias adquirem resistência por mutações espontâneas no seu DNA ou por aquisição de genes de resistência que provêm de outras bactérias (transferência horizontal de genes). A transferência horizontal de genes de resistência ocorre através de elementos genéticos móveis (plasmídeos), os quais constituem uma das maiores ameaças na disseminação da resistência, envolvendo bactérias de qualquer espécie e facilitando a disseminação simultânea de genes de resistência a antibióticos pertencentes a diferentes classes (β -lactâmicos, quinolonas, aminoglicosídeos, fenicóis, sulfonamidas, trimetoprim), genes de virulência e de resistência a biocidas (FAO 2016).

A resistência aos antibióticos é um fenómeno que flui entre o homem, os animais e o meio ambiente. Os agricultores, médicos veterinários, trabalhadores das explorações e dos matadouros, bem como os seus coabitantes, são os grupos de maior risco pois são os mais expostos à colonização por bactérias resistentes aos antibióticos presentes em animais de produção de alimentos com implicações na cadeia alimentar (ECDC, EFSA, EMA 2015). A disseminação de agentes microbianos resistentes a antibióticos à comunidade e a ambientes hospitalares deve ser vista com grande precaução, tendo sido a cadeia alimentar uma possível via de transmissão de agentes patogénicos com resistência a antibióticos para o Homem.

Um fator de risco crucial para o aparecimento de resistência a antibióticos, é a existência de resíduos de antibióticos que mantêm a sua capacidade de atuação sobre as bactérias ambientais promovendo a seleção da resistência. A elevada contaminação dos ambientes agrícolas deve-se ao fato de que 75% a 90% dos antibióticos usados na produção pecuária não são metabolizados e são excretados para o meio ambiente. Também as bactérias resistentes a antibióticos, sejam comensais ou agentes patogénicos zoonóticos, são eliminadas através das excreções, contaminando o meio ambiente (FAO 2016).

A transmissão da resistência a antibióticos pode dar-se por contacto direto e/ou indireto, via cadeia alimentar, água ou através do estrume aplicado na agricultura (Figura 2.3). A globalização do comércio de animais vivos e de alimentos, assim como o trânsito de pessoas facilita a rápida propagação das bactérias resistentes a antibióticos.

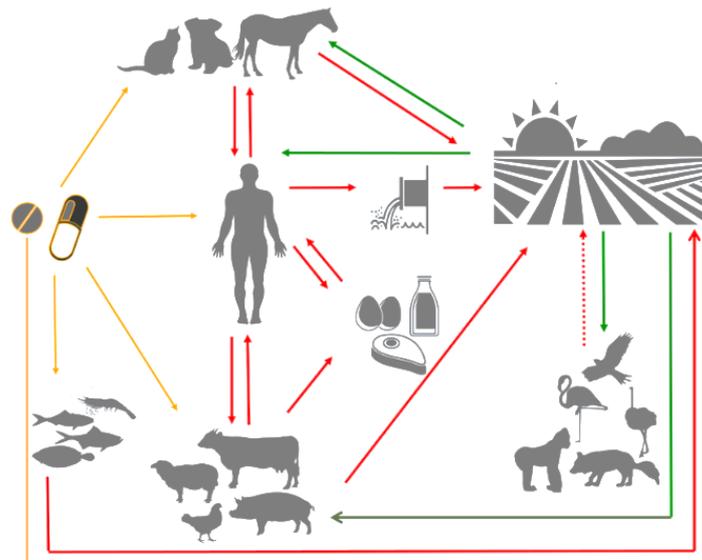


Figura 2.3. Vias de disseminação de resistência aos antibióticos entre os potenciais reservatórios: o homem, os animais e o ambiente (adaptada de Tânia Salgueiro 2020).

De acordo com o relatório da Agência Europeia de Medicamentos Vigilância Europeia do Consumo de Antimicrobianos Veterinários (ESVAC), em Portugal o consumo médio ponderado da população (expresso em miligramas por unidade de correção populacional) de antimicrobianos foi de 175,8 mg/PCU em animais produtores de alimentos em 2020 (ESVAC 2022). O consumo corrigido de biomassa de cefalosporinas de terceira e quarta geração, quinolonas, penicilina, macrolídeos e tetraciclina em animais produtores de alimentos foi cerca de 0,4; 7,3; 38,9; 20 e 60,4 mg/PCU, tendo se registado um aumento em 5,8% das vendas de cefalosporinas de 3ª e 4ª geração (de 0,32 mg/PCU para 0,34 mg/PCU em 2021). As vendas gerais de antibióticos em 2021 diminuíram 13,1% em comparação com as que ocorreram em 2020 (de 172,5 mg/PCU para 149,9 mg/PCU). As três classes de antibióticos mais vendidas em 2021 foram tetraciclina, penicilina e macrolídeos, que representaram respectivamente, 29,7%, 23,7% e 10,7% das vendas totais (ESVAC 2022).

As vendas de medicamentos veterinários contendo antibióticos considerados criticamente importantes para a medicina humana, apresentaram uma tendência de venda decrescente, o que é extremamente relevante. As cefalosporinas da terceira e quarta gerações registaram uma diminuição de 38% nas vendas entre 2011 e 2021. No mesmo período, as vendas de polimixinas diminuíram 80%, de fluoroquinolonas 14%, e de outras quinolonas 83% (ESVAC 2022).

Num esforço conjunto, as organizações internacionais ligadas à Saúde Pública (OMS), Saúde Animal (OIE), Alimentação e Agricultura (FAO), aprovaram um conjunto de medidas que integram o Plano de Ação Mundial contra a resistência antimicrobiana, o qual envolve

também outras organizações, como a Agência Europeia do Medicamento (EMA) e a Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA).

Uma das medidas de controlo da resistência é a utilização prudente dos antibióticos para preservação da sua eficácia. Deve ser evitada ou, preferencialmente, proibida a utilização de alguns antibióticos em animais produtores de alimentos, especialmente os que constam da lista da OMS e que são considerados antibióticos de importância crítica (Tabela 2.1) para tratar infeções humanas complicadas (WTO 2019).

Sendo crucial manter a eficácia dos antibióticos no tratamento de infeções graves causadas por bactérias resistentes a múltiplos medicamentos nos seres humanos, a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) reavaliou recentemente o uso de colistina no âmbito da saúde animal. Existe um potencial de transferência de resistência antimicrobiana entre espécies (Liu et al. 2015), pelo que foi eliminada a indicação de tratamentos profiláticos com utilização de colistina em animais de produção, agora o seu uso é apenas aconselhado para tratar se necessário animais infetados e os seus coabitantes (EMA 2016).

Tabela 2.1. Os antibióticos de importância médica utilizados em animais de produção que integram a cadeia alimentar, incluem os antibióticos de importância crítica (Prioritários e de Elevada Prioridade), elevada importância e importantes (adaptado de WTO 2019; OIE 2015).

Classe de Antibiótico	Alguns exemplos utilizados em animais (princípios activos)
Antibióticos de Importância Crítica - Prioritários	
Cefalosporinas de 3a e 4a geração	Cefoperazona; Ceftriaxona; Cefovecina, Cefquinoma (uso veterinário: Ceftiofur)
Macrólidos	Eritromicina; Espiramicina; (uso veterinário: Tulatromicina; Tilosina; Tilmicosina)
Polimixinas	Colistina
Quinolonas	Ciprofloxacina; Norfloxacina; (uso veterinário: Enrofloxacina; Danofloxacina; Marbofloxacina)
Antibióticos de Importância Crítica - Elevada Prioridade	
Aminoglicosídeos	Gentamicina; Estreptomina; Apramicina; Neomicina
Ansamícinas	Rifampicina; Rifaximina
Penicilinas	Penicilina; Ampicilina; Amoxicilina; Amoxicilina X Ácido clavulânico; Ticarcilina
Antibióticos de Elevada Importância	
Anfenicóis	Uso veterinário: Florfenicol
Cefalosporinas (1º e 2a geração)	Cefalexina; Cefalotina; Cefazolina
Lincosamidas	Clindamicina; uso veterinário (pirimicina)

Sulfonamidas	Sulfadiazina; Sulfametazina; Sulfatiazole
Sulfonamidas e Diaminopiridinas	Sulfametoxazole + Trimetoprim
Tetraciclínas	Tetraciclina; Oxitetraciclina; Doxiciclina; Oxitetraciclina

2.2.1. Classes dos antibióticos

Os antibióticos são substâncias que têm a capacidade de inibir a multiplicação e/ou destruir microrganismos. Podem ser produzidos por bactérias ou por fungos ou podem ser total ou parcialmente sintéticos. O principal objetivo do uso de um antibiótico é o de prevenir ou tratar uma infecção, diminuindo ou eliminando os microrganismos patogénicos e, se possível, mantendo a microbiota normal. Para isso é necessário conhecer os microrganismos responsáveis pelo tipo de infecção a ser tratada.

Os antibióticos podem ser classificados considerando o seu espectro de ação, o tipo de atividade antimicrobiana, o grupo químico ao qual pertencem e o mecanismo de ação (Tabela 2.2).

Espectro para Gram-positivas possuem parede celular com uma única e espessa camada de peptidoglicanos. Quando este tipo de bacterias entra em contato com os corantes da coloração de Gram adquirem a cor púrpura ou azul quando fixada com cristal violeta. Espectro para Gram-negativas possuem parede celular mais delgada e apresentam uma segunda membrana lipídica, diferente da membrana plasmática. Quando em contato com a coloração Gram o lipídio da membrana mais externa é dissolvido no álcool e libera o primeiro corante, o cristal violeta.

O mau uso de antibióticos nos doentes é responsável pelo aparecimento de resistência microbiana. O termo «resistente» implica que o microrganismo pode multiplicar-se *in vitro* na presença de uma concentração do princípio ativo idêntica à que este atinge no sangue, ou seja, o seu efeito é dose-dependente. Contudo, a concentração de muitos antibióticos no sangue é inferior à que esta presente noutros fluidos ou tecidos corporais, permitindo que as bactérias sejam resistentes a um antibiótico específico no sangue, mas suscetíveis noutros tecidos (Vieira et al. 2012).

Tabela 2.2. Classificação dos antimicrobianos a partir de diversas variáveis

Variável	Classificação	Exemplo
Microrganismos suscetíveis	Antibacterianos	Beta-lactâmico
	Antifúngicos	Griseofulvina
	Antivirais	Aciclovir
	Antiparasitários	Pirimetamina

Origem do antimicrobiano	Antibióticos: produzidos por microrganismos	Aminoglicosídeo
	Quimioterápicos: sintetizados em laboratório	Sulfonamidas
Atividade antibacteriana	Bactericida: matam os microrganismos	Quinolona, Beta-lactâmicos, Aminoglicosídeos, Glicopeptídeos
	Bacteriostático: inibem a multiplicação dos microrganismos, sendo necessária a atuação do sistema imunitário para eliminação do agente.	Macrolídeo, Linezolida e Lincosaminas
Mecanismo de Ação	Alteração de parede celular	Beta-lactâmico, Glicopeptídeos Fosfomicina, Bacitracina
	Alteração de membrana citoplasmática	Anfotericina B
	Interferência na replicação cromossômica	Antifúngicos/antivirais
	Inibição da síntese protéica	Aminoglicosídeo, Tetraciclina, Glicilciclina Macrolídeos, Anfenicois, Lincosamidas, Oxazolidinonas
	Inibição metabólica	Sulfonamida
Espectro de Ação	Espectro para Gram-positivas	Penicilina
	Espectro para Gram-negativas	Aminoglicosídeos
	Ampla espectro	Cloranfenicol
	Ativo sobre protozoários	Tetraciclina
	Ativo sobre fungos	Nistatina
	Ativo sobre espiroquetas	Eritromicina
	Ativo sobre riquetsias, micoplasma e clamídias	Macrolídeo
	Ativo sobre micobactérias	Estreptomicina
	Ativo sobre algas	Anfotericina B

Uma nova classificação dos antibióticos de uso veterinário foi aprovada pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA) (Mixão 2020) de acordo com a abordagem «One Health», e que promove uma colaboração estreita e integrada entre a medicina humana e a veterinária. Esta revisão classificou os antibióticos tendo considerado o potencial desenvolvimento de resistência antimicrobiana, a necessidade do seu uso em medicina veterinária e o risco para a saúde pública causado pela sua utilização em animais (Tabela 2.3).

A nova classificação (Tabela 2.3) tem quatro categorias, A a D, cada uma com uma palavra-chave correspondente a uma ação que lhe foi atribuída (EMA 2020). A categoria A («Evitar») inclui todos os princípios ativos proibidos em animais produtores de alimentos e que só podem ser administrados individualmente a animais de estimação em circunstâncias excepcionais, ou seja corresponde às classes de antibióticos não autorizados atualmente em

medicina veterinária na UE. A categoria B («Restrito») inclui as quinolonas, cefalosporinas e polimixinas de terceira e quarta gerações, sendo que para mitigar o risco para a saúde pública o seu uso deve ser restringido.

Para os antibióticos presentes na categoria C («Cuidado») existem várias alternativas que podem ser usadas em medicina humana mas em medicina veterinária só devem ser utilizados quando não existem substâncias antimicrobianas eficazes na Categoria D.

A categoria D («Prudência») é considerada de risco mais baixo. Estes antibióticos podem ser usados numa primeira abordagem de tratamento em animais mas sempre de uma forma prudente. Em qualquer das categorias de antibióticos os períodos longos de tratamento devem ser evitados (EMA 2020).

Tabela 2.3. Categorização das classes de antibióticos para uso veterinário (adaptado de EMA 2020)

Categorização das classes de antibióticos para uso veterinário (com exemplos das substâncias autorizadas para uso humano ou veterinário na UE)				
A	Amdinopenicilinas – mecilinam, pivmecilinam	Carbapenemes – meropenem, doripenem	Medicamentos utilizados exclusivamente para o tratamento da tuberculose ou outras doenças micobacterianas – isoniazida, etambutol, pirazinamida, etionamida	Glicopeptídeos - vancomicina
	Cetólidos - telitromicina	Lipopeptídeos - daptomicina		Gliciliclinas - tigeciclina
	Monobactams - aztreonam	Oxazolidinonas - linezolid		Derivados do ácido fosfónico - fosfomicina
	Rifamicinas (exceto rifaximina) - rifampicina	Riminoferazinas - clofazimina	Outras cefalosporinas e penemes (código ATC J01DI), incluindo associações de cefalosporinas de 3.^a geração com inibidores das lactamases beta – ceftobiprole, ceftarolina, ceftolozano-tazobactam, faropenem	Ácidos pseudomónicos - mupirocina
	Carboxipenicilina e ureidopenicilina, incluindo associações com inibidores das lactamases beta - piperacilina-tazobactam	Sulfonas - dapsona		Substâncias recentemente autorizadas na medicina humana na sequência da publicação da categorização do AMEG
		Streptograminas – pristinamicina, virginamicina		

EVITAR

B	<p>Cefalosporinas, 3.^a e 4.^a geração, à exceção de associações com inibidores das lactamases beta – cefoperazona, ceftiofur, cefovecina, cefquinoma, ceftiofur</p>	<p>Polimixinas – colistina, polimixina B</p>	<p>Quinolonas: fluoroquinolonas e outras quinolonas – Cinoxacina, danofloxacina, difloxacina, enrofloxacina, flumequina, ibafloxacina, marbofloxacina, norfloxacina, orbifloxacina, ácido oxolínico, pradofloxacina</p>	RESTRINGIR	
C	<p>Aminoglicosídeos (exceto espectinomomicina) – amicacina, apramicina, diidroestreptomicina, framacetina, gentamicina, canamicina, neomicina, paromomicina, estreptomicina, tobramicina</p>	<p>Aminopenicilinas, em associação com inibidores das lactamases beta - amoxicilina + ácido, clavulânico, ampicilina + sulbactam</p> <p>Cefalosporinas, 1.^a e 2.^a geração, e cefamicinas – cefacetil, cefadroxil, cefalexina, cefalónio, cefalotina, cefapirina, cefazolina</p>	<p>Anfenicóis – cloranfenicol, florfenicol, tianfenicol</p> <p>Lincosamidas – clindamicina, lincomicina, pirlimicina</p> <p>Pleuromutilinas – tiamulina, valnemulina</p>	<p>Macrólidos – eritromicina, gamitromicina, oleandomicina, espiramicina, tildipirosina, tilmicosina, tulatromicina tilosina, tilvalosina</p> <p>Rifamicinas: apenas rifaximina - rifaximina</p>	PRECAUÇÃO
D	<p>Aminopenicilinas, sem inibidores das lactamases beta – amoxicilina, ampicilina, metampicilina</p> <p>Tetraciclínas – clortetraciclina, doxiciclina, oxitetraciclina, tetraciclina</p> <p>Penicilinas naturais de espectro de ação estreito (penicilinas sensíveis às lactamases beta) – benzilpenicilina benzatínica, feneticilina, fenoximetilpenicilina benzatínica, fenoximetilpenicilina, benzilpenicilina, benzilpenicilina procaínica, hidróido de penetamato</p>	<p>Aminoglicosídeos: apenas espectinomomicina, estreptomicina</p> <p>Penicilinas antiestafilocócicas (penicilinas resistentes às lactamases beta) – cloxacilina, dicloxacilina, nafcilina, oxacilina</p>	<p>Sulfonamidas, inibidores da diidrofolato redutase e associações – formosulfatiazol, sulfaleno, ftalilsulfatiazol, sulfamerazina, sulfacetamida, sulfametizol, sulfaclopiridazina, sulfametoxazol, sulfaclozina, sulfametoxipiridazina, sulfadiazina, sulfamonometoxina, sulfadimetoxina, sulfanilamida, sulfadimidina, sulfapiridina, sulfadoxina, sulfaquinoxalina, sulfafurazol, sulfatiazol, sulfaguanidina, trimetoprim</p> <p>Polipeptídeos cíclicos - bacitracina</p> <p>Antibacterianos esteroides - ácido fusídico</p>	<p>Nitroimidazóis - Metronidazol</p> <p>Derivados do nitrofurano – furaltadona, furazolidona</p>	PRUDÊNCIA

Também Werth (2020) sugeriu outra classificação dos antibióticos, dependendo da sua estrutura química. Entretanto, os antibióticos incluídos em cada classe afetam frequentemente o microrganismo de maneira diferente e podem ser eficazes contra bactérias diferentes (Werth 2020).

As classes de antibióticos incluem:

- Aminoglicosídeos;
- Carbapenêmicos;
- Cefalosporinas;
- Fluoroquinolonas;
- Glicopeptídeos e lipoglicopeptídeos (como vancomicina);
- Macrólidos (como eritromicina e azitromicina);
- Monobactâmicos (aztreonam);
- Oxazolidinonas (como linezolida e tedizolida);
- Penicilinas;
- Polipeptídeos;
- Rifamicinas;
- Sulfonamidas;
- Estreptograminas (como quinupristina e dalfopristina);
- Tetraciclinas.

Carbapenêmicos, cefalosporinas, monobactâmicos e penicilinas compõem as subclasses de antibióticos β -lactâmicos, uma classe de antibióticos caracterizada por uma estrutura química denominada anel β -lactâmico.

Outros antibióticos que não se enquadram nas classes listadas acima incluem cloranfenicol, clindamicina, daptomicina, fosfomicina, lefamulina, metronidazol, mupirocina, nitrofurantoína e tigeciclina (Werth 2020).

2.3. Modo de ação 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 encontram-se divididos em várias classes tendo em conta os seus mecanismos de ação: glicopeptídeos, β -lactâmicos, lipopéptidos, quinolonas, aminoglicosídeos, cloranfenicol, macrólidos-lincosamida-estreptogramina B, tetraciclinas, oxazolidinonas, sulfonamidas e trimetoprim (Hoek et al. 2011).

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, inibe a multiplicação dos microrganismos. A eliminação do microrganismo neste caso depende da imunidade do paciente. São exemplos de drogas

bacteriostáticas: sulfonamidas, trimetopim, cloranfenicol, tetraciclina, nitrofurantoína (Medley 2007).

A classificação mais comum dos antibióticos baseia-se no seu modo de ação. Assim são descritos cinco mecanismos de ação, tal como representado na Figura 2.4 (Tenover 2006):

- Inibição da síntese da parede celular;
- Inibição da síntese ou danos da membrana citoplasmática;
- Inibição da síntese proteica nos ribossomas;
- Alterações na síntese dos ácidos nucleicos;
- Alteração do metabolismo celular.

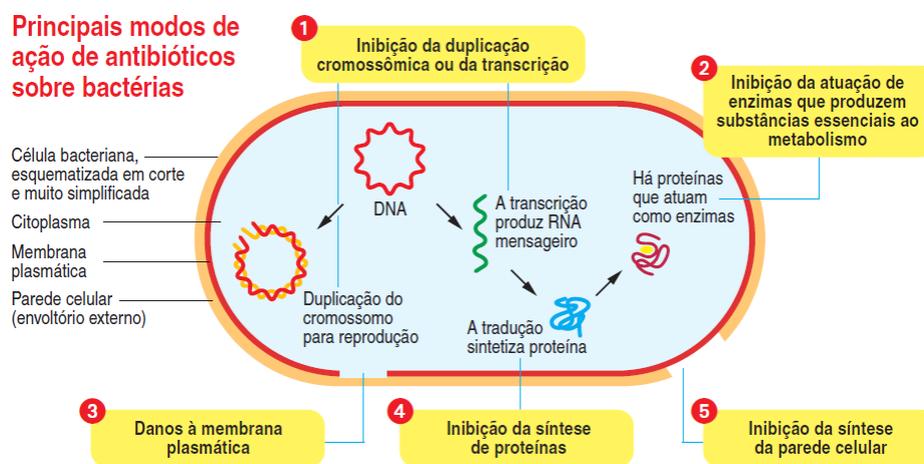


Figura 2.4. Principais modos de ação de antibióticos sobre bactérias (adaptado de Tenover 2006).

2.3.1. Inibidores da síntese da parede celular

Fazem parte deste grupo fármacos como os β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenemos e monobactams) e glicopéptidos (Willey et al. 2008). São dos grupos de antibióticos mais seletivos, por terem como alvo de atuação uma estrutura, o peptidoglicano, que apenas existe nas células procariontas e não nas eucariotas.

A síntese do peptidoglicano faz-se em 4 fases:

- 1) síntese do precursor no citoplasma;
- 2) transporte do precursor através da membrana;
- 3) deposição de glicanos na parede celular;
- 4) ligação e maturação.

Os antibióticos β -lactâmicos e os glicopéptidos, os mais usados do grupo dos inibidores da síntese da parede celular, atuam nas fases 3 e 4 da síntese do peptidoglicano (McDermott et al. 2003).

São exemplo de antibióticos com ação ao nível da síntese do peptidoglicano os antibióticos β -lactâmicos e os glicopéptidos (Tabela 2.4).

Tabela 2.4. Antibióticos que inibem a síntese da parede celular (adaptado de Medley 2007).

Classe	Substância	Mecanismo de ação	
β - lactâmicos	Penicilina	<ul style="list-style-type: none"> • Penicilina G (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	<ul style="list-style-type: none"> • Cefalexina • Cefadroxila • Cefalotina • Cefazolina 	Preferencialmente sobre bactérias Gram – positivas através da lise da parede.
	Cefalosporina 2 ^a geração	<ul style="list-style-type: none"> • Cefactor • Cefuroxina • Cefprozil • Cefoxitina 	
	Cefalosporina 3 ^a geração	<ul style="list-style-type: none"> • 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	<ul style="list-style-type: none"> • 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	<ul style="list-style-type: none"> • Imipenem • Meropenem 	Inibe a síntese da parede celular e apresenta amplo espectro de ação.
	Monobactâmicos	<ul style="list-style-type: none"> • Aztreonam 	Bactericida contra bacilos Gram-negativos. Age na síntese da parede celular.
	Inibidor da Betalactamase	<ul style="list-style-type: none"> • Ácido clavulônico 	Inibe a beta - lactamase, enzima responsável pela degradação do antibiótico. Deve ser usado em associação, pois possui baixa atividade.
	Glicopeptídeos	<ul style="list-style-type: none"> • Vancomicina 	Bactericida atuando na inibição da síntese da parede celular.

A teicoplanina e a vancomicina que fazem parte de grupo glicopeptídeo, são utilizados contra bactérias Gram-positivas. O alvo molecular destes compostos é a extremidade D-alanil-D-alanina (D-Ala-D-Ala) do precursor do peptidoglicano da parede celular. Estes unem-se a estas extremidades, impedindo a ligação das transglicosilases ao seu substrato e evitando assim a extensão do péptido linear de glicano na parede celular, ou seja, inibem a reação de transglicosilação (Allison and Lambert 2015).

Os β -lactâmicos têm um largo espetro e ligam-se, através do seu anel β -lactâmico, às enzimas transpeptidases, mais conhecidas por proteínas de ligação à penicilina (PLP ou Penicillin-binding proteins - PBP), existentes em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Estas enzimas são responsáveis pela ligação cruzada, denominada reação de transpeptidação, entre as cadeias lineares de glicano e o peptidoglicano maduro. Assim, ao se unirem a estas enzimas, simulando a estrutura dos resíduos D-Ala-D-Ala, os antibióticos β -lactâmicos funcionam como um substrato alternativo, não permitindo que estas participem na reação de transpeptidação, uma das últimas e principais etapas da síntese da parede celular (Drawz and Bonomo 2010; Worthington and Melander 2013).

2.3.2. Inibidores da síntese proteica

Existe uma grande variedade de antibióticos que têm como mecanismo de ação a inibição da síntese proteica, mas cada um atua numa fase distinta da tradução (iniciação, alongação e terminação). Para melhor compreender a atuação destes compostos, é importante relembrar que os ribossomas bacterianos têm na sua constituição duas subunidades: uma maior designada de 50S e outra mais pequena, a 30S, onde ocorre a ligação dos fármacos de forma a inibir ou modificar a síntese proteica (Allison and Lambert 2015; Katzung 2007).

A síntese proteica ocorre em 2 passos principais:

- 1) Transcrição, onde o ácido desoxirribonucleico (DNA) vai ser transcrito para ácido ribonucleico mensageiro (mARN), passo que é mediado pela enzima ARN polimerase (Sousa 2006);
- 2) Tradução, que requer a presença do enzima aminoacil-tARN sintetase, que promove a ligação do ARN de transporte (tARN) a um aminoácido específico (Sousa 2006).

A tradução processa-se em 3 fases: iniciação em que, no ribossoma, ocorre a ligação da subunidade 30S ao codão de iniciação do mARN. O tARN que transporta a fMET (formilmetionina) junta-se a este complexo no local P da cadeia peptídica em crescimento e a subunidade 50S liga-se à 30S para formar o complexo de iniciação 70S; a próxima fase é o alongamento, onde o tARN correspondente ao próximo codão liga-se ao local A do ribossoma; há depois a movimentação da cadeia em crescimento para o local P e fica o local A livre para

o próximo tARN, num processo chamado translocação (McDermott et al. 2003); a cadeia peptídica vai crescendo até aparecer um codão de finalização no local A do ribossoma, ao qual não corresponde nenhum tARN, terminando assim a translocação e dá-se a libertação do péptido (Sousa 2006). A Figura 2.5 ilustra, de um modo geral, os locais de ação dos vários antibióticos inibidores da síntese proteica sobre o ribossoma.

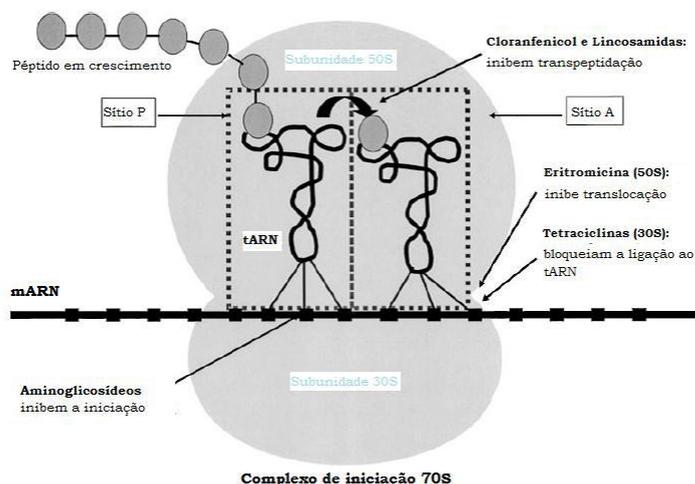


Figura 2.5. Locais de ação dos vários antibióticos inibidores da síntese proteica sobre o ribossoma (adaptado de McDermott et al. 2003)

Na Tabela 2.5 encontram-se descritas as classes de antibióticos que inibem a síntese proteica nos ribossomas.

Tabela 2.5. Antibióticos que inibem a síntese proteica nos ribossomas (adaptado de Medley 2007).

Classe	Substância	Mecanismo de ação
Aminoglicósidos	• Neomicina	Inibem a síntese de proteínas. A sua penetração é dependente do transporte ativo de oxigénio, por isso possuem baixa ação contra microrganismos anaeróbios.
	• Gentamicina	
	• Tobramicina	
	• Amicacina	
	• Netilmicina	
	• Estreptomina	
Macrólidos	• Azitromicina	Inibem a síntese de proteínas ligando-se à subunidade 50s do ribossoma bacteriano.
	• Claritromicina	
	• Eritromicina	
	• Troleandomicina	
Cloranfenicol	• Cloranfenicol	Inibem a síntese de proteínas ligando-se à subunidade 50s do ribossoma bacteriano.

Tetraciclínas	• Tetraciclina	Bacteriostática ao inibir a síntese de proteínas. Atuam sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.
	• Oxitetraciclina	
	• Doxiciclina	
	• Minociclina	
Lincosamidas	• Clindamicina	Ativa contra cocos Gram-positivos. Inibe a síntese de proteínas. Semelhante ao cloranfenicol e macrólidos.

2.3.3 Inibidores da síntese de ácidos nucleicos

Estes fármacos atuam por bloqueio da replicação ou da transcrição, ao inibirem a enzima DNA polimerase ou as enzimas DNA helicase ou ARN polimerase, respetivamente (Willey et al. 2008).

A classe das quinolonas engloba antibióticos sintéticos cujo espectro de ação depende da geração em análise. A primeira geração, da qual faz parte o ácido nalidíxico, surgiu em 1962 e atuava apenas em bactérias de Gram-negativas. Nos anos 80 surgiu a segunda geração, as fluoroquinolonas (ciprofloxacina e norfloxacina), e nos anos 90, a terceira geração (levofloxacina e moxifloxacina), ambas com um espectro que abrange tanto bactérias Gram-negativas como Gram-positivas. A quarta e última geração de quinolonas (gemi-floxacina e trovafloxacina) exerce também a sua ação sobre bactérias anaeróbicas. Estes antibióticos inibem as enzimas DNA girase e topoisomerase IV (Fàbrega et al. 2009).

A DNA girase é constituída por quatro subunidades, duas A e duas B, codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, respetivamente. Esta enzima é responsável pelo superenrolamento negativo do DNA, dependente da hidrólise de ATP (Adenosina trifosfato), que, por sua vez, é necessário para processos como o alívio da tensão de torção durante a replicação, condensação do cromossoma, replicação bacteriana, iniciação da transcrição e alongação (Cheng et al. 2013).

A topoisomerase IV também possui duas subunidades A e duas B, codificadas pelos genes *parC* e *parE*, respetivamente. Esta enzima tem como funções: a quebra da ligação entre cromossomas recentemente replicados, para que a divisão celular possa ser completa e originar duas células filhas, cada uma com uma cópia do cromossoma; e o relaxamento de superenrolamentos positivos, tal como a DNA girase (Uivarosi 2013).

2.3.4 Antagonistas metabólicos

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. 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).

As sulfonamidas são antibióticos sintéticos que surgiram em 1932 e competem com um fator indispensável para a síntese do ácido fólico, o ácido p-aminobenzóico (PABA) pela ligação ao enzima dihidropteroato sintetase (DHPS), catalisadora da reação que origina o ácido dihidropteróico que é essencial à síntese do ácido fólico (Brown 1962; Werth 2022).

O trimetoprim foi introduzido no contexto clínico nos anos 60 e atua uns passos mais à frente na cadeia metabólica em relação às sulfonamidas, por inibição competitiva com a enzima dihidrofolato redutase (DHFR). Não havendo a reação catalisada por este enzima, não ocorre a redução do ácido dihidrofólico em ácido tetrahidrofólico (Roth et al. 1962; Kemnic 2022).

2.4. Mecanismos de resistência bacteriana

Os antibióticos criam uma pressão de seleção que levam à ocorrência de microrganismos resistentes no ambiente, apenas aqueles que desenvolvem formas de resistir à sua ação poderão sobreviver tal como referido por Ogawara (1981) e Beceiro (2013). Um microrganismo é resistente a um antibiótico quando na presença de concentrações desse fármaco o seu desenvolvimento não é inibido ou não ocorre a sua lise (Witte and Klare 1999).

A resistência bacteriana aos antibióticos consiste em séries de mecanismos de adaptação que permitem ao microrganismo resistir aos efeitos nocivos ou letais dos fármacos aos quais estão sendo expostos (Bertoncheli 2008). A resistência pode ser intrínseca ao microrganismo ou adquirida através do compartilhamento dos genes, que dão à bactéria receptora mecanismos que lhe confere resistência ao antimicrobiano (Tenover 2006).

Existem diversos mecanismos que conferem às bactérias resistência aos antimicrobianos, como (Figura 2.6):

- a) enzimas que destroem ou modificam a estrutura química do agente antibacteriano, antes que possa ter efeito;
- b) bombas de efluxo, levando a extrusão do agente antibacteriano;
- c) alteração na estrutura das paredes ou membranas celulares bacterianas, modificando o local de ligação do agente antimicrobiano;
- d) mutações que limitam o acesso de agentes antimicrobianos ao local alvo (Tenover 2006; Blair 2015).

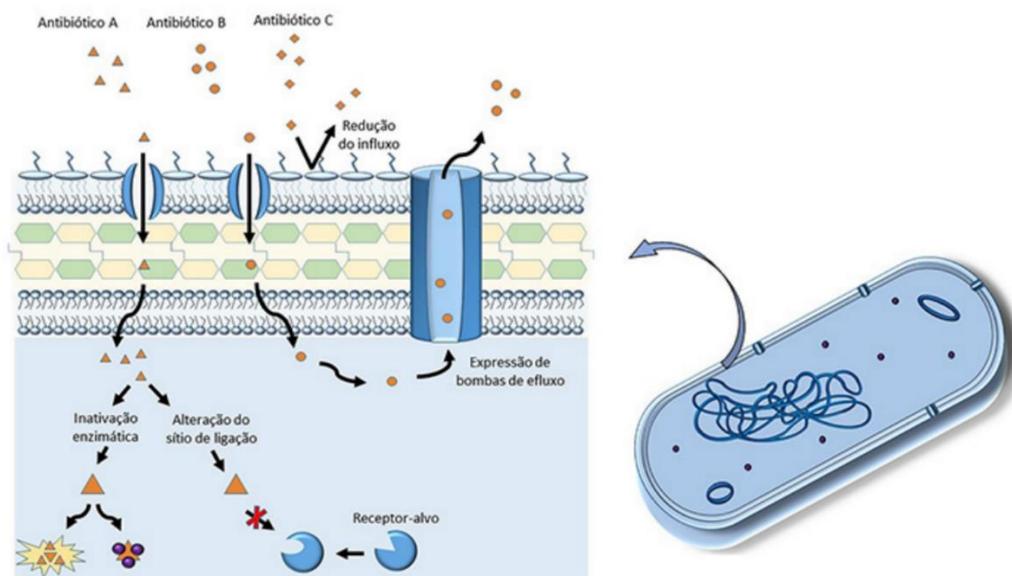


Figura 2.6. Mecanismos de Resistência aos Antimicrobianos (adaptado de Nogueira 2016)

2.4.1. Resistência aos antibióticos β – lactâmicos

As β -lactamases são enzimas produzidas por bactérias que rompem o anel β -lactâmico, inativando o antibiótico β -lactâmico. Algumas β -lactamases são codificadas nos elementos genéticos móveis (plasmídeos); outras são codificadas nos cromossomas (Brian 2020).

Os β -Lactâmicos apresentam um largo espectro de ação, tendo ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. As bactérias Gram-negativas apresentam diversos mecanismos de resistência sendo o mais comum a produção de β -lactamases.

Para que um β -lactâmico seja eficaz, tem de ocorrer ligação aos alvos na membrana celular, estabilidade às β -lactamases e, no caso das bactérias Gram-negativo, permeabilidade da membrana externa. Assim, a resistência surge por alteração de um destes três fatores (Georgopapadakou 1993; Nikaido 2009).

A produção de β -lactamases é o mecanismo de resistência mais encontrado em bactérias Gram-negativas (Philippon et al. 2002); já nas bactérias Gram-positivas o mecanismo mais frequente é o que envolve alteração nas proteínas de ligação à penicilina (Georgopapadakou 1993). A alteração das proteínas de ligação à penicilina (PLPs) origina uma diminuição na sua quantidade ou na afinidade destas proteínas para se ligarem aos β -lactâmicos (Malouin and Bryan 1986; Murray et al. 2005; Drawz 2010).

As diferentes β -lactamases apresentam diferentes alvos de antibióticos. As β -lactamases de espectro estreito são apenas ativas contra Penicilinas, enquanto que as de largo espectro podem ser ativas contra todos os β -lactâmicos (Fernandes et al. 2013).

As Penicilinas e derivados e Cefalosporinas de 1ª e 2ª geração são antibióticos ativos contra um número significativo de bactérias, na ausência de resistência. No entanto, a

resistência das bactérias a estes é bem evidente. São normalmente recomendados como terapia de 1ª linha de algumas infecções. Se ocorrer resistência bacteriana a estas classes é necessário o uso de antibiótico de espectro mais largo. As associações com inibidores das β -lactamases, como por exemplo, o Ácido Clavulânico, têm como objetivo ultrapassar o problema da inativação dos β -lactâmicos por estas enzimas, no entanto nem todas as β -lactamases são inativadas na presença destes inibidores. Estas associações são úteis nos casos de infecções graves por Gram-negativo produtores de β -lactamases, no entanto a resistência a estas associações está a aumentar. Bactérias que são resistentes a estas associações normalmente também são resistentes a Cefalosporinas de largo espectro e aos Carbapenemos (CDC 2013; Goodman 2008).

As Cefalosporinas de largo espectro são utilizadas em casos de infecções graves por bactérias Gram-negativas. O aparecimento de resistências a esta classe começou em meio hospitalar, sendo que nos dias de hoje já se propagou para a comunidade. Quando as bactérias são resistentes a estas, a subclasse dos Carbapenemos é a única opção dentro da classe dos β -Lactâmicos (CDC 2013).

Os Carbapenemos são considerados como terapia de última linha de inúmeras infecções causadas por bactérias Gram-negativas. Se as bactérias forem resistentes a esta subclasse, são resistentes a todas as outras subclasses de β -Lactâmicos (CDC 2013).

2.4.2. Resistência aos Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos são uma classe de antibióticos usada para tratar infecções bacterianas graves, como as causadas por bactérias Gram-negativas (especialmente *Pseudomonas aeruginosa*) (Brian 2020).

Apesar da ação dos aminoglicosídeos se fazer por ligação ao ribossoma, a modificação deste não é o mecanismo de resistência bacteriana mais predominante (Kotra et al. 2000).

A resistência bacteriana a estes antibióticos pode surgir por:

- alteração no local de ligação ribossomal;
- diminuição da captação do antibiótico por parte da bactéria, mecanismo este que aparece principalmente em *Pseudomonas spp.*, provavelmente devido a uma impermeabilização da membrana, afetando todos os aminoglicosídeos e conferindo-lhes uma resistência moderada;
- modificação enzimática do antibiótico, inativando-o (Davies and Wright 1997; Katzung 2007), sendo este o mecanismo de resistência mais comum (Kotra et al. 2000).

A modificação enzimática dos aminoglicosídeos resulta numa modificação química do fármaco, que fica com pouca afinidade para ligação ao ribossoma (Mingeot-Leclercq et al. 1999).

Dependente do tipo de modificações que causam, estes enzimas denominam-se acetiltransferases (ACC), adeniltransferases (ANT) ou fosfotransferases (APH) (Fluit et al. 2001). Em animais, já foi identificado o gene *aacA-aphD* em *S. pseudintermedius* de origem canina, gene esse que confere resistência à canamicina, gentamicina e tobramicina (Kadlec and Schwarz 2012).

2.4.3. Resistência aos antibióticos Tetraciclina

As tetraciclinas a nível terapêutico são principalmente bacteriostáticas e têm um largo espectro de ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas aeróbicas e anaeróbicas, bem como espiroquetas, rickettsiae, micoplasma, clamídiæ e alguns protozoários.

As tetraciclinas são submetidas a uma entrada celular mediada pela difusão que requer energia. Elas ligam-se reversivelmente à região 30S do ribossoma, obstruindo a ligação do transportador de RNA e impedindo a síntese de proteínas.

O mecanismo mais comum da resistência é a capacidade de se diminuir a acumulação do princípio ativo dentro da célula. Esta capacidade pode ser intrínseca (cromossomática) ou pode ser mediada por plasmídeos ou transposons. Os mecanismos de resistência (Figura 2.7B) incluem o efluxo do antibiótico, com redução da sua concentração intracelular conferindo resistência à tetraciclina mas não à minociclina (Chopra et al. 1992; Beceiro 2013). Os genes *tet(K)* e *tet(L)* que conferem este tipo de resistência são tipicamente encontrados em plasmídeos presentes em estafilococos (Gillespie et al. 1987; Allison 2015).

A proteção ribossomal (Figura 2.7C) mediada por proteínas citoplasmáticas é outro mecanismo que confere resistência à tetraciclina, doxiciclina e minociclina. Os genes *tet(M)* e *tet(O)* encontrados em *Staphylococcus spp*, estão associados a este tipo de resistência (Chopra and Roberts 2001).

A inativação enzimática da tetraciclina é um terceiro mecanismo de resistência (Figura 2.7D), estando associado ao mesmo três genes que foram identificados até agora: *tet(X)*, *tet(34)* e *tet(36)* (Roberts 2006).

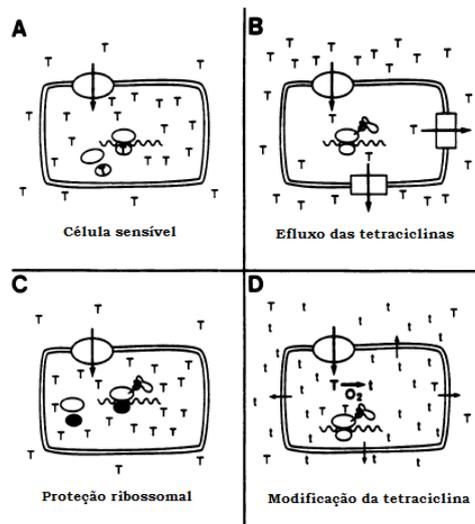


Figura 2.7. As estruturas de resistência às tetraciclina (adaptado de Speer, Shoemaker, Salyers 1992).

A maioria dos genes de resistência estão associados a um dos dois principais mecanismos de resistência nas tetraciclina, a proteção ribossomal e o efluxo do antibiótico (Fluit et al. 2001).

2.4.4. Resistência às Fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas são um grupo de substâncias químicas sintéticas com atividade antimicrobiana, têm uma extensa aplicação tanto na medicina humana como também na medicina veterinária. Este grupo sintético apresenta um maior espectro de ação e uma melhor capacidade de penetração das quinolonas na parede bacteriana. Devido às melhorias do seu perfil farmacocinético atingiu uma atividade antibacteriana 1.000 vezes superior à observada pelo ácido nalidíxico (Sousa 2007). Este grupo é assim considerado uma importante arma no combate a microrganismos Gram-negativos, Gram-positivos sendo que as últimas gerações chegam a ser ativas contra bactérias anaeróbias.

Este grupo apresenta com boa disponibilidade oral, melhor difusão nos tecidos com uma meia vida maior e uma menor toxicidade comparando com os outros tipos de antibióticos.

O comportamento das quinolonas *in vivo* e *in vitro* é influenciado pelas suas propriedades físico-químicas que determinam especialmente as suas propriedades ácido/base, a capacidade para complexar iões metálicos, assim como o seu caráter hidro/lipofílico (Park 2002; Mérens 2010). A atividade antimicrobiana das quinolonas atua por inibição da DNA girase (enzima alvo destes fármacos) processo que depende principalmente do pH do meio em que se encontram e da concentração do ácido (Sarkozy 2001; Bolon 2011).

Os mecanismos de resistência desenvolvidos pelas bactérias à ação antibacteriana das quinolonas ocorrem por i) alterações nas moléculas alvo devido às enzimas DNA girase

e topoisomerase IV; ii) alterações da acumulação intracelular dos antibióticos, por diminuição da permeabilidade da membrana externa ao fármaco, porque as proteínas membranares (porinas) sofreram alterações que afetam a sua expressão ou pela estimulação dos sistemas de efluxo celular que por transporte ativo levam à expulsão do fármaco da célula (Van Bambeke et al. 2005; Mérens 2010).

2.4.5. Resistência à Mupirocina

A mupirocina é um antibiótico que trata infecções bacterianas da pele como o impetigo, causado por estafilococos presentes quer no nariz quer na pele. O medicamento funciona bloqueando a produção de proteínas necessárias para a multiplicação das bactérias.

O mecanismo de ação exclusivo da mupirocina inibe a isoleucina-tARN sintetase, o que previne e elimina a resistência cruzada com antibióticos de outros grupos (Sutherland et al. 1985; Munita 2016). Há dois fenótipos diferentes: um de baixo nível de resistência devido a mutações na enzima isoleucina-tARN sintetase (Cookson 1998), e outro de alto nível de resistência causado pela presença de uma isoleucina-tARN menos sensível codificada pelo gene *mupA* presente em plasmídeos (Fluit et al. 2001).

S. pseudintermedius exibe uma resistência muito pouco frequente à droga (Kadlec and Schwarz 2012). As primeiras resistências foram encontradas em *S. aureus* no final da década de 1980; um alto nível de resistência foi associado à presença do gene da *mupA* (Ramsey et al. 1996; Munita 2016), contudo segundo um estudo de Fujimura et al. (2001) nem sempre a presença do gene aumenta a capacidade das estirpes de *S. aureus* se tornarem resistentes ao antibiótico.

2.4.6. Resistência aos Glicopeptídeos

No grupo dos Glicopeptídeos temos como principais representantes – a vancomicina, teicoplanina e ramoplanina. Contudo ainda temos vários glicopeptídeos que ainda não estão disponíveis no mercado nacional porque ainda estão em fase de investigação clínica.

No combate de infecções por estafilococos multirresistentes em Medicina Humana, a vancomicina e a teicoplanina são considerados os antibióticos de último recurso, por isso não foram aprovados para uso em Medicina Veterinária. Outros glicopéptidos, como a avoparcina, foram usados como promotores de crescimento em animais de produção pelo que estes animais podem ser considerados uma potencial fonte de microrganismos resistentes aos glicopéptidos (Kirst et al. 1998; Dzidic et al. 2008).

Os Glicopeptídeos exibem um mecanismo de ação múltiplo: inibem a síntese do peptideoglicano, alteram a permeabilidade da membrana citoplasmática e interferem na síntese de RNA citoplasmático. Desta forma, inibem a síntese da parede celular bacteriana. Os enterococos desenvolveram resistência aos glicopeptídeos, particularmente à

vancomicina, devido a alterações genéticas na bactéria (gene *vanA*) que diminuíram o tropismo de antibiótico pelo microrganismo.

O mecanismo de resistência à vancomicina nos estafilococos até hoje não foi completamente esclarecido mas sugere-se que possa estar relacionado com o espessamento da parede celular bacteriana (resistência intermedia). A aquisição do gene *vanA* de um enterococcus resistente à vancomicina (totalmente resistente) pode estar na origem da resistência observada nos estafilococos. A expressão fenotípica *vanA* é a mais encontrada em estirpes com elevada resistência tanto à vancomicina como à teicoplanina. Das bactérias com o gene *vanA* conseguem produzir uma ligase D-ala-D-ala diferente, com consequente alteração da cadeia lateral do peptidoglicano, e menor afinidade para este grupo de antibióticos (Fluit et al. 2001; Wright 2003). Os fenótipos *vanC*, *vanE* e *vanD* (Perichon et al. 1997) são também descritos por vários autores mas menos frequentes (Perichon et al. 1997; Fines et al. 1999).

2.4.7. Resistência às Oxazolidinonas

A linezolida representa o único membro comercializado dessa nova classe de antimicrobianos sintéticos conhecidos como oxazolidinonas. Possui excelente atividade contra cocos Gram-positivos e não apresenta atividade contra bactérias Gram-negativas.

As oxazolidinonas incluem os seguintes princípios ativos: Linezolida, Tedizolida. As oxazolidinonas atuam por inibição da síntese protéica evitando que as bactérias produzam as proteínas de que precisam para se multiplicarem (Dzidic et al. 2008).

Assim, não ocorrem resistências cruzadas com macrolídeos, estreptograminas ou mesmo aminoglicosídeos.

A emergência de resistência, embora rara, foi documentada, sendo atribuída ao mecanismo de mutação no gene 23SrRNA, devido à pressão seletiva (Rice et al. 2005).

2.4.8 Resistência aos Macrolídeos

Os macrolídeos são uma classe de antibióticos usados no tratamento de infecções que ocorram em pessoas alérgicas às penicilinas. Os macrolídeos são antimicrobianos compostos por um anel macrocíclico de lactona, ao qual se ligam um ou mais açúcares. A Azitromicina, Claritromicina, Eritromicina e Fidaxomicina fazem parte dos macrolídeos. Em 1952 a eritromicina foi isolada de *Streptomyces erythraeus*. Este princípio ativo possui um largo espectro de ação que inclui, além de treponemas, micoplasma e clamídias, as bactérias Gram-positivas. Contudo revela-se ineficaz contra *Pseudomonas spp* e enterobactérias.

A atividade da claritromicina contra as bactérias Gram-negativas é semelhante à observada para a eritromicina, embora um pouco mais ativa contra a *Moraxella catarrhalis*. A Claritromicina é contudo altamente ativa contra bactérias Gram-positivas, sendo por vezes

mais ativa do que a eritromicina contra a maioria dos estreptococos e estafilococos sensíveis à oxacilina. A sua atividade contra anaeróbios é muito modesta e semelhante à eritromicina (Anvisa 2007).

A estrutura química da Azitromicina é diferente da eritromicina porque no anel de lactona contém um átomo de nitrogênio. Alguns autores classificam-na como um novo grupo de antimicrobianos, denominado de azalídeos. Este rearranjo aumentou o espectro de atividade do princípio ativo, com diminuição da dose durante o tratamento porque garante um nível tecidual superior ao nível sérico e proporciona uma meia-vida prolongada.

A azitromicina tem uma maior atividade contra as bactérias Gram-negativas, em particular *Haemophilus influenzae*, pelo que difere substancialmente da eritromicina e da claritromicina. Entretanto, a maioria das enterobactérias são intrinsecamente resistentes, porque não conseguem efetivamente penetrar na membrana externa (Anvisa 2007).

A ação antimicrobiana ocorre por inibição da síntese protéica dependente de RNA, através da ligação em receptores localizados na porção 50S do ribossoma, particularmente na molécula 23S do RNA, impedindo as reações de transpeptidação e translocação (Opal 35 2015; Griffith 2019).

A resistência pode surgir devido a diminuição da permeabilidade da membrana celular ao princípio ativo, alteração no sítio receptor da porção 50S do ribossoma e inativação enzimática (Miljkovic-Selimovic et al. 2007).

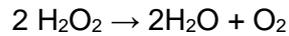
2.5. Identificação dos *Staphylococcus* coagulase-negativos

O teste da catalase é utilizado na identificação da família Staphylococaceae. O género *Staphylococcus* apresenta 49 espécies, 26 subespécies. Apenas 15 espécies de estafilococos são encontradas em amostras humanas, e de forma prática, são divididos em duas categorias: coagulase positivos e coagulase negativos de acordo com a resposta ao teste de coagulase de plasma sanguíneo.

Os *Staphylococcus* coagulase negativos conhecidos incluem cerca de 31 espécies, das quais as mais frequentes são:

- *Staphylococcus epidermidis* (causador de infecções por cateteres e próteses) frequentemente encontrado em hemoculturas;
- *Staphylococcus saprophyticus* – causa frequente de infecção urinária em jovens mulheres;
- *Staphylococcus haemolyticus* – que apresenta resistência elevada aos antimicrobianos, e frequentemente é confundido com o *S. aureus*, pois faz hemólise na placa de ágar sangue de carneiro.

O teste da catalase é usado para detectar a presença da enzima catalase pela decomposição do peróxido de hidrogênio com libertação de oxigênio e água, conforme a seguinte reação:



A reação da catalase é evidenciada pela rápida formação de bolhas. O peróxido de hidrogênio é formado por algumas bactérias como um produto oxidativo final da decomposição aeróbia dos açúcares. Se acumular, é altamente tóxico para as bactérias e pode resultar na morte celular. A catalase decompõe o peróxido de hidrogênio ou oxida substratos secundários, mas não tem efeito sobre outros peróxidos (Public Health England 2019; MacFaddin 2000).

A forma mais simples de identificar *Staphylococcus* é a prova da coagulase que pode ser efetuada em tubo ou em lâmina. Este teste detecta a capacidade das bactérias de coagular o plasma pela ação da enzima coagulase. Este teste é usado especificamente para diferenciar as espécies dentro do género *Staphylococcus*. Existem muitas hipóteses, mas o mecanismo preciso da ação da coagulase não é conhecido (Public Health England 2019; MacFaddin 2000).

O *Staphylococcus* fermenta o manitol com concentração de 7,5% de cloreto de sódio num meio, denominado ágar manitol com cloreto de sódio ou Meio de Chapman. O vermelho de fenol é o indicador de pH, adicionado ao meio e indica uma reação positiva quando se torna amarelo à volta das colônias, e reacção negativa quando permanece avermelhado. A formação de halo amarelo ao redor das colônias, identifica que as espécies fermentadoras são rápidas. O meio permanece inalterado ao redor das colônias, identifica que as espécies fermentadoras são lentas.

O teste da resistência a Novobiocina é uma das provas realizadas para identificar *Staphylococcus* coagulase negativos.

A suspensão de uma estirpe de *Staphylococcus* é semeada com auxílio de uma zaragatoa numa placa de Muller Hinton onde se deposita um disco teste de novobiocina contendo 5 µg. As estirpes resistentes mostram zonas de inibição de 6 a 12 mm, enquanto as susceptíveis apresentam halos de 16 mm ou mais. As estirpes de *Staphylococcus saprophyticus* são resistentes à novobiocina.

O teste da DNase permite identificar *S. aureus*. O teste da DNase consiste na inoculação de colônias em meio contendo DNA (DNase test agar) obtido comercialmente.

Ao meio original adiciona-se azul de ortotoluidina na concentração de 0,1%, o meio adquire uma coloração azul intensa. Seque-se a incubação a 35°C por 24 horas. Uma coloração rósea característica ao redor das colônias produtoras de DNase indica que a prova é positiva (Anvisa 2013).

O meio adicionado com corante demonstra uma melhor facilidade na leitura, e permite repicar a amostra positiva para o teste de sensibilidade aos antimicrobianos, evitando que se volte à placa original onde nem sempre as colônias estão bem isoladas. A formação de halo cor-de-rosa, identifica *Staphylococcus aureus*. Uma colônia sem formação de halo cor-de-rosa é característica de *Staphylococcus* coagulase negativos (Agda do Carmo 2010).

A realização do teste da DNase com HCl 1N permite verificar se o microrganismo possui a enzima desoxiribonuclease, a qual degrada o ácido nucléico (DNA). O procedimento consiste em fazer um inóculo denso numa pequena parte do meio de cultura; incubar a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18-24h. A placa pode ser inoculada com vários isolados; decorrido o período de incubação, no momento da leitura coloca-se o HCl 1N de modo que cubra as colônias, aguardando-se 30 segundos.

Devemos assistir à formação de um halo transparente ao redor da colônia. A formação de um halo transparente, identifica *Staphylococcus aureus*. A ausência de formação de halo transparente, identifica *Staphylococcus* coagulase negativos (Agda do Carmo 2010).

A metodologia inicialmente mais utilizada para identificação das espécies de SCN corresponde ao esquema de Kloos e Schleifer (1994) modificado por Bannerman (2003). É uma metodologia trabalhosa devido às várias provas bioquímicas necessárias para a sua realização o que dificultou a sua implementação em laboratórios de rotina.

A identificação de *Staphylococcus* pode ser feita através de características fenotípicas como a pigmentação da colônia, produção de coagulase, fator «clumping», termonuclease, actividade de fosfatase, actividade de pirrolidonil arilamidase (PYR), ornitina decarboxilase, produção de urease, β -galactosidase, produção de acetoina, resistência a novobiocina, resistência a polimixina B, produção de ácido a partir de uma variedade de carboidratos, tais como trealose, manitol, manose, turanose, xilose, celobiose, maltose e sacarose (Bannerman 2003).

Esta metodologia de Bannerman (2003), foi modificada por d'Azevedo e colaboradores (Caierão et al. 2004), através das seguintes provas convencionais: catalase, teste da coagulase livre e ligada, pirrolidonil arilamidase (PYR), resistência a bacitracina, novobiocina, polimixina B, ureasa, manitol, manose, maltose, sacarose, celobiose, lactose, xilose, dentre outros.

A identificação dos *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) é de grande importância para a associação de espécies com infecções específicas, tendo em vista que alguns SCN além de *S. epidermidis* e *S. saprophyticus*, têm apresentado virulência e resistência intrínseca a diferentes antimicrobianos, como o *S. haemolyticus*, *S. lugdunensis* e o *S. schleiferi* (Arché et al.1995). A interpretação do halo de inibição da oxacilina para *S. epidermidis* é diferente das outras espécies segundo recomendações da CLSI (2006).

Em comparação com o grupo dos *Staphylococcus* coagulase-positivos, a identificação dos SCNs requer um grande número de provas bioquímicas, utilizadas em esquemas de identificação convencionais ou simplificados (Cunha et al. 2004; Devriese et al. 1985; Kloos and Schleifer 1975). Apesar do desempenho razoável destes protocolos, a sua utilização em laboratórios de rotina não é habitual devido a todo o trabalho associado (De Vlieghe et al. 2012).

Foram desenvolvidos kits comerciais que possibilitam uma identificação mais rápida das espécies deste grupo como o API Staph ID (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França) e o Staph-Zym (Rosco, Taastrup, Dinamarca). Esses sistemas combinam algumas provas bioquímicas e são relativamente eficientes na identificação de isolados humanos. Apesar do terem um custo elevado a sua aplicação em laboratórios hospitalares, tem como atrativo a rapidez da obtenção dos resultados.

STAPH-IDENT é uma tira de testes bioquímicos miniaturizada que incorpora quatro substratos cromogênicos sintéticos, uréia, arginina e quatro carboidratos e requer apenas um período de 5 horas. Ainda assim, limitações na sua precisão são frequentemente relatadas, principalmente com isolados que não sejam *S. epidermidis* (Cunha et al. 2004; Renneberg et al. 1995; Bannerman et al. 1993).

Um estudo comparativo de identificação pelo API Staph ID, de estirpes de referência e de isolados clínicos humanos, com a sequenciação dos genes *tuf*, 16S rRNA e *sodA*, observou-se que este sistema comercial alcançou uma identificação correta para 85% (40/47) dos isolados (Heikens et al. 2005).

A identificação por kits bioquímicos miniaturizados parece ser problemática quando obtidas de amostras animais para as espécies *S. chromogenes*, *S. haemolyticus*, *S. simulans*, *S. warneri* e *S. epidermidis* (Park et al. 2011; Sampimon et al. 2009). Esta dificuldade advém do fato dos sistemas terem sido desenvolvidos para amostras clínicas humanas. Assim, estes resultados não são surpreendentes, já que a composição das populações de SCNs provenientes de ruminantes é bastante distinta (Piessens 2011a). Muitos métodos moleculares foram desenvolvidos para a identificação dos *Staphylococcus* coagulase-negativos numa tentativa de superar os problemas associados à identificação fenotípica.

Em estudos filogenéticos, a sequenciação de genes housekeeping, por exemplo, é bastante utilizada para definir novas espécies e a distância genética entre elas (Ghebremedhin et al. 2008; Takahashi et al. 1999).

A ribotipagem pode ser automatizada e apresenta uma boa discriminação das espécies de *Staphylococcus* (Taponen et al. 2008; Van Belkum et al. 2007), sendo um método em que a restrição do genoma é seguida da hibridização com sondas complementares ao DNA ribossomal.

Para a especiação de *Staphylococcus* coagulase-negativos, isolados de amostras animais, foi sugerido o método PCR-RFLP com utilização de alguns genes como alvos tais como, 16s rRNA, *rrs*, *femA*, *gap*, *rpoB*, *tuf*, *sodA*, *dnaJ*, *hsp60*, entre outros (Onni et al. 2010; Hauschild e Stepanovic 2008). A técnica de PCR-RFLP compara perfis de fragmentos de DNA, obtidos a partir da ação de enzimas de restrição sobre os produtos da amplificação (amplicons) do gene alvo. Por eletroforese em gel os fragmentos são separados com base no seu tamanho molecular, dando origem a perfis (com um número limitado de fragmentos que possuem grande especificidade) característicos para cada espécie. Este método é rápido, reprodutível, de fácil execução e custo relativamente baixo, contudo, em alguns casos as limitações do seu poder discriminatório podem levar a falhas na diferenciação de espécies relacionadas intimamente (Onni et al. 2012; Park et al. 2011).

Os sistemas de identificação automatizados estão disponíveis e têm sido usados nos últimos 20 anos para identificar o SCN. Sistemas como o VITEK 2 (bioMérieux, Marcy l'etoile, França) e o BD Phoenix Automated Microbiology System (BD Diagnostics, Sparks, MD) foram avaliados quanto à sua capacidade de identificar essas bactérias quer para as espécies quer subespécies. Estes sistemas automatizados de identificação e suscetibilidade são prejudicados pela capacidade do organismo de expressar atividade metabólica e características morfológicas específicas (Delmas 2008; Layer 2006).

A abordagem padrão para detecção e identificação inclui a cultura em uma placa de agar sangue não seletivo, bem como em caldo de enriquecimento, seguido por procedimentos bioquímicos e outros relacionados, incluindo o uso de sistemas comerciais para fins de identificação. Hoje, as abordagens de identificação bioquímica estão a ser substituídas pela aplicação da promissora técnica de análise proteômica Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS, Espectrometria de Massa por Tempo de Vôo de Ionização/Desorção por Laser Assistida por Matriz) (Becker 2011). Esta técnica utilizada na identificação microbiológica, destaca-se pela velocidade de obtenção dos resultados, baixo custo, quantidade mínima de amostra exigida e baixos níveis de resíduos químicos e biológicos gerados (Salgado 2012; Carbonnelle et al. 2011; Alatoon et al. 2011).

III. Trabalho experimental: Avaliação da resistência a antibióticos de *Staphylococcus* coagulase negativos isolados na cadeia de processamento de carne de suíno.

Objetivos e justificação

Este trabalho teve como principais objetivos: 1) contribuir para a caracterização genotípica das espécies de *Staphylococcus* isolados na cadeia de processamento de carne suína na linha abate, desmancha e carne que foi entregue a famílias de consumidores; 2) determinar as caracterizações fenotípicas de *Staphylococcus* coagulase negativos, nomeadamente a sua sensibilidade a antibióticos; 3) avaliar uma potencial relação entre os isolados das várias fontes e a sua resistência a antibióticos testados.

Materiais e métodos

3.1. Coleção de Isolados

Neste estudo avaliou-se a diversidade genética e a suscetibilidade a antibióticos de uma coleção de isolados (n=145) de *Staphylococcus* provenientes de diferentes amostras (Tabela 3.1) recolhidas através de zaragatoas em suínos e ambientais (superfícies de equipamentos e mãos de trabalhadores, antes e após higienização) recolhidas por zaragatoa na linha abate (etapa de sangria), na desmancha (mesas e tapetes de transporte), de peças de carne (pá e entremeada) e carne entregue a famílias (crua e cozinhada) e ainda das mãos de consumidores (antes, após lavagem e após a preparação culinária).

A recolha de amostra de superfícies das peças e das mãos dos operários foi realizada numa área de pelo menos 400cm², enquanto nas superfícies de mesas e tapetes realizou-se a colheita de 1000cm². Após preparação das diferentes amostras e sua diluição seriada efetuou-se a inoculação em Manitol salt agar (MSA, Scharlau, S.I., Espanha) com incubação a 37°C durante 24-48h, realizando-se posteriormente quando possível o isolamento de 10 colónias características (amarelas ou rosadas) para constituição da coleção em estudo.

Tabela 3.1. Descrição da origem e recolha dos isolados em estudo.

Produto/Superfície	Fase de Fabrico	Número de isolados
Pavilhão auricular (n=10)	Suínos	10
Mãos sujas dos operários (n=1)	Zona sangria	5
Mãos limpas dos operários (n=1)	Zona sangria	5
Mãos sujas dos operários (n=3)	Sala desmancha	5
Mãos limpas dos operários (n=3)	Sala desmancha	5
Aparas de carne (n=3)	Sala desmancha	10
Pá (n=5)	Sala desmancha	10

Entremeada (n=5)	Sala desmancha	10
Mesa suja (n=1)	Sala desmancha	5
Mesa limpa (n=1)	Sala desmancha	5
Tapete sujo (n=1)	Sala desmancha	5
Tapete limpo (n=1)	Sala desmancha	5
Carne crua (n=10)	Consumidores - Famílias	15
Carne cozinhada (n=10)	Consumidores - Famílias	15
Mãos de consumidores antes do início de trabalho (n=10)	Consumidores - Famílias	15
Mãos de consumidores após lavagem (n=10)	Consumidores - Famílias	15
Mãos de consumidores após preparar a carne (n=10)	Consumidores - Famílias	5

3.2. Armazenamento

Os isolados da colecção em estudo encontravam-se armazenados a -80°C em criotubos, contendo caldo de Brain Heart Infusion (BHI, Scharlau, S.L., Espanha) suplementado com 15% de Glicerol (Merck, Alemanha).

3.3. Cultivo dos isolados para caracterização morfológica e posterior processo de extração de DNA

Os isolados da colecção em estudo para serem caracterizados foram revivificados, para tal foi efetuada sementeira em caldo de Brain Heart Infusion (BHI Broth, Scharlau S.L., Espanha) com incubação a 37°C de acordo com as condições ótimas de multiplicação dos microrganismos, esta operação foi realizada duas vezes consecutivas. Posteriormente, os isolados do género *Staphylococcus* foram semeados em placas com meio Manitol Salt Agar (MSA, Scharlau, S.L., Espanha) suplementado com gema de ovo (Oxoid, Inglaterra) e incubados a 37°C , durante 24 horas em aerobiose. Procedeu-se à observação e caracterização das colónias, nomeadamente em relação ao seu tamanho e coloração decorrente da velocidade de fermentação do manitol presente no meio.

3.4. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada de acordo com o método do Chelex 100 (adaptado de Talon et al. 2007). Recolheu-se 2 a 3 ansas de cultura em placa e suspendeu-se a cultura em 1mL de TE (1x) num eppendorf de 1,5 mL. Preparou-se uma solução Chelex 100 a 6% (3 g de Chelex 100 para 50 mL de água Mlq esterilizada). Centrifugou-se (Centrifuge 5415R, eppendorf AG, Alemanha) o tubo de 1,5 mL com cultura durante 5 minutos a 12000 rpm e

colocou-se em gelo. Depois descartou-se o sobrenadante cuidadosamente. Ressuspendeu-se o pellet em 300 µL de solução Chelex 6% (com a solução em agitação) e agitou-se no vórtex em alta velocidade durante 10-15 segundos.

Colocou-se o tubo em banho a 100°C utilizando-se um banho seco durante 8 minutos (fixaram-se previamente as tampas dos tubos em clamps) e depois arrefeceu-se imediatamente em gelo (durante dois minutos para atingir aproximadamente 56°C), levou-se os tubos ao vórtex a alta velocidade durante 10 segundos. Centrifugou-se o tubo mais uma vez durante 5 minutos a 12000 rpm a 4°C. Após centrifugação, transferiu-se 50-80 µL do sobrenadante para um novo eppendorf de 1,5 mL sem Chelex. Conservou-se as amostras congeladas a aproximadamente -20°C até utilização. Avaliou-se a pureza e a concentração (ng/µL) de DNA obtido no NanoDrop One^C Espectrofotômetro UV-Vis de Microvolume (Thermo ScientificTM, Estados Unidos).

3.5. Tipificação Genómica por PCR *Fingerprinting*

A tipificação genómica dos isolados em estudo efetuou-se utilizando o método PCR *Fingerprinting* que teve como base a descrição feita por Versalovic, Schneider, Bruijn, Lupski (1994). Esta reação realizou-se para todos os isolados deste estudo. Foram utilizados como primers de repetição, com a capacidade de hibridar (annealing) em várias zonas, o (GTG)₅ e o OPC₁₉ (STAB Vida, Portugal) descritos na Tabela 3.2 em reações individuais, permitindo pela análise do perfil obtido ter uma ideia aproximada de como os isolados se relacionam entre si. Quanto maior for a semelhança do perfil de DNA dos isolados, maior é a probabilidade de estes se relacionarem.

A reação foi realizada num volume total de 24 µl, tendo-se utilizado PE-buffer 1x, KCL 50mM, Tris-HCl 10mM, MgCL₂ 3mM, dNTP 800µM, os primers indicados para cada reação numa concentração de 2µM e por fim a Taq polimerase 0,2U (Nzytech, Portugal). Nas reações de PCR foram utilizadas 5 µL da amostra de DNA.

Tabela 3.2. Primers utilizados na reação PCR *Fingerprinting* (Versalovic 1994)

Denominação do primer	Sequência do primer
OPC19	5' GTT GCC AGC C 3'
(GTG) ₅	5' GTG GTG GTG GTG GTG 3'

Foi preparado como controlo negativo um tubo em que o DNA foi substituído por água miliQ, como controlo positivo utilizaram-se as estirpes *Staphylococcus simulans* DSMZ 20323 e *Staphylococcus xylosus* ATCC 8166.

A amplificação de DNA foi efetuada no termociclador VWR (Bélgica), seguindo os seguintes parâmetros: desnaturação inicial a 95°C durante 5 min, 40 ciclos de 1 min a 95°C

(desnatura o), 2 min a 40 C (annealing) e 2 min a 72 C (extens o); a finaliza o foi realizada a 72 C durante 10 min e o armazenamento a 4 C.

A revela o dos produtos de PCR foi realizada atrav s da t cnica de eletroforese, tendo-se utilizando 10  l de produto de PCR, ao qual foi previamente adicionado 2  l de Azul de Bromofenol (6x) (USB Corporation, USA) e 2  L de Gel Red (20x) (Nucleic Staining Acid Solution, iNtRON Biotechnology, Coreia) colocado em gel de agarose (SeaKem LE Agarose, Lonza, USA) a 1,5% com TBE 1X. Utilizou-se 5  l do marcador NZYDNA Ladder III (Nzytech, Portugal) DNA molecular 100 pb.

A corrida de eletroforese decorreu em TBE 1X a uma voltagem constante de 90V durante 1h 35min, numa tina especifica (VWR, USA), em seguida os g is foram observados e fotografados num transiluminador de ChemiDoc™ XRS+ (Image Lab™, Software, Bio Rad).

3.6. Identifica o gen tica de esp cies

A identifica o de g nero *Staphylococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus xylosus*, baseou-se no m todo PCR multiplex descrito por Morot-Bizot, Talon e Leroy (2004).

Na reac o PCR multiplex foram utilizados os primers (Stab Vida, Lda FCT/UNL) que amplificam os fragmentos de diferentes tamanhos tal como se resume na Tabela 3.3. A reac o foi realizada num volume total de 25  l, tendo-se utilizado PE-buffer 1x, KCL 50mM, Tris-HCl 10mM, MgCL₂ 3mM, dNTP 800 M, BSE 10 g, os primers indicados para cada reac o numa concentra o de 0,5 M e por fim a Taq polimerase 0,2U (Nzytech, Portugal). Estes primers foram seleccionados tendo em conta a compatibilidade termodin mica e a produ o de bandas de PCR electroforeticamente distintas, em tamanho (Morot-Bizot et al. 2004).

As condi es operat rias de amplifica o no termociclador VWR (B lgica) foram as seguintes: tr s minutos a 94 C (pr  aquecimento), um segundo a 95 C, trinta segundos a 55 C, trinta segundos a 72 C completando 40 ciclos seguindo-se um ciclo de termina o a 72 C tr s minutos.

Tabela 3.3. Primers utilizados na reac o PCR multiplex *Staphylococcus* g nero e dimens o dos produtos de amplifica o (Morot-Bizot 2004)

Espécie	Primers	Sequência	Valor (pb)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Sa 442 – 1 Sa 442	5' AAT CTT TGT CGG TAC ACG ATA TTC TTC ACG 3' 5' CGT AAT GAG ATT TCA GTA GAT AAT ACA ACA 3'	108 pb
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Se 705 – 1 Se 705	5' ATC AAA AAG TTG GCG AAC CTT TTC A 3' 5' CAA AAG AGC GCG GAG AAA AGT ATC A 3'	124 pb
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Sap 1 Sap 2	5' TCA AAA AGT TTT CTA AAA AAT TTA C 3' 5'ACG GGC GTC CAC AAA ATC AAT AGG A 3'	221 pb

<i>Staphylococcus</i> <i>spp.</i>	Tstag 765 Tstag G 422	5' TTA CCA TTT CAG TAC CTT CTG GTA A 3' 5' GGC CGT GTT GAA CGT GGT CAA ATC A 3'	370 pb
<i>Staphylococcus</i> <i>xylosus</i>	Xyl – f Xyl – r	5' AAC GCG CAA CGT GAT AAA ATT AAT G 3' 5' AAC GCG CAA CAG CAA TTA CG 3'	539 pb

Foram utilizadas as seguintes estirpes como controlo positivo: *Staphylococcus epidermidis* ATCC RP62A, *Staphylococcus saprophyticus* DSMZ 18669, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus xylosus* ATCC 8166. Como controlo negativo foi utilizada a água MiliQ adicionada ao volume da Mastermix. Para revelação dos produtos PCR amplificados foi realizada eletroforese.

Analisou-se 5 microlitros do produto PCR amplificado que foram colocados em gel de agarose cloning grade (Nzytech, Portugal) a 1,5% em TBE 1X. Juntou-se 2 microlitros de loading buffer bromofenol e 2 microlitros Gel red (concentração 1 µl + 100 µl TBE 1x), aplicando-se uma voltagem de 90V durante 1h 35min, após o que foi visualizado por transluminação em transiluminador de ChemiDoc™ XRS+ (Image Lab™, Software, Bio Rad). Utilizou-se 5 µl do marcador NZYDNA Ladder VI (Nzytech, Portugal) DNA molecular 100 pb.

3.6.1. Identificação de *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus equorum* e *Staphylococcus simulans*.

A identificação de *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus equorum* e *Staphylococcus simulans* por PCR foi efectuada de acordo com a metodologia descrita por Blaiotta, Casaburi, Villani (2005, 2004).

Na reacção PCR foram utilizados os primers (Stab Vida, Lda FCT/UNL) que amplificam os fragmentos de diferentes tamanhos tal como se resume na Tabela 3.4. Os reagentes da reacção PCR num volume de 24µL para identificação de *Staphylococcus carnosus* ou *Staphylococcus simulans* ou *Staphylococcus equorum* foram PE-buffer 1x, KCL 50mM, Tris-HCl 10mM, MgCL₂ 3mM, dNTP 800µM, os primers indicados para cada reacção numa concentração de 0,5µM e por fim a Taq polimerase 0,2U (Nzytech, Portugal).

Tabela 3.4. Primers utilizados na reacção PCR para identificação *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus equorum* e dimensão dos produtos de amplificação (Blaiotta 2005)

Espécie	Primers	Sequência	Valor (pb)
<i>Staphylococcus equorum</i>	SdAEq-f SdAEq-r	5'– GTG GAG GAC ACT TAA ACC ATT C – 3' 5'– CAA TTT ACC ATC GTT TAC AAC TAG – 3'	193 pb
<i>Staphylococcus carnosus</i>	Car - f Car - r	5' – CTTCTAACACCTAATTCTGAAGA – 3' 5' – GATTGGATTGTCTTGGTTAGGA – 3'	195 pb

<i>Staphylococcus simulans</i>	Sim - f	5'– ATCCTTTACC-TAACTCTGAAGAG – 3'	197 pb
	Sim - r	5'– GTAATTGGGTTGTCTTGGTTT GCT – 3'	

As condições operatórias de amplificação no termociclador VWR (Bélgica) foram apresentados no Tabela 3.5.

Tabela 3.5. As condições operatórias de amplificação no termociclador para identificação *Staphylococcus carnosus*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus equorum* (Blaiotta 2005)

Staphylococcus	Condições operatórias de amplificação no termociclador
<i>Staphylococcus simulans</i>	Três minutos a 95°C (pré aquecimento), cinco segundos a 95°C, trinta segundos a 66°C, trinta segundos a 72°C num total de 30 ciclos e uma finalização a 72°C durante três minutos.
<i>Staphylococcus carnosus</i>	Três minutos a 95°C (pré aquecimento), cinco segundos a 95°C, trinta segundos a 60°C, trinta segundos a 72°C durante 30 ciclos e finalização a 72°C durante três minutos.
<i>Staphylococcus equorum</i>	Três minutos a 95°C, cinco segundos a 95°C, vinte e cinco segundos a 61°C, trinta segundos a 72°C em 30 ciclos com finalização a 72°C durante três minutos.

Como controlo positivo foi utilizado a estirpe *Staphylococcus simulans* DSMZ 20323, *Staphylococcus carnosus* DSMZ 4600 e *Staphylococcus equorum* DSMZ 20029. Como controlo negativo foi utilizada a água MiliQ, 1 µl adicionada ao volume da Mastermix.

Analisou-se 5 microlitros do produto PCR amplificado que foram colocados em gel de agarose clonagem grade (Nzytech, Portugal) a 1,5% em TBE 1X. Juntou-se 2 microlitros de loading buffer bromofenol e 2 microlitros Gel red (concentração 1 µl + 100 µl TBE 1x), aplicando-se uma voltagem de 90V durante 1h 35min, após o que foi visualizado por transluminação ChemiDoc™ XRS+ (Image Lab™, Software, Bio Rad). Utilizou-se 5 µl do marcador NZYDNA Ladder VI (Nzytech, Portugal) DNA molecular 100 pb.

3.7. Teste de sensibilidade aos antibióticos

A sensibilidade aos antibióticos do *Staphylococcus* foi determinada usando o método de difusão em disco descrito por EUCAST (EUCAST 2022). Para tal, transferiu-se 4 a 6 colónias de cada um dos isolados cultivados em MSA, para o meio Triptona Soja Agar (TSA, Scharlau S.L, Espanha) e incubou-se a 37°C durante 24 horas. Uma colónia do isolado em estudo foi suspensa em 5 ml de cloreto de sódio 0,9%, com o auxílio de uma ansa até obter uma concentração equivalente a 0,5 na escala MacFarland. Depois da homogeneização da suspensão (através da Vortex), a zaragatoa de algodão serviu para semear o inóculo numa

placa de agar com Muller-Hinton Agar (Scharlau S.L, Espanha), procedendo-se depois à colocação dos discos de antibiótico (8 por placa).

Os discos de antibióticos (Liofilchem, Italy) usados foram os seguintes: Penicilina G (10 µg), Clindamicina (2µg), Rifampicina (5µg), Oxacilina (1µg), Cefoxitina (30µg), Teicoplanina (30µg), Trimetoprim/Sulfametoxazol (25µg), Ciprofloxacina (5µg), Gentamicina (10µg), Eritromicina (15µg), Tetraciclina (30µg), Cloranfenicol (30µg), Quinupristina/Dalfopristina (15µg), Fosfomicina (200µg), Linezolid (10µg), ácido Fusídico (10µg).

Os discos dos antibióticos foram colocados na superfície do agar com uma pinça estéril, seguida de ligeira pressão por forma a assegurar contacto uniforme com a superfície de agar e evitar descolamento durante a incubação.

As placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas e observou-se a formação de halos de inibição, os quais foram medidos com o auxílio de um paquímetro em milímetros registando-se os diâmetros dos halos formados para cada antibiótico em cada um dos isolados testados. Os resultados obtidos foram classificados em resistentes (R), resistência intermédia (I) ou sensíveis (S) de acordo com os critérios estabelecidos pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2018) e de acordo com o EUCAST (EUCAST 2020; EUCAST 2022). Os isolados foram classificados como multirresistentes quando apresentavam resistência a 3 classes diferentes de antibióticos (Magiorakos 2012).

Na Tabela 3.6 encontram-se listados os grupos de antibióticos com as respetivas concentrações dos discos utilizados e sua categorização em relação a suscetibilidade, como controlo foram usadas as estirpes *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e o *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Tabela 3.6. Lista dos antibióticos em testes, respetivas concentrações e cutoff points utilizados como critério de classificação da suscetibilidade (EUCAST 2022)

Classe do antibiótico	Antibiótico	Abreviatura	Concentração do disco	Resistente (mm)	Sensível (mm)
β-lactâmicos	Cefoxitina	FOX	30 mg	≤ 22	≥ 22
	Penicilina	P	10 mg	≤ 28	≥ 29
	Oxacilina	OXA	1 mg	≤ 21	≥ 22
Aminoglicosídeos	Gentamicina	CN	10 mg	≤ 22	≥ 22
Quinolonas	Ciprofloxacina	CIP	5 mg	≤ 24	≥ 50
Macrólidos	Eritromicina	E	15 mg	≤ 18	≥ 21
Lincosamidas	Clindamicina	C	2 mg	≤ 22	≥ 22
Antituberculoso/ Macrolídeo	Rifampicina	RD	5 mg	≤ 26	≥ 26
Tetraciclinas	Tetraciclina	TE	30 mg	≤ 19	≥ 22

Glicopeptídeo	Teicoplanina	TEC	30 mg	≤ 16	≥ 16
Sulfonamidas	Trimetoprim/ sulfametoxazol	SXT	25 mg	≤ 14	≥ 17
Streptogramin	Quinupristina/ dalfopristina	QDA	15 mg	≤ 18	≥ 21
Derivados do ácido fosfónico	Fosfomicina	FOS	200 mg	≤ 23	≥ 23
Oxazolidinonas	Linezolide	LNZ	10 mg	≤ 21	≥ 21
Antibacterianos esteroides	ácido Fusidico	FD	10 mg	≤ 24	≥ 24
Cloranfenicol	Cloranfenicol	C	30 mg	≤ 18	≥ 18

3.8. Análise dos resultados

Os perfis genéticos dos isolados resultantes do PCR *Fingerprinting*, foram analisados através do programa informático Bionumerics Applied Math (versão 6.6, Bélgica). Obtiveram-se dendrogramas de similaridade dos isolados, os quais foram construídos recorrendo ao coeficiente de correlação de Pearson, com uma otimização de 1,5%, e uma tolerância de correspondência das bandas de 1,5%, pelo método de aglomeração baseado na distância média não ponderada (UPGMA, Unweighted Pair Groups using Arithmetic averages).

Com o mesmo programa informático foi também feita a análise dos perfis genéticos em conjunto com os perfis fenotípicos de sensibilidade aos antibióticos. Inicialmente os resultados foram tratados em separado, depois conjugou-se os dados através da média das experiências (average from experiments) e com o método de aglomeração UPGMA.

IV. Resultados e Discussão

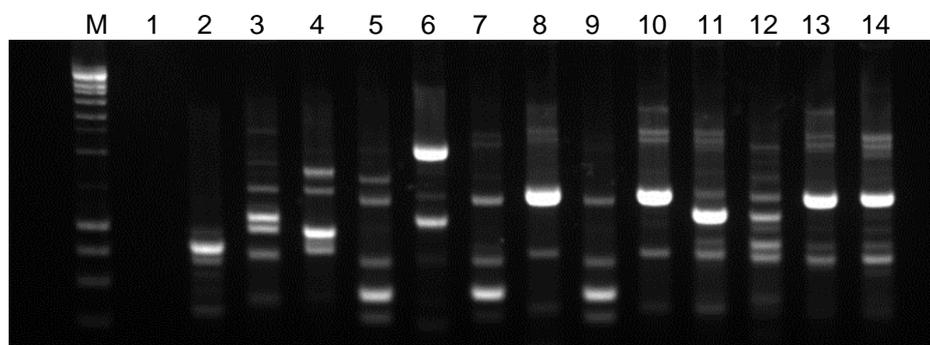
4.1. Caracterização da diversidade genética dos isolados

A técnica fingerprinting PCR ou rep-PCR basea-se no uso de primers direccionados a vários elementos repetitivos, assim este PCR vai gerar perfis de DNA exclusivos ou «impressões digitais» de isolados microbianos individuais. Esta é uma técnica simples e robusta que permite a associação e posterior selecção de isolados de perfis genéticos semelhantes.

A partir do DNA previamente extraído foi realizada uma reacção de PCR fingerprinting com o objectivo de gerar perfis como resultado de um conjunto de perfis de amplificação que caracterizam cada microrganismo.

Na Figura 4.1 apresenta-se um exemplo de diferentes perfis fingerprinting com primer OPC-19 (impressão digital) de algumas estirpes alvo em estudo visualizado em gel de agarose.

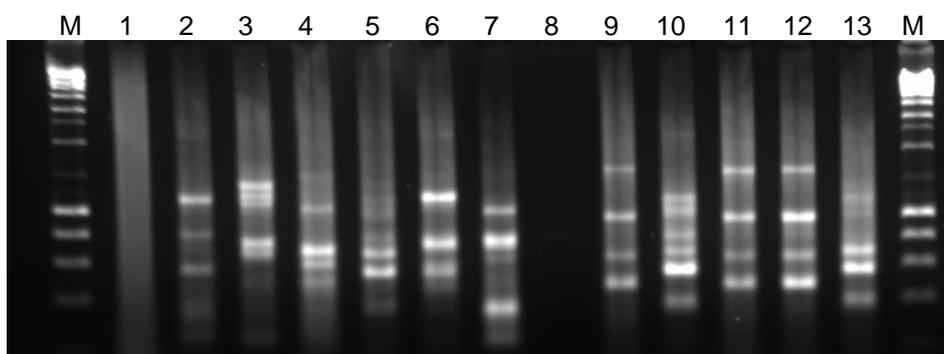
Figura 4.1. PCR *Fingerprinting* de estirpes de *Staphylococcus* em estudo (com primer OPC-19)



M – Marcador (Ladder III – NZYTECH); 1 – Branco; 2 – *S. xylosus* (ATCC 8166) 3 – *S. simulans* (DSMZ 20323); 4 – P1-1; 5 – E1-1; 6 – E1-2; 7 – E1-3; 8 – E1-4; 9 – E1-5; 10 – E5-1; 11 – E5-2; 12 – E5-3; 13 – E5-4; 14 – E5-5.

Na Figura 4.2 apresenta-se um exemplo do fingerprinting com primer GTG-5 (impressão digital) de algumas estirpes alvo de estudo visualizado em gel de agarose.

Figura 4.2. PCR *Fingerprinting* de estirpes de *Staphylococcus* em estudo (com primer GTG-5)



M – Marcador (Ladder III – NZYTECH); 1 – Branco; 2 – *S. xylosus* (ATCC 8166) 3 – *S. simulans* (DSMZ 20323); 4 – S5P 96-1; 5 – S5P 96-2; 6 – S5P 96-3; 7 – S5P 96-4; 8 – S5P 96-5; 9 – S9P 100-1; 10 – S9P 100-2; 11 – S9P 100-3; 12 – S9P 100-4; 13 – S9P 100-5; M – Marcador (Ladder III – NZYTECH).

Após amplificação e separação dos produtos PCR em gel de agarose, a análise de semelhança genética foi efetuada através de um software denominado Bionumerics Applied Math. O dendrograma construído com a compilação dos perfis obtidos dos diferentes 145 isolados com a utilização dos dois primers (GTG-5, OPC-19) pode observar-se no Anexo 1.

Neste dendrograma obtiveram-se 19 clusters diferentes, tendo-se selecionado dos mesmos isolados com perfis diferentes que foram identificados à espécie por PCR tal como descrito previamente. Cerca de 75 dos 145 isolados foram analisados em duplicado tendo-se obtido um índice de reprodutibilidade de 80%.

Ao observarmos este dendrograma salienta-se a diversidade genética dos isolados desta colecção, baseada na existência de espécies diferentes e estirpes com perfil diferentes. Alguns dos isolados agrupam-se com perfis idênticos associados à mesma origem ou seja amostra recolhida ou então a outras fontes. Os isolados presentes nas peças desmanchadas associam-se aos que estão presentes nas superfícies da sala de desmancha (mesas e tapetes) tal como pode ser observado no cluster 12 indiciando a possibilidade de contaminação cruzada.

A carne oferecida a diferentes famílias apresentou isolados idênticos (cluster 14). Isolados com perfis idênticos foram observados em mãos de consumidores de diferentes famílias antes do início da preparação culinária e após lavagem das mãos (cluster 8).

Observou-se a persistência do mesmo isolado na carne cozinhada (cluster 5) associado a isolado presente em mãos de consumidor antes da preparação culinária.

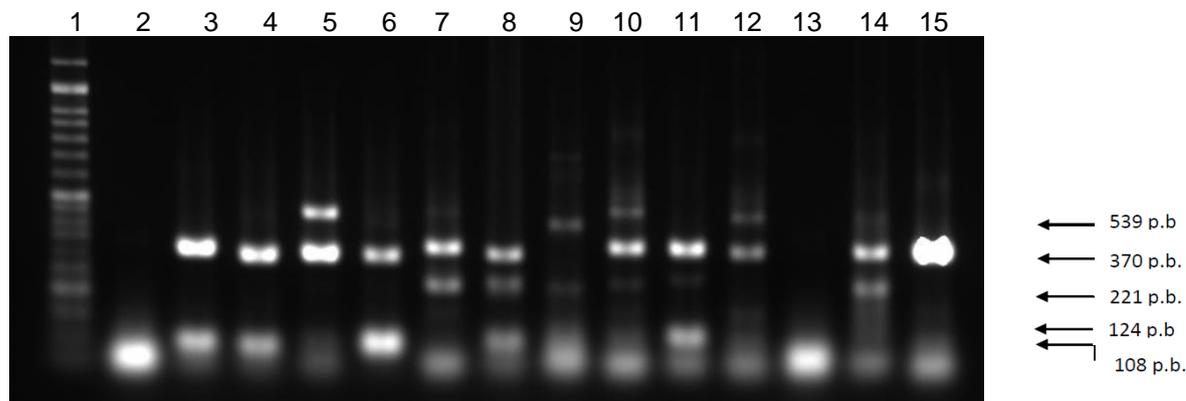
4.2. Identificação de isolados de *Staphylococcus* coagulase negativos

Na Figura 4.3 apresenta-se a fotografia do gel obtido após electroforese e que permitiu visualizar os produtos da técnica PCR multiplex aplicada a alguns dos isolados em estudo para identificação de *Staphylococcus xylosus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus spp.* e *Staphylococcus aureus*.

Os isolados T1-5, ML-2, F20Cc-1 e TS-2 correspondentes às linhas 7, 8, 9 e 14 apresentavam produtos de reacção amplificados com 370 p.b. e 221 p.b. pelo que foram identificados como pertencentes ao género *Staphylococcus* e espécie *saprophyticus*. O isolado 96-1 na linha 11, apresentou hibridação tendo sido evidenciado produtos de reacção amplificados com 124 p.b. e 370 p.b. pelo que foi identificado como pertencente ao género *Staphylococcus* e espécie *epidermidis*. Os isolados 112-5 e P1-1 correspondentes às linhas 10 e 12 apresentavam produtos de reacção amplificados com 370 p.b. e 539 p.b. pelo que foram identificados como pertencentes ao género *Staphylococcus* e espécie *xylosus*. O isolado TS-5 na linha 13 não foi identificado como pertencente ao género *Staphylococcus*.

Dos isolados identificados para o género *Staphylococcus* identificados pela técnica PCR multiplex: vinte isolados (14%) foram identificados genotipicamente como *Staphylococcus carnosus*.

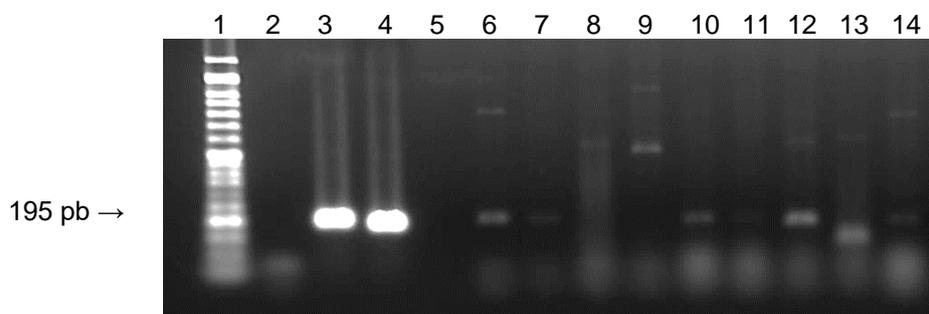
Figura 4.3. Identificação de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus xylosus* e *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus spp.* pela técnica Multiplex PCR: fotografia do gel de agarose após electroforese.



1 – Marcador; 2 – Branco; 3 – *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213); 4 – *Staphylococcus saprophyticus* (DSMZ 18669); 5 – *Staphylococcus xylosus* (ATCC 8166); 6 – *Staphylococcus epidermidis* (ATCC RP 62A); 7 – T1-5; 8 – ML-2; 9 – F20Cc-1; 10 – 112-5; 11 – 96-1; 12 – P1-1; 13 – TS-5; 14 – TS-2; 15 – P1-2.

Na Figura 4.4 pode-se observar o gel de agarose resultante da electroforese efectuada com os produtos de PCR espécie-especifico para o *Staphylococcus carnosus*. Observou-se para o padrão *Staphylococcus carnosus* (DSMZ 4600) um fragmento amplificado de 195 p.b.

Figura 4.4. Identificação de *Staphylococcus carnosus* pela técnica PCR: fotografia do gel de agarose após electroforese.

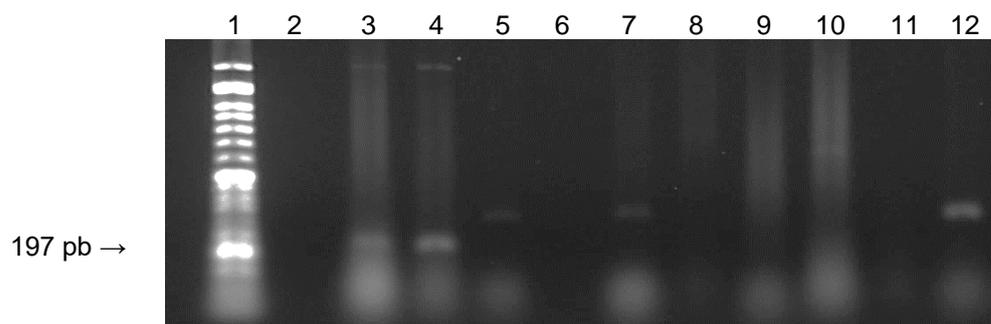


1 – Marcador; 2 – Branco; 3 e 4 – *Staphylococcus carnosus* (DSMZ 4600); 5 – F20Z1-5; 6 – F9Z2-4; 7 – F9Z2-1; 8 – 100-1; 9 – E1-3; 10 – F17Cc-5; 11 – F15Z2-5; 12 – F15Z3-1; 13 – 113-3; 14 – F17Cc-2.

Os isolados F9Z2-4, F9Z2-1, F17Cc-5, F15Z2-5, F15Z3-1 e F17Cc-2 correspondentes a isolados nas linhas nº 6, 7, 10, 11, 12 e 14 da Figura 4.7 apresentaram hibridação e amplificação dos primers com um produto de reacção de 195 p.b. pelo que foram identificados como *Staphylococcus carnosus*.

Na Figura 4.5 apresenta-se um gel de agarose após electroforese dos produtos de PCR espécie especifico para identificação de *Staphylococcus simulans*. Observou-se para o padrão *Staphylococcus simulans* (DSMZ 20323) um fragmento amplificado com 197 p.b.

Figura 4.5. Identificação de *Staphylococcus simulans* pela técnica PCR: fotografia do gel de agarose após electroforese.



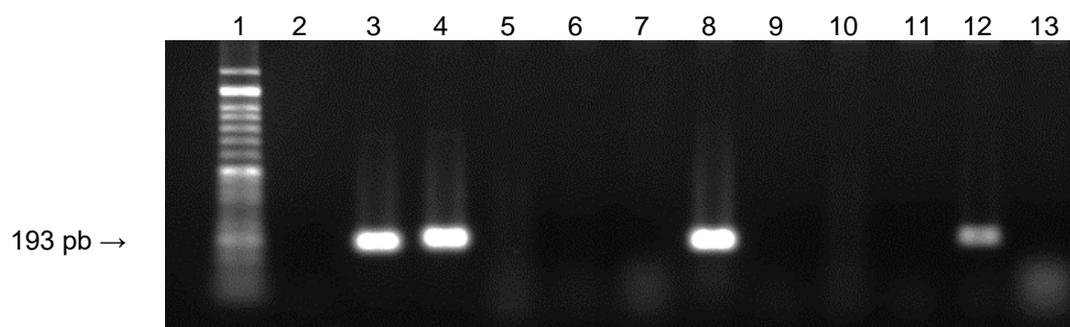
1 – Marcador; 2 – Branco; 3 e 4 – *Staphylococcus simulans* (DSMZ 20323); 5 – 117-1; 6 – F16Cc-4; 7 – F17Cc-2; 8 – E1-3; 9 – F16Cc-2; 10 – F20Z1-2; 11 – T1-3; 12 – F14Z3-2.

Os isolados correspondentes nas linhas nº 5-12 na Figura 4.8 não apresentaram produto da reacção pelo que se conclui que não houve hibridação dos primers e amplificação, não sendo assim identificado como *Staphylococcus simulans*. De salientar que nenhum dos isolados estudados como pertencentes ao género *Staphylococcus* foram identificados genotipicamente como *S. simulans*.

Do total de isolados estudados, doze (9%) foram identificados genotipicamente como *Staphylococcus equorum*.

Na Figura 4.6 apresenta-se um gel de agarose após electroforese dos produtos de PCR espécie específico para identificação de *Staphylococcus equorum*. Observou-se para o padrão *Staphylococcus equorum* (DSMZ 20029) um fragmento amplificado com 193 p.b.

Figura 4.6. Identificação de *Staphylococcus equorum* pela técnica PCR: fotografia do gel de agarose após electroforese.



1 – Marcador; 2 – Branco; 3 e 4 – *Staphylococcus equorum* (DSMZ 20029); 5 – 113-3; 6 – T1-3; 7 – F14Z3-2; 8 – F1Ca-3; 9 – F14Z3-3; 10 – 100-1; 11 – F18Z1-2; 12 – 96-2; 13 – 117-1.

Os isolados F1Ca-3 e 96-2 correspondentes a isolados nas linhas nº 8 e 12 da Figura 4.9 apresentaram hibridação e amplificação dos primers com um produto de reacção de 193 p.b. pelo que foram identificados como *Staphylococcus equorum*.

4.2.1. Espécies identificadas de *Staphylococcus* coagulase negativos e sua relação com a fonte

Da colecção inicial de 145 isolados que eram presuntivamente *Staphylococcus*, através do método de biologia molecular PCR multiplex associado o seu perfil genético foram confirmados 135 isolados como pertencentes ao género *Staphylococcus*. Apenas para 10 dos isolados não foi possível confirmar que pertenciam ao género *Staphylococcus*. Destes isolados, quatro (3%) foram identificados como *Staphylococcus xylosum*, doze (9%) como *Staphylococcus equorum*, vinte (14%) como *Staphylococcus carnosus*, vinte (14%) como *Staphylococcus epidermidis*, cinquenta e um (36%) como *Staphylococcus saprophyticus* sendo que os restantes vinte e sete (19%) não foram identificados à espécie.

Na Figura 4.7 apresenta-se a distribuição das espécies dos isolados *Staphylococcus* coagulase negativos. Salienta-se que a espécie mais encontrada foi a de *S. saprophyticus* (36%).

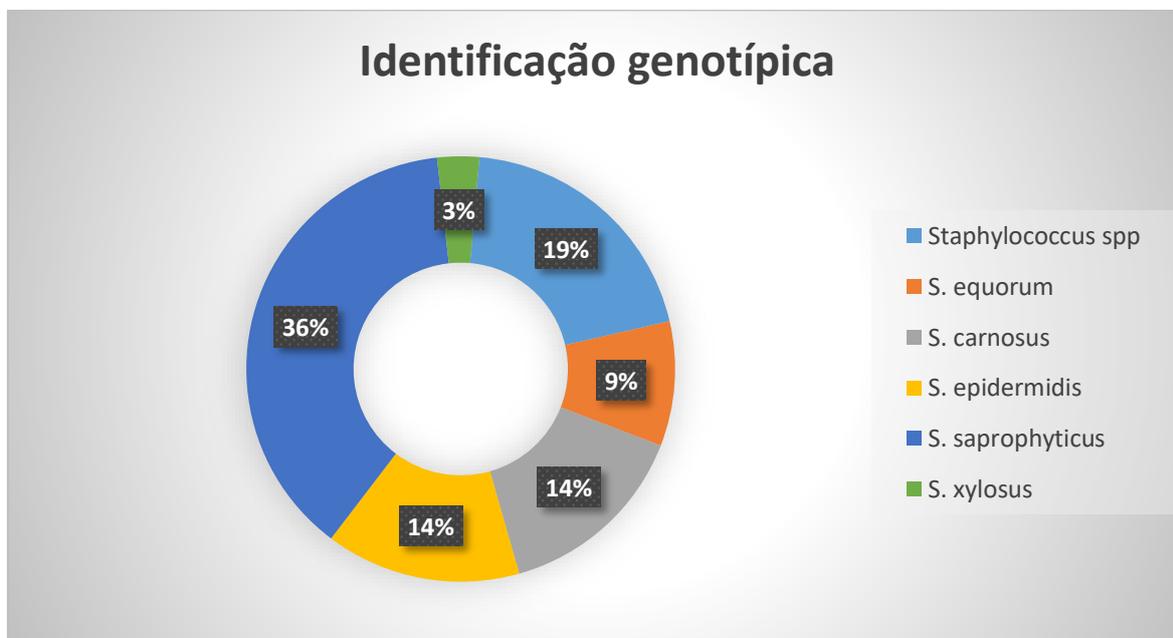


Figura 4.7. Identificação da espécie dos isolados

Na Tabela 4.1 apresenta-se em resumo a distribuição dos isolados identificados (em %) e sua relação com a origem: pavilhão auricular, carcaças e peças de desmancha, superfície das mãos dos trabalhadores da linha de abate e sala de desmancha (antes e após lavagem e desinfecção), superfícies das zonas de trabalho (superfícies de mesas de desmancha, tapetes) e ainda na carne oferecida a famílias de consumidores e nas mãos (antes, após lavagem e após a preparação culinária) dos consumidores.

Assim, nas fases diferentes na cadeia de processamento, constatou-se a presença de cento e trinta e cinco (135) isolados de *Staphylococcus* distribuídos do seguinte modo: nas amostras recolhidas do pavilhão auricular foram identificados dez (10) isolados sendo quatro

(4) *S. equorum*, três (3) isolados de *S. epidermidis*, um (1) de *S. carnosus* e um (1) *Staphylococcus spp.* Dos dez isolados recolhidos das mãos limpas e sujas dos operários da zona sangria foram identificadas 5 espécies diferentes: *S. carnosus* (2), *S. equorum* (3), *S. xylosus* (1), *S. epidermidis* (1), *Staphylococcus spp.* (2) e uma isolada não foi identificada como *Staphylococcus*.

Nas amostras recolhidas das mãos limpas e sujas dos operários, na sala desmancha foram identificados dez (10) isolados: *Staphylococcus saprophyticus* (3), *S. xylosus* (1) e *Staphylococcus spp.* (6). Nas amostras colhidas na entremeada (10 isolados), nas superfícies da mesa limpa (5 isolados) e tapete limpo (5 isolados) foi identificada apenas a espécie *Staphylococcus saprophyticus*. Nas amostras recolhidas dos superfícies de tapete sujo foram identificadas 2 espécies *S. saprophyticus* e *S. xylosus*. Nas amostras de carne crua foram identificados: onze (11) isolados de *S. saprophyticus*, três (3) isolados de *S. equorum* e um (1) isolado de *S. epidermidis*.

Tabela 4.1. Identificação de estirpes relacionadas com a fonte da cadeia de processamento

Produto/Superfície	Identificação de isolados					
	<i>S. xylosus</i> , N (%)	<i>S. equorum</i> , N (%)	<i>S. carnosus</i> , N (%)	<i>S. epidermidis</i> , N (%)	<i>S. saprophyticus</i> , N (%)	<i>Staph. spp.</i> , N (%)
Pavilhão auricular (n=10)	-	4 (40%)	1 (10%)	3 (30%)	-	1 (10%)
Mãos sujas dos operários, zona sangria (n=5)	1 (20%)	2 (40%)	2 (40%)	-	-	-
Mãos limpas dos operários, zona sangria (n=5)	-	1 (20%)	-	1 (20%)	-	2 (40%)
Mãos sujas dos operários, sala desmancha (n=5)	1 (20%)	-	-	-	3 (60%)	1 (20%)
Mãos limpas dos operários, sala desmancha (n=5)	-	-	-	-	-	5 (100%)
Aparas de carne (n=10)	-	-	-	-	10 (100%)	-
Pá (n=10)	1 (10%)	-	1 (10%)	1 (10%)	5 (50%)	2 (20%)
Entremeada (n=10)	-	-	-	-	10 (100%)	-
Mesa limpa (n=5)	-	-	-	-	5 (100%)	-
Tapete sujo (n=5)	1 (20%)	-	-	-	2 (40%)	-
Tapete limpo (n=5)	-	-	-	-	5 (100%)	-

Carne crua (n=15)	-	3 (20%)	-	1 (6,7%)	11 (73,3%)	-
Carne cozinhada (n=14)	-	-	6 (42,9%)	5 (35,7%)	-	3 (21,4%)
Mãos de consumidores antes do início de trabalho (n=15)	-	1 (6,7%)	3 (20%)	2 (13,3%)	-	9 (60%)
Mãos de consumidores após lavagem (n=15)	-	1 (6,7%)	6 (40%)	6 (40%)	-	2 (13,3%)
Mãos de consumidores após preparar a carne (n=5)	-	-	1 (20%)	1 (20%)	-	2 (40%)

Por fim, quando a carne crua foi entregue aos consumidores-famílias, as amostras recolhidas das mãos antes do início de trabalho, após lavagem e mãos após preparar a carne observou-se que as mãos dos consumidores antes do início de trabalho apresentavam-se contaminadas com 3 espécies diferentes de SCN, *S. carnosus* (n=3), *S. epidermidis* (n=2), um (1) isolado de *S. equorum*, os restantes pertenciam ao género *Staphylococcus* (n=9). Nas amostras recolhidas das mãos dos consumidores após lavagem foram identificadas 3 espécies, *S. carnosus* (n=6), *S. epidermidis* (n=6), um (1) isolado de *S. equorum*, os restantes isolados pertenciam ao género *Staphylococcus* (n=2). Nas amostras das mãos dos consumidores após preparar a carne foram identificados *S. carnosus* (n=1), *S. epidermidis* (n=1), *Staphylococcus spp* (n=2).

Nas amostras de carne cozinhada foram identificados: seis (6) isolados de *S. carnosus*, cinco (5) isolados de *S. epidermidis*, os restantes pertenciam ao género *Staphylococcus*.

Nas amostras colhidas de estudo não foram identificados *Staphylococcus aureus* ou *Staphylococcus simulans*.

S. equorum foi identificado mais frequentemente nas mãos dos operários e dos consumidores assim como na carne crua. Os resultados discordam da literatura, uma vez que esses estafilococos geralmente estão associados a suínos, carnes e alimentos fermentados. Vários estudos sobre o genoma e a atividade enzimática de *S. equorum* (Heo 2020; Khiralla 2019; Strube 2018) concluíram que esta espécie é benigna.

A maioria dos isolados de *S. carnosus* foi associada à origem humana, principalmente com as famílias consumidoras e alguns trabalhadores na zona de sangria. A baixa presença desta espécie em carnes e suínos concorda com a literatura, embora a distribuição desta espécie ainda não seja totalmente compreendida (Janssens 2012). A alta presença dessas bactérias em humanos e sua ausência em suínos podem ser indicadores de contaminação da carne pelo consumidor.

S. xylosus foi identificado nas mãos sujas dos operários da sangria e da desmancha, no tapete sujo e numa peça de carne, a pá. A presença desta espécie de bactérias na peça pá e a sua ausência em suínos pode ser indicador de contaminação cruzada da carne pela superfícies de trabalho (tapetes de transporte) e pelos operários da sala de desmancha tanto mais que esta espécie é um comensal na pele dos humanos, animais e está frequentemente presente no ambiente (Azelmad et al. 2017; Dordet-Frisoni et al. 2007; Shale et al. 2005). Também Terra et al. (2007) no seu trabalho identificou bactérias da espécie *S. xylosus* na superfície e na parte interna de peças de carne de suíno. Contudo, esta espécie embora seja frequentemente não patogénica foi associada a casos de infecções relatados em humanos para algumas estirpes desta espécie (Dordet-Frisoni 2007; Siqueira 2002; Chajęcka-Wierzchowska 2015).

Os isolados de *S. epidermidis* estão relacionados principalmente com as famílias de consumidores. São espécies patogénicas associadas a humanos (Lee 2021; Widerström 2012; Otto 2009). *S. epidermidis* é geralmente um microrganismo comensal da pele e mucosas de humanos e outros mamíferos, o que justifica a presença de isolados nos consumidores e operários. A alta presença dessas bactérias em humanos e carne cozinhada e sua ausência em suínos podem ser indicadores de contaminação da carne pelo consumidor. Esta relação provável também é descrita no trabalho de Huber et al. (2011).

S. saprophyticus coloniza frequentemente o trato gastrointestinal de humanos e animais e é um contaminante frequente da carne (Widerström 2012; Lawal 2021). Dentro das espécies de SCN, *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* são exemplos dos tipos mais significativos de SCN em infecções humanas (Becker 2014). No nosso estudo a maior parte dos isolados foram identificados nos operários na sala desmancha (60%), aparas de carne (100%), entremeada (100%), mesa e tapete limpos (100%) e carne crua (73%). A elevada presença destas bactérias quer nos operários da sala desmancha quer nas superfícies dos equipamentos higienizadas é indicador de uma persistência desta espécie no ambiente fabril sendo esta a potencial fonte de contaminação da carne. Saliente-se ainda o fato de que esta espécie estava ausente nos suínos amostrados e posteriormente nos consumidores.

Os isolados de *Staphylococcus spp.* não identificados à espécie estão principalmente relacionados com os operários na zona sangria e desmancha e com as famílias de consumidores. A alta presença deste género nos humanos em geral pode ser indicador de contaminação da carne pelos operários e pelos consumidores.

Na Figura 4.8 apresenta-se a distribuição dos isolados *Staphylococcus coagulase* negativos em estudo identificados por espécie e sua relação com a origem da sua recolha. Pode-se constatar que o maior número de isolados recolhidos tem origem na etapa de desmancha (carne e ambiente) e posteriormente nos consumidores.

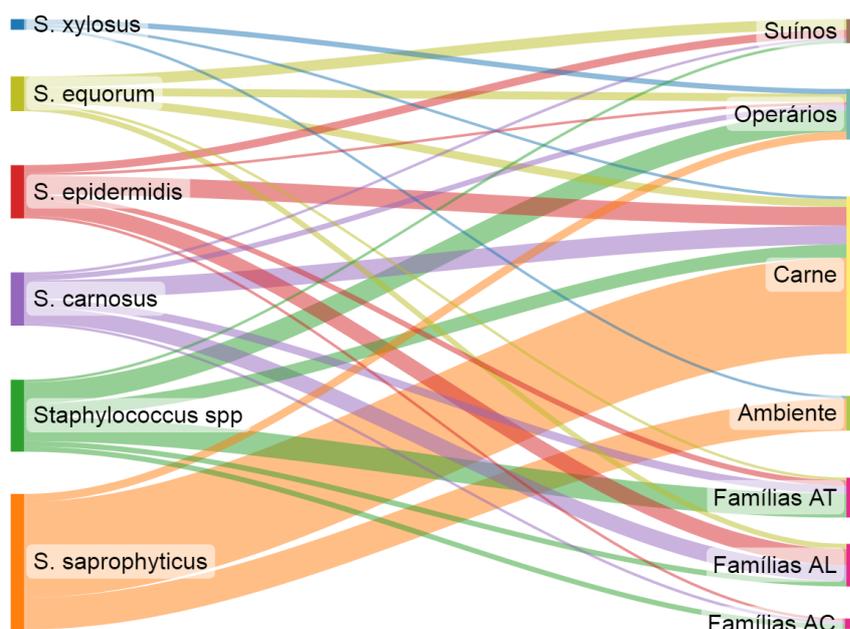


Figura 4.8. Distribuição entre as espécies e da origem de recolha

Famílias AT - amostras das mãos dos consumidores antes de início de trabalho; Famílias AL - amostras das mãos dos consumidores após lavagem; Famílias AC - amostras das mãos dos consumidores após preparação da carne.

Na Figura 4.9 apresenta-se o perfil genético das estirpes de *Staphylococcus carnosus* tendo-se estabelecido quatro grandes grupos cujas semelhanças entre eles eram de 60%. Grupo I) OS1S 112-1, F9Z2-1, F9Z2-4 isolados das mãos sujas dos operários na zona sangria, e das mãos dos consumidores (famílias) após lavagem; Grupo II) F17Cc-3, F17Cc-4, F15Z1-3, F17Cc-1, F17Cc-2 e P2-5 presentes na carne cozinhada, nas mãos dos consumidores antes do início de trabalho e nas peças pá; Grupo III) F15Z1-1, F15Z2-1, F15Z2-5, F15Z1-2 que se distribuíam nas mãos dos consumidores antes do início de trabalho e após lavagem; Grupo IV) F17Cc-5, F12Cc-1 e S5P 96-5 presentes no pavilhão auricular de suínos e na carne cozinhada. Apesar de estarem dentro do mesmo grupo os perfis genéticos das peças de carne e pavilhão auricular não apresentam semelhanças superiores a 80% com os perfis dos isolados que se encontraram nas mãos dos consumidores pelo que não são idênticos não se estabelecendo grande relação entre os mesmos.

Dentro de cada grupo, as estirpes que apresentaram um grau de semelhança superior a 80%, podem ser consideradas idênticas. Na Figura 4.9 é possível observar 9 estirpes com perfis genéticos com uma semelhança superior a 80%: F17Cc-5, F12Cc-1, F17Cc-3, F17Cc-4, F15Z1-3, F17Cc-1, F17Cc-2, F15Z1-1, F15Z2-1. Na mesma família F15, o consumidor após lavar as mãos apresenta um isolado com o mesmo perfil encontrado nas mãos sujas o que significa que a higienização efectuada não foi adequada o que pode estar na origem da contaminação da carne cozinhada após manipulação da mesma. Apenas a carne cozinhada da família F17 apresentou isolados de *S. carnosus*.

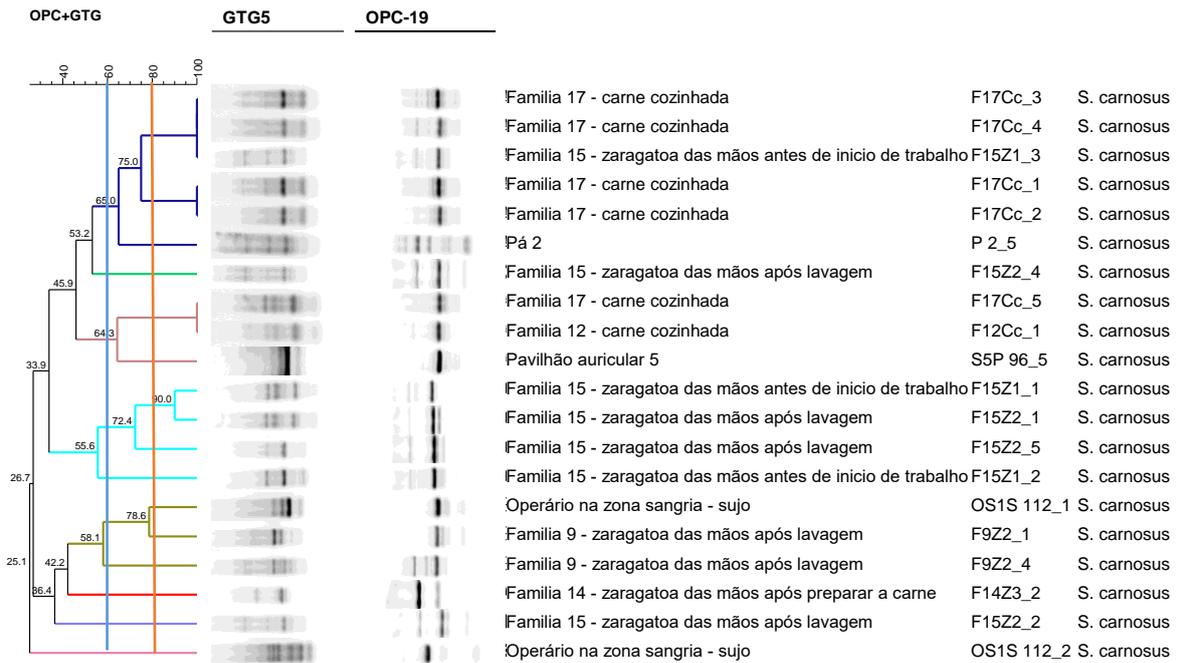


Figura 4.9. Dendrograma da análise do perfil genético obtido por PCR *Fingerprinting* das estirpes de *Staphylococcus carnosus* (A escala acima do dendrograma mostra a percentagem do nível de semelhança obtido).

Pela análise da Figura 4.10 que apresenta o perfil genético das estirpes de *Staphylococcus epidermidis* estudadas estabeleceram-se três grupos com 55% de semelhanças: Grupo I) F16Cc-3, F20Z2-1, S5P 96-3, F20Z2-5 que se distribuem entre o pavilhão auricular do suíno, as mãos dos consumidores após lavagem e a carne cozinhada; Grupo II) F19Cc-1, F20Z2-2, F20Z2-3, F20Z2-4, F2Ca-3, OS1L 113-3 que se distribuem entre amostras recolhidas das mãos limpas dos operários (zona sangria), da carne crua oferecida a consumidores e carne cozinhada, das mãos dos consumidores após lavagem; Grupo III) S9P 100-3, F14Z3-5, F18Z1-3, F9Z2-3 e F18Z1-4 que se distribuem entre amostras recolhidas do pavilhão auricular do suíno, das mãos dos consumidores antes do início da preparação culinária, após lavagem das mãos e após preparar a carne.

Na Figura 4.10 pode-se observar que 9 isolados apresentam perfis genéticos com uma semelhança superior a 80%: F20Cc-1, F20Cc-2, F19Cc-1, F20Z2-2, F20Z2-3, F20Z2-4, F18Z1-4, F9Z2-3 e F18Z1-4. Estas estirpes F20Cc-1, F20Cc-2 estavam presentes na carne cozinhada da família 20 mas não se encontraram noutras famílias ou noutras amostras, as estirpes encontradas na família 20 após lavagem das mãos tem uma semelhança superior a 80% com as estirpes encontradas na carne cozinhada pela família 19. O mesmo perfil genético está presente nas famílias 9 e 18 em mãos sujas, lavadas e após preparação da carne.

Um perfil genético idêntico de *S. epidermidis* está associado maioritariamente às mãos de diferentes famílias e posteriormente à carne que foi cozinhada mas nunca à carne crua que lhes foi fornecida indicando-se assim como uma potencial fonte de contaminação da carne as próprias mãos das famílias que a manipularam. Esta espécie é um comensal que coloniza habitualmente a pele e mucosas do homem (Becker 2014) pelo que esta associação entre as mãos das famílias e a carne que foi cozinhada pode ocorrer.

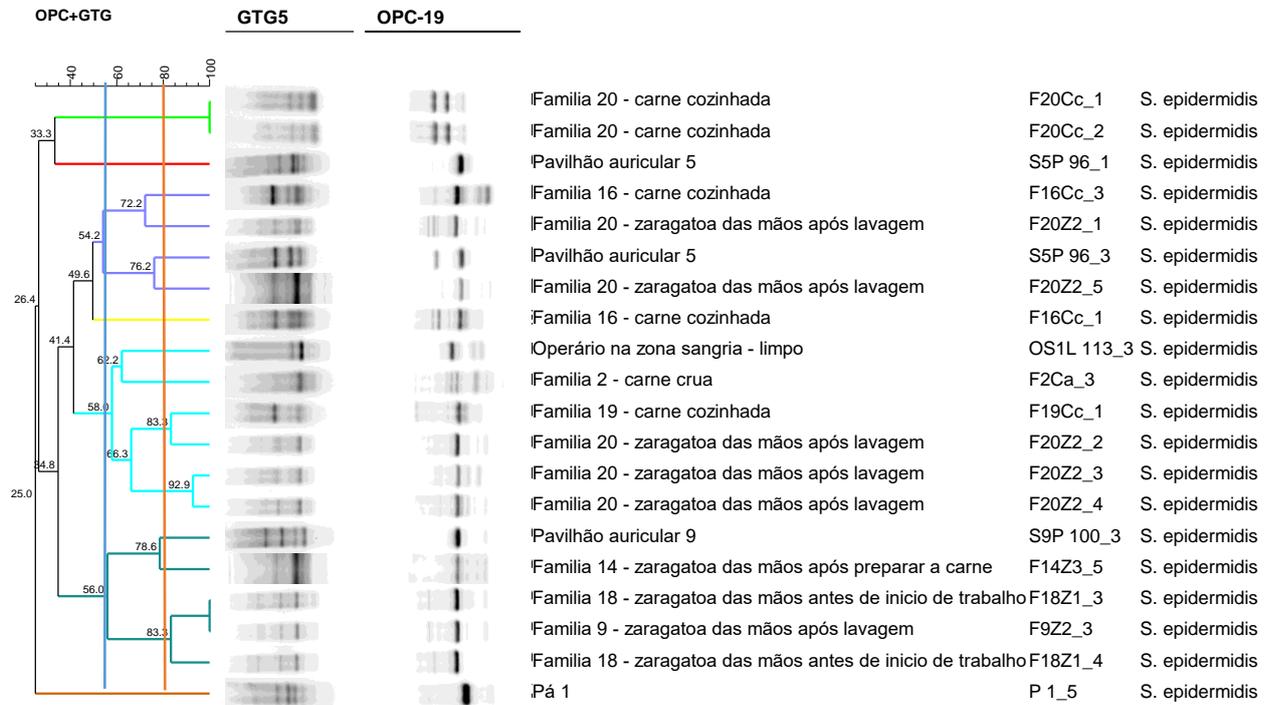


Figura 4.10. Dendrograma da análise do perfil genético de estirpes *Staphylococcus epidermidis* obtido por PCR Fingerprinting.

Da análise do perfil genético das estirpes de *Staphylococcus xylosus* estudadas (Figura 4.12) estabeleceu-se só um grupo pequeno cujas semelhanças entre as estirpes foram apenas superiores a 50%. Grupo I) OS2S 112-5 e P1-1. Neste grupo estão incluídas amostras recolhidas das mãos sujas dos operários na zona sangria e da pá. Não existe estirpes que apresentem perfis genéticos com uma semelhança entre si de 80%.

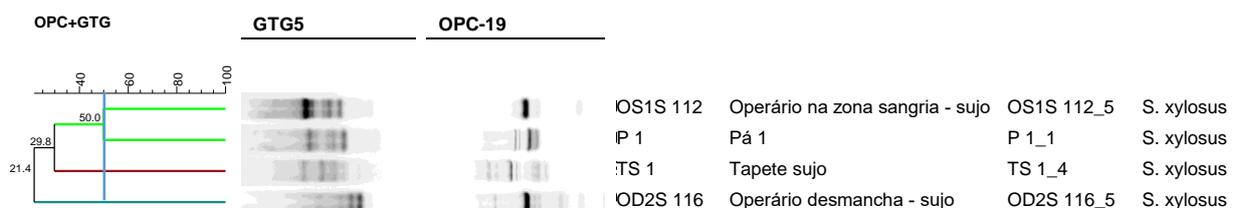


Figura 4.11. Dendrograma da análise do perfil genético de estirpes *Staphylococcus xylosus* obtido por PCR Fingerprinting.

Pela análise do perfil genético das estirpes de *Staphylococcus equorum* apresentadas na Figura 4.13 estabeleceram-se três grandes grupos cujas semelhanças eram de 45%. Grupo I) S9P 100-5, F15Z1-5 onde estavam incluídas as amostras recolhidas no pavilhão auricular de suínos e das mãos dos consumidores antes do início da preparação culinária; Grupo II) S5P 96-2, OS1S 112-3, S9P 100-2, F15Z2-3 e S9P 100-4 recolhidas não só das superfícies das mãos sujas dos operários na zona sangria e dos consumidores após lavagem, como também no pavilhão auricular do suíno; Grupo III) OS1L 113-2 e F1Ca-3. Na Figura 4.13 foi possível observar que só 2 estirpes apresentam perfis genéticos com uma semelhança superior a 80%, as estirpes S5P 96-2 e OS1S 112-3 presentes no pavilhão auricular de um suíno e nas mãos do operário da zona sangria, o que indica uma contaminação cruzada a partir do pavilhão auricular do suíno para as mãos do operário. Contudo não se observaram contaminações com estirpes idênticas de *S. equorum* nas superfícies da sala de desmancha nem dos operários dessa sala, apesar de ocorrer contaminação com estirpes diferentes de *S. equorum* na carne crua fornecida às famílias e nas mãos dos consumidores.

De acordo com o trabalho de Fijałkowski et al. (2016) foram identificados várias espécies de SCN em produtos *ready to eat* à base de carne tendo verificado que o *S. equorum* foi isolado com uma frequência de 57%.

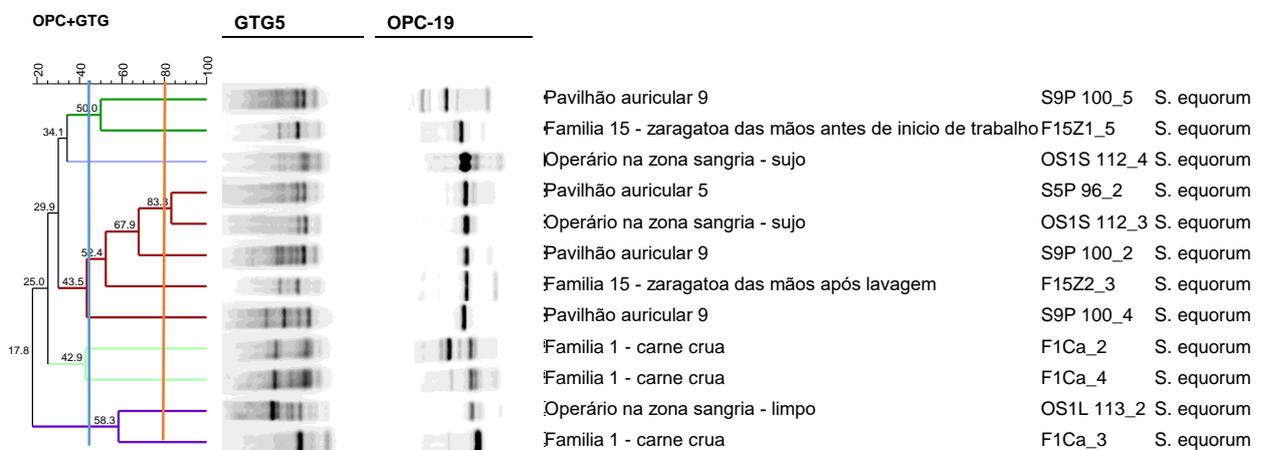


Figura 4.12. Dendrograma da análise do perfil genético de estirpes *Staphylococcus equorum* obtido por PCR Fingerprinting.

Pela análise do perfil genético das estirpes de *Staphylococcus saprophyticus* apresentadas na Figura 4.11 estabeleceram-se quatro grandes grupos com 60% de semelhanças: Grupo I) T1-4, T1-2, P1-4 onde estavam incluídas as amostras recolhidas das aparas de carne e pá; Grupo II) E1-3, E1-5, E1-1, E5-4, T2-1, ML1-5, TL1-1, E5-3 e F2Ca-1 onde estavam incluídas as amostras recolhidas da entremeada e da superfície da mesa limpa, entremeada, carne crua e aparas de carne; Grupo III) ML1-1, ML1-3, F15Ca-4, TL1-5, E1-4,

E5-1, E5-2, TS1-1, F2Ca-2, T2-4 e TL1-3 cujas amostras foram recolhidas das superfícies da mesa limpa e tapete limpo, de tapete sujo, entremeada, aparas de carne, carne crua; Grupo IV) F1Ca-5, F2Ca-4, F2Ca-5, F15Ca-3, P2-4, F15Ca-1, T2-5 onde as amostras recolhidas de carne crua, pá e aparas de carne.

As estirpes E1-3, E1-5, E1-1, E1-4, E5-1, E5-4 isoladas de entremeada apresentaram perfis genéticos com uma semelhança entre si superior a 90% e a mesma situação existe com isolados das aparas de carne. As estirpes ML1-1, ML1-5 e ML1-2 isoladas de superfícies de trabalho (mesa limpa) apresentaram perfis genéticos com uma semelhança entre si superior a 90%, podendo considerar-se estirpes idênticas, assim como a TL1-5, TL1-1 e TL1-4 também isoladas de superfícies de trabalho (tapete limpo).

Estirpes da espécie *S. saprophyticus* aparecem maioritariamente nas superfícies (tapete e mesa) limpas da sala de desmancha, nas peças de carne (pá e entremeada) resultantes da desmancha, nas aparas de carne e na carne crua que foi fornecida às famílias. Não se observou qualquer relação de isolados desta espécie com as famílias (mãos antes da preparação culinária, após lavagem e após preparação culinária). O *S. saprophyticus* persiste nas superfícies limpas e higienizadas incitando uma falha de eficácia destas operações e indicando a possibilidade de contaminação cruzada das peças, aparas e carne. O *S. saprophyticus* é um contaminante frequente da carne (Lawal 2021).

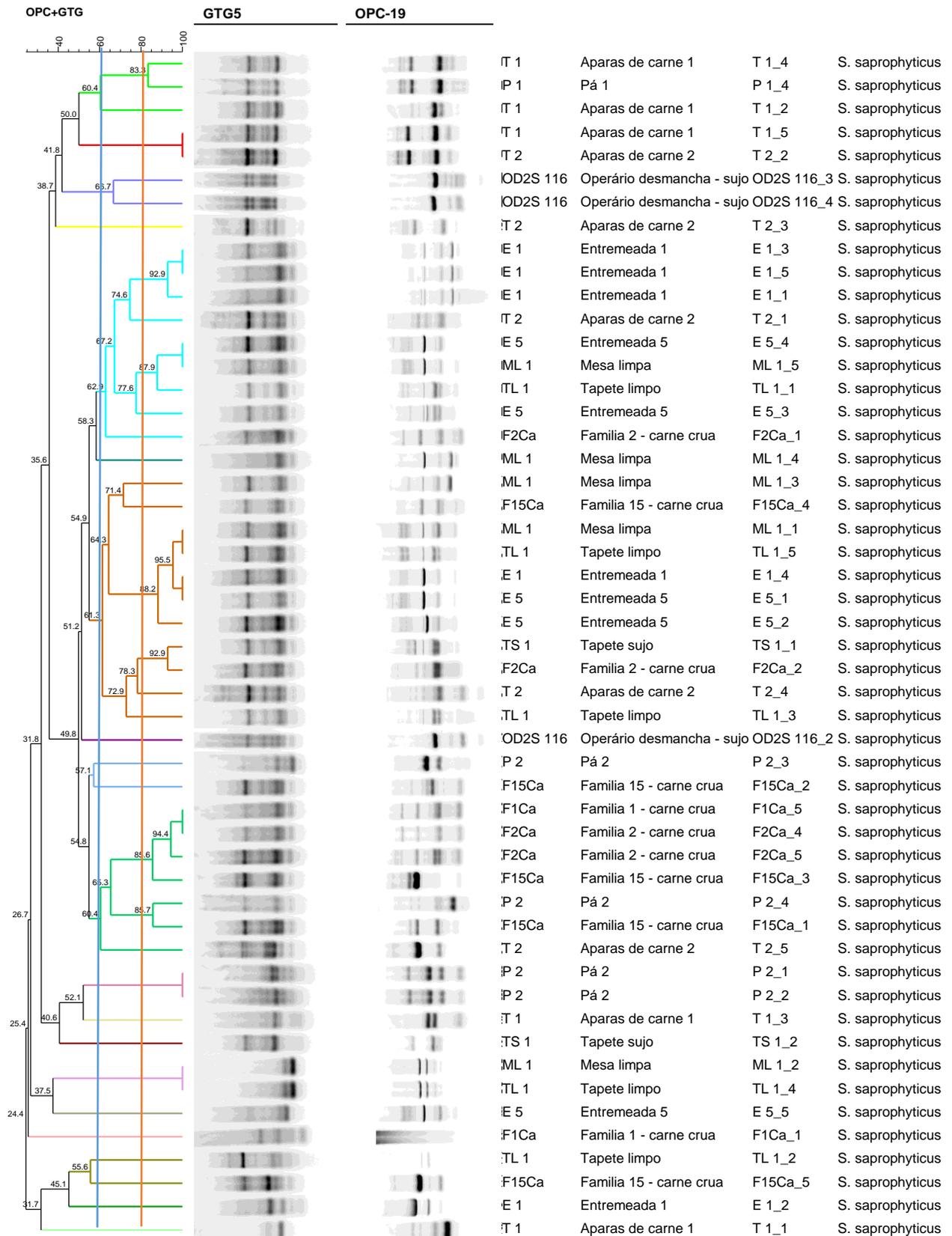


Figura 4.13. Dendrograma da análise do perfil genético de estirpes *Staphylococcus saprophyticus* obtido por PCR *Fingerprinting*.

Da análise do perfil genético de isolados de *Staphylococcus* não identificados à espécie (Figura 4.14) estabeleceram-se só dois grandes grupos cujas semelhanças entre eles foi de 55%. Grupo I) F20Z1-2, F9Z2-2, OD2S 116-1, F18Z1-2, F18Z1-5; Grupo II) F18Z1-1, F9Z2-5, F20Z1-3, OS1L 113-1. Na Figura 4.14 é possível distinguir 8 estirpes com perfis genéticos com uma semelhança de 80%: F18Z1-1, F9Z2-5, OD2L 117-1, OD2L 117-2, OD2L 117-3, OD2L 117-4, F14Z3-3, F14Z3-4.

As estirpes de *Staphylococcus* não identificadas à espécie foram isoladas maioritariamente das mãos limpas dos operários na zona desmancha e das mãos dos consumidores antes do início de trabalho e após lavagem. Outras espécie de *Staphylococcus* como *S. warneri*, *S. hominis*, *S. intermedius*, *S. capitis* podem estar presente na pele e mucosas de humanos (Cameron et al. 2015; Kosecka-Strojek et al. 2018; Kanuparth et al. 2020; Kamath et al. 1992).

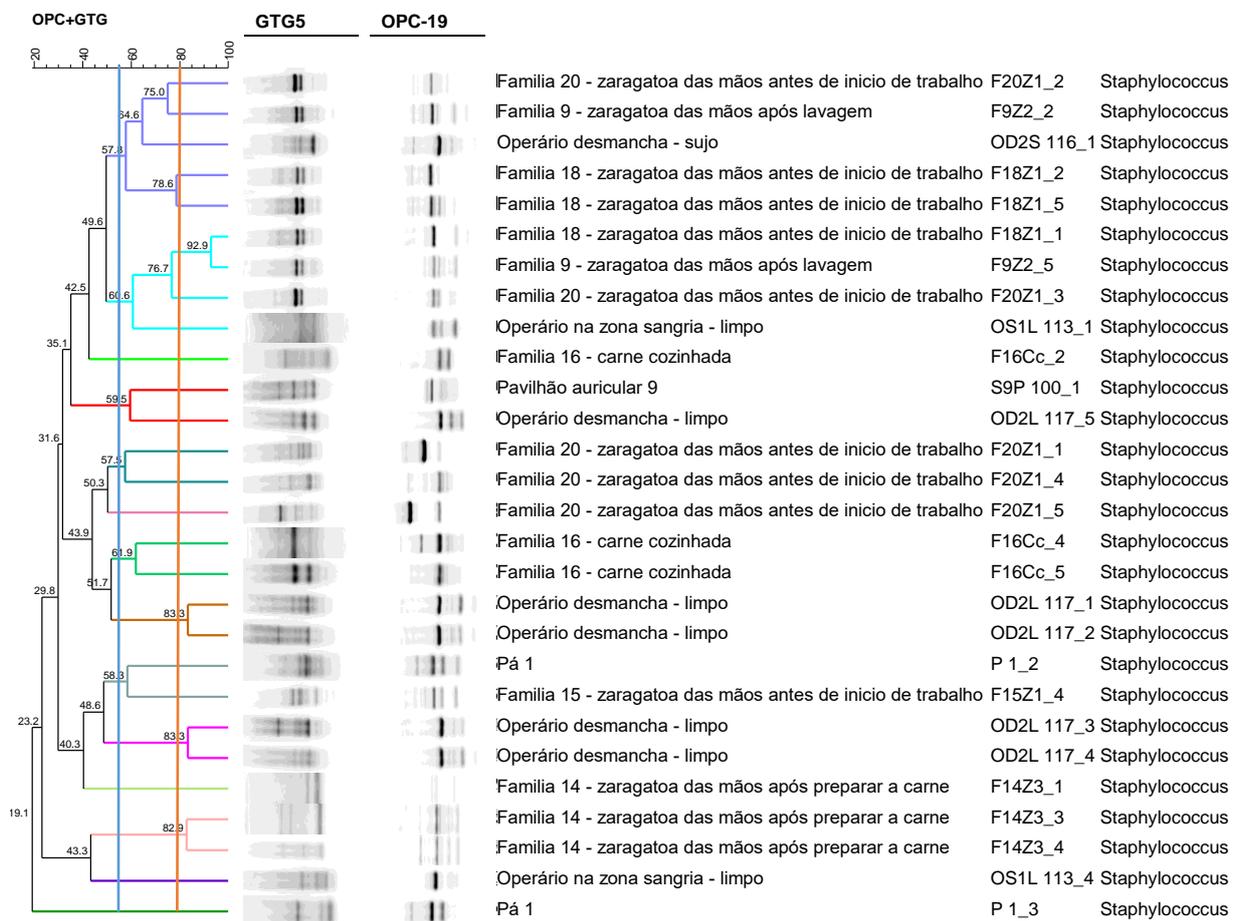


Figura 4.14. Dendrograma da análise do perfil genético de *Staphylococcus spp.* obtido por PCR *Fingerprinting*.

4.3. Caracterização fenotípica dos isolados: morfologia das colónias e utilização do manitol

Os 145 isolados de presuostos *Staphylococcus* apresentaram diferentes capacidades metabólicas, uma vez que nem todos metabolizaram o manitol. Assim, apenas 48% (67) utilizaram o manitol, fermentando-o com produção de ácido e consequente alteração do indicador (vermelho de fenol) de vermelho para amarelo, 8% (11) evidenciaram uma metabolização lenta e 43% (61) não utilizaram o manitol.

O crescimento e tamanho das colónias dos isolados em estudo no meio MSA foram variáveis, sem possibilidade de se estabelecer qualquer relação com a capacidade de utilização do manitol.

Nas Figuras 4.15, 4.16 e 4.17 podem observar-se exemplos de isolados estudados que apresentaram diferentes velocidades de utilização e fermentação do manitol presente no meio MSA com mudança da sua cor, devida ao vermelho de fenol, para amarelo, assim como colónias de diferentes tamanhos após o período de incubação de 24 horas a 37°C.

O isolado F16Cc-4 utilizou lentamente o manitol do Meio Manitol salt agar. O isolado 113-1 não fermentou o manitol não alterando a cor do meio. Os isolados 116-2 e 117-3 fermentaram o açúcar manitol libertando ácido, o que vai originar alteração do pH do meio MSA e consequentemente da sua cor que vira para amarelo.



Figura 4.15. Isolados 116-2 (1) e 117-3 (2) de *Staphylococcus spp.* que fermentavam o manitol



Figura 4.16. Isolado *Staphylococcus* 113-1 que não utilizou o manitol

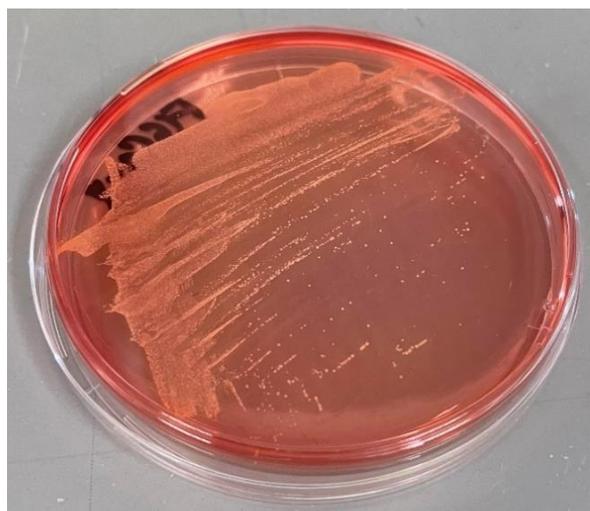


Figura 4.17. Isolado *Staphylococcus* F16Cc-4 que evidenciaram uma utilização lenta do meio Manitol Salt Agar

A Tabela 4.2 relaciona a identificação genotípica com a capacidade de fermentação do açúcar manitol dos isolados em estudo.

Tabela 4.2. Identificação genotípica versus capacidade de fermentação do manitol

	Identificação de isolados					
	<i>S. xylosus</i> , N (%)	<i>S. equorum</i> , N (%)	<i>S. carnosus</i> , N (%)	<i>S. epidermidis</i> , N (%)	<i>S. saprophyticus</i> , N (%)	<i>Staph. spp.</i> , N (%)
Fermenta manitol (n=67)	-	5 (3%)	11 (8%)	2 (1,5%)	32 (23%)	17 (12%)
Fermentação lenta manitol (n=11)	-	1 (1%)	2 (1,5%)	3 (2%)	1 (1%)	2 (1,5%)
Não reduz o manitol (n=61)	4 (3%)	6 (4%)	7 (5%)	15 (11%)	18 (13%)	8 (6%)

Dos onze (11) isolados que fermentavam lentamente o manitol, três (2%) eram *S. epidermidis*, um (1%) era *S. equorum*, dois (1,5%) eram *S. carnosus*, dois (1,5%) eram *Staphylococcus spp.* e, um (1%) era *S. saprophyticus*. Relativamente aos isolados que não reduziam o manitol constatou-se que, dos sessenta e sete (61) isolados: seis (4%) eram

S. equorum, quinze (11%) eram *S. epidermidis*, dezoito (13%) eram *S. saprophyticus*, sete (5%) eram *S. carnosus*, oito (6%) eram *Staphylococcus spp.* e, quatro (3%) eram *S. xylosus*.

Vinte e três por cento das estirpes de *Staphylococcus saprophyticus* fermentavam o manitol, percentagem significativamente inferior ao observado por Schleifer (1986).

Comparando com o trabalho de Aryal (2019) e Shhleifer et al. (1975), vemos que os nossos resultados concordam com o fato de *Staphylococcus epidermidis* não reduzir o manitol e ter colônias incolores ou vermelhas com zonas vermelhas. De acordo com o trabalho de Thakur (2017) observamos que *S. xylosus* utilizou manitol, produzindo colônias amarelas em MSA, que não concorda com os nossos resultados.

4.4. Caracterização da resistência aos antibióticos de *Staphylococcus coagulase negativos* isolados da cadeia de abate de suínos

Um total de isolados selecionados pela similaridade genética (n=37) foram analisados para caracterizar a sua sensibilidade em relação a cada um dos 16 antibióticos em estudo.

Os 37 isolados em estudo não apresentaram resistência aos antibióticos teicoplanina (TEC) e linezolid (LNZ), 16% (6 amostras) apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico e 62% (23 amostras) eram multirresistentes.

Nas Figuras 4.18 e 4.19 podem observar-se alguns exemplos de isolados estudados pelo método de difusão em disco, que apresentaram suscetibilidade aos antibióticos.

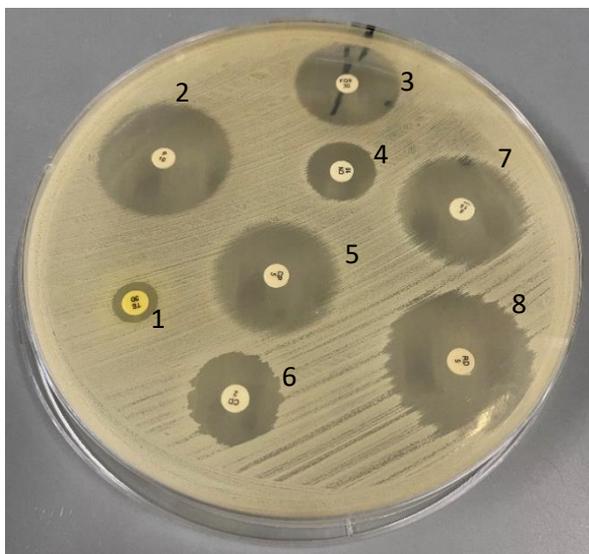


Figura 4.18. Isolado OS1L 113-2 operário na zona sangria (*S. equorum*)

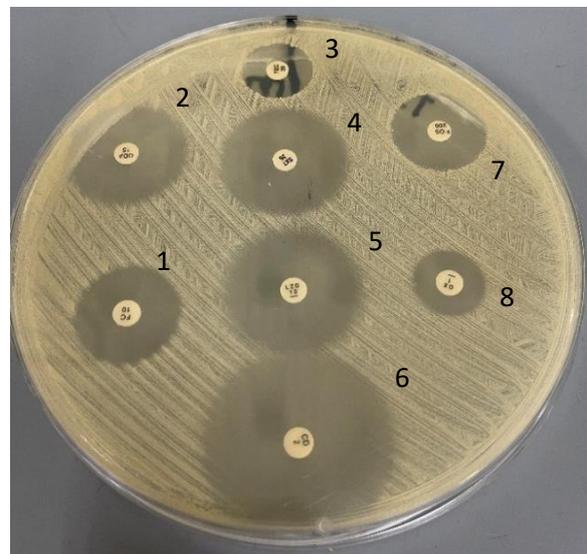


Figura 4.19. Isolado TS 1-1 tapete sujo (*S. saprophyticus*)

Na Figura 4.18 pode observar-se uma placa de antibiograma com um isolado recolhido das mãos limpas dos operários na zona sangria, mostrando resistência à tetraciclina (1),

gentamicina (4) e clindamicina (6), e suscetibilidade à penicilina (2), ciprofloxacina (5), cefoxitina (3), eritromicina (7) e rifampicina (8).

Na Figura 4.19 pode observar-se uma placa de um antibiograma de um isolado recolhido das superfícies de um tapete sujo mostrando resistência ao ácido fusídico (1) e oxacilina (8), e suscetibilidade à quinupristina/dalfopristina (2), teicoplanina (3), trimetoprim/sulfametoxazol (4), linezolide (5), clindamicina (6) e fosfomicina (7).

No Tabela 4.3 apresenta-se a percentagem de isolados com resistência e suscetibilidade a cada um dos antibióticos testados.

Constatou-se que os isolados do género *Staphylococcus* em estudo, apresentaram uma maior frequência de resistência à gentamicina (51%) e à oxacilina (59%). A cefoxitina (92%), ciprofloxacina (95%), rifampicina (92%), cloranfenicol e quinupristina/dalfopristina (92%), teicoplanina e linezolide (100%) foram os antibióticos para os quais um maior número de isolados foram suscetíveis. Estes resultados são corroborados pela literatura, que menciona que a maior parte das espécies SCN isoladas de várias fontes apresentam resistência a estes antibióticos (Mamfe et al. 2021). No trabalho de Mamfe et al. (2021) todos os isolados de *Staphylococcus* foram resistentes aos antibióticos do grupo β -lactâmicos (100%). Também foi observada resistência ao linezolide (22%), gentamicina (7,5%) e ciprofloxacina (75,8%).

Tabela 4.3. Percentagem de Isolados com Resistência e Suscetibilidade a cada um dos antibióticos testados

Antibióticos		Sensíveis		Resistentes	
		N	%	N	%
Cefoxitina	FOX	34	92%	3	8%
Penicilina	P	25	68%	12	32%
Gentamicina	CN	18	49%	19	51%
Ciprofloxacina	CIP	35	95%	2	5%
Eritromicina	E	23	62%	14	38%
Clindamicina	DA	25	68%	12	32%
Rifampicina	RD	34	92%	3	8%
Tetraciclina	TE	25	68%	12	32%
Teicoplanina	TEC	37	100%	0	0%
Trimetoprim / sulfametoxazol	SXT	33	89%	4	11%
Quinupristina / dalfopristina	QDA	34	92%	3	8%
Fosfomicina	FOS	30	81%	7	19%
Linezolide	LNZ	37	100%	0	0%
ácido Fusídico	FD	21	57%	16	43%
Oxacilina	OXA	15	41%	22	59%
Cloranfenicol	C	34	92%	3	8%

Na Tabela 4.4 apresentam-se os perfis de resistência de 37 isolados SCN em função da origem de recolha da amostra.

O perfil de resistência a antibióticos encontrado nos isolados com origem no pavilhão auricular dos suínos, nas mãos sujas dos operários na zona de sangria, na carne fatiada crua e nas mãos dos consumidores antes do início do trabalho, inclui um maior número de antibióticos testados (cefoxitina, penicilina, gentamicina, eritromicina, clindamicina, rifampicina, trimetoprim/sulfametoxazol, quinupristina/dalfopristina, fosfomicina, ácido fusídico, oxacilina). Contudo o perfil encontrado para os isolados no pavilhão auricular não se assemelhou ao encontrado na carne crua fatiada, nem ao encontrado nas mãos dos consumidores. De fato a cefoxitina, penicilina, ciprofloxacina, trimetoprim/sulfametoxazol, quinupristina/dalfopristina fazem parte do perfil de resistência dos isolados das mãos dos consumidores mas não estão presentes no perfil de resistência dos isolados presentes na carne crua. O perfil de resistência dos isolados presentes nas peças (pá e entremeada) compreende apenas três antibióticos comparativamente ao perfil de resistência dos isolados encontrados na carne fatiada que inclui um maior número de antibióticos.

A suscetibilidade a antibióticos nos isolados recolhidos das superfícies do tapete limpo é maior.

Tabela 4.4. Perfil de resistência dos 37 isolados de SCN com fenótipos de resistência

Isolados	Perfil de resistência
Pavilhão auricular (n=3)	CN, E, DA, TE, QDA, FD, OXA, C
Mãos sujas dos operários, zona sangria (n=4)	CN, E, DA, TE, SXT, QDA, FOS, FD, OXA
Mãos limpas dos operários, zona sangria (n=2)	P, CN, DA, TE, OXA
Mãos sujas dos operários, sala desmancha (n=2)	P, CN, CIP, E, DA, OXA
Mãos limpas dos operários, sala desmancha (n=1)	CN, E, OXA
Aparas de carne (n=2)	CN, E, TE, FOS, FD, OXA
Pá (n=3)	P, CN, TE
Entremeada (n=1)	P, TE, OXA
Mesa limpa (n=1)	CN, E, FD, OXA
Tapete sujo (n=2)	CN, TE, FD, OXA
Tapete limpo (n=1)	FD, OXA
Carne crua (n=4)	FOX, P, CN, CIP, RD, TE, FOS, FD, OXA
Carne cozinhada (n=1)	FOX, CN, RD, SXT, FD, OXA

Mãos dos consumidores antes do início de trabalho (n=4) FOX, P, CN, E, DA, RD, SXT, QDA, FOS, FD, OXA
Mãos dos consumidores após lavagem (n=4) P, CN, E, FOS, FD

FOX – Cefoxitina, P – Penicilina, CN – Gentamicina, E – Eritromicina, DA – Clindamicina, RD – Rifampicina, SXT – Trimetoprim/sulfametoxazole, QDA – Quinupristina/dalfopristina, FOS – Fosfomicina, FD – ácido Fusídico, OXA – Oxacilina, C – Cloranfenicol, TE – Tetraciclina, CIP – Ciprofloxacina.

Na Tabela 4.5 apresenta-se o perfil de resistência dos isolados por espécie. Quando analisamos o perfil de resistência das diferentes espécies estudo verificamos que *S. equorum* e *S. epidermidis* apresentaram resistência a um maior número de antibióticos de classes diferentes (Anexo 2).

Verificou-se uma maior resistência nas estirpes de *S. equorum* à clindamicina e oxacilina (16%). Foi também identificada uma maior resistência da espécie *S. saprophyticus* à oxacilina (26%), seguida da gentamicina (24%) e ácido fusídico (15%). A presença de resistência ao ácido fusídico foi também relatada por Fijałkowski et al. (2016) com valores ainda mais elevados (43%) dos que foram encontrados neste estudo.

A espécie *S. epidermidis* e os isolados do género *Staphylococcus spp.* foram resistentes a 11 dos 16 antibióticos em estudo. Estes resultados estão de acordo literatura, uma vez que altas taxas de resistência foram encontradas na espécie *S. epidermidis* (Otto 2009; Argudin 2015). A resistência aos antibióticos é um problema de saúde significativo, uma vez que esta espécie causa infecções (Otto 2009; ECDC 2018; Argudín 2015).

Curiosamente, *S. equorum* foi a espécie que seguiu *S. epidermidis* no número de antibióticos (11 de 16 antibióticos) aos quais os isolados apresentaram resistência. No entanto, dos isolados da espécie *S. equorum* que foram testados para resistência a antibióticos, a maior frequência de resistência foi encontrada em isolados provenientes do pavilhão auricular dos suínos, dos trabalhadores, da carne. Estes isolados foram resistentes principalmente à clindamicina e oxacilina. Também é importante notar que os isolados dos operários foram resistentes a um maior número de antibióticos do que os isolados da carne e do ambiente. Contudo, salienta-se o facto do perfil de resistência encontrado nos isolados da carne crua fatiada não corresponder a um perfil de multirresistência e não ser idêntico ao perfil de resistência encontrado nos isolados das mãos sujas ou limpas dos operários de sangria e do pavilhão auricular dos suínos.

A presença de *S. equorum* na carne de porco pode ser potencialmente problemática, uma vez que podem ser reservatórios de genes de resistência com potencial transferência horizontal para bactérias patogénicas presentes (Lee 2015; Fišarová 2019).

Os isolados de espécie *S. saprophyticus* apresentaram resistência a nove dos 16 antibióticos, principalmente à oxacilina, gentamicina e ácido fusídico. A maioria dos isolados

resistentes a antibióticos eram das superfícies das zonas de trabalho e da carne oferecida aos consumidores.

Os isolados de *S. carnosus* foram resistentes a vários antibióticos, 7 dos 16. Estes isolados *S. carnosus* foram encontrados principalmente associados aos consumidores. Em geral *S. carnosus* tiveram no seu perfil de resistência a antibióticos, a clindamicina, tetraciclina e ácido fusídico. Os membros desta espécie isolados de várias fontes tendem a apresentar alguma resistência a antibióticos. As resistências à lincomicina, penicilina, ácido fusídico, oxacilina, ampicilina e tetraciclina foram predominantes no trabalho de Resch (2008).

Os isolados de *S. xylosum* apresentaram resistência a seis antibióticos. *S. xylosum* têm sido associados a níveis de resistência mais baixa do que a apresentada por outros SCN não patogênicos, nomeadamente *S. equorum* e *S. carnosus*. Nestes, é comum encontrar resistência a vários antibióticos (Mikulášová 2013). De acordo com o trabalho de Resch (2008) observamos que entre os isolados de *S. xylosum*, a incidência de resistência variou de 22% para a tetraciclina até 69% para a penicilina predominando ainda resistências à lincomicina, ácido fusídico, oxacilina e ampicilina. Notavelmente, todos os SCN foram sensíveis aos antibióticos clinicamente importantes cloranfenicol, clindamicina, cotrimoxazol, gentamicina, canamicina, linezolid, neomicina, estreptomicina, sinercida e vancomicina.

A presença de resistência à eritromicina entre os isolados de *S. xylosum* do leite de vacas com mastite foi relatada por Kot et al. (2012) com valores mais elevados (19%) dos que foram encontrados neste trabalho. Entre os SCN, *S. xylosum* é encontrado na maioria dos produtos cárneos fermentados naturalmente e usado como cultura *starter*. No entanto, resistências a vários antibióticos, nomeadamente à eritromicina, penicilina e tetraciclina, foram relatadas em *S. xylosum* de produtos cárneos fermentados (Martín et al. 2006; Even et al. 2010; Marty et al. 2012).

A presença de SCN multirresistentes não é incomum, sendo problemática esta observação. Vários estudos encontraram a presença de SCN resistentes a pelo menos três classes de antibióticos em humanos, em produtos de origem animal e em produtos alimentares (Lee 2021; Bhargava 2012; Mikulášová 2013; Yang 2022; Marincola 2021). Algumas das bactérias multirresistentes encontradas nesses estudos pertenciam às espécies *S. xylosum*, *S. epidermidis* e *S. equorum*, o que é coerente com os resultados encontrados no presente estudo.

Tabela 4.5. Perfil de resistência dos isolados por espécies

Isolados	Cadeia de processamento	Perfil de resistência
<i>Staphylococcus xylosus</i>		
OS1S 112-5	Mãos sujas dos operários na zona sangria	CN
OD2S 116-5	Mãos sujas dos operários na zona desmancha	CN, CIP, E, DA
TS 1-4	Tapete sujo	OXA, TE
<i>Staphylococcus equorum</i>		
OS1S 112-4	Mãos sujas dos operários na zona sangria	OXA, E, DA, C, SXT, QDA, FOS
OS1S 112-3		OXA, E, DA, TE, SXT, FD
OS1L 113-2	Mãos limpas dos operários na zona sangria	CN, DA, TE
F1Ca-4	Carne crua	OXA, P, FD
S9P 100-5	Pavilhão auricular	OXA, CN, E, DA, TE, QDA, FD
S9P 100-2		OXA, E, DA, C, TE, FD
<i>Staphylococcus carnosus</i>		
F15Z1-3	Mãos dos consumidores antes de início de trabalho	FOS
F15Z2-1	Mãos dos consumidores após lavagem	FD
S5P 96-5	Pavilhão auricular	OXA, E, DA, FD
OS1S 112-2	Mãos sujas dos operários na zona sangria	DA, TE
P2-5	Pá	P, TE
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		
F20Z2-3	Mãos dos consumidores após lavagem	P, E, FOS
F9Z2-3		CN
F2Ca-3	Carne crua	OXA, FOX, P, CN, CIP, RD, FOS, FD
OS1L 113-3	Mãos limpos dos operários na zona sangria	OXA, P, CN, DA, TE
P1-5	Pá	P, TE
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>		
TL 1-5	Tapete limpo	OXA, FD
TS 1-1	Tapete sujo	OXA, CN, FD
T1-4	Aparas de carne	CN, E, TE, FD
T2-4		OXA, CN, FOS
E1-1	Entremeada	OXA, CN, E, FOS, FD
E5-2		OXA, TE
F15Ca-4	Carne crua	OXA, CN
F2Ca-5		OXA, TE
ML 1-5	Mesa limpa	OXA, CN, E, C, FD
P2-3	Pá	CN

OD2S 116-4	Mãos sujas dos operários na zona desmancha	OXA, P, CN, DA
<i>Staphylococcus spp.</i>		
F9Z2-5	Mãos dos consumidores após lavagem	P, FOS, FD
F16Cc-4	Carne cozinhada	OXA, FOX, CN, RD, SXT, FD
F20Z1-1		OXA, FOX, P, CN, E, DA, RD,
	Mãos dos consumidores antes de início de trabalho	SXT, QDA, FD
F15Z1-4		CN
F18Z1-5		P, E
F14Z3-3	Mãos dos consumidores após preparar a carne	OXA, P, E, DA, FD
OD2L 117-1	Mãos limpas dos operários na zona desmancha	OXA, CN, E

Na Figura 4.20 e 4.21 apresentam-se os dendrogramas dos perfis de antibioresistência dos 37 isolados SCN e sua relação com a fonte quer na linha abate na etapa de sangria, quer no ambiente da zona de desmancha, das superfícies das mesas, tapetes, mãos dos trabalhadores, peças de desmancha, aparas, e ainda na carne fornecida às famílias de consumidores e nas suas mãos.

Pela análise da Figura 4.20 que representa o dendrograma dos perfis de antibioresistência de 37 SCN estabeleceram-se três grandes clusters. O primeiro cluster reúne isolados recolhidos dos operários na zona sangria e das mãos dos consumidores. Neste cluster observamos espécies diferentes ou seja *S. carnosus*, *Staphylococcus* identificados apenas ao género, *S. epidermidis* e *S. equorum*. A maior semelhança de perfil de antibioresistência (78,7%) existe entre os isolados F18 e F20 que são espécies diferentes, recolhidas das mãos dos consumidores antes de início de trabalho e após lavagem, ou seja apresentam resistência aos antibióticos penicilina, eritromicina e fosfomicina. Um isolado OS1S 112-4 (*S. equorum*) que foi recolhido das mãos dos operários na zona sangria apresenta o maior perfil de resistência aos antibióticos incluindo no mesmo a oxacilina, eritromicina, clindamicina, cloranfenicol, trimetoprim/sulfametoxazole, quinupristina/dalfopristina e fosfomicina. O isolado F15Z1-3 (*S. carnosus*) que foi recolhido nas mãos dos consumidores antes do início de trabalho, apresenta ser suscetível à maioria dos antibióticos testados apresentando-se resistente apenas à fosfomicina.

O segundo cluster contém dois subclusters. O primeiro inclui os isolados de diferentes espécies *S. epidermidis*, *S. equorum* e isolados do género *Staphylococcus* com perfis de maior resistência recolhidos no pavilhão auricular de suínos, dos operários na zona sangria, tapete sujo e limpo, aparas de carne, das mãos dos consumidores. Todos os isolados apresentaram resistência ao ácido fusídico e são suscetíveis aos antibióticos linezolid e teicoplanina. O

isolado F15Z2-1 (*S. carnosus*) é o mais suscetível aos antibióticos. Uma maior frequência de perfis de multirresistência (ou seja, demonstraram resistência à oxacilina, cefoxitina, penicilina, gentamicina, ciprofloxacina, rifampicina, fosfomicina, ácido fusídico, eritromicina, clindamicina, trimetoprim/sulfametoxazole, quinupristina/dalfopristina e tetraciclina) caracterizou os isolados que foram recolhidos do pavilhão auricular (S9P 100-5 da espécie *S. equorum*), da carne crua fatiada que foi entregue a uma família (F2Ca-3, da espécie *S. epidermidis*) e das mãos dos consumidores antes do início de trabalho (F20Z1-1, isolado do género *Staphylococcus*). Não foi observada a possibilidade de contaminação cruzada neste subcluster.

O segundo subcluster representa a maior parte dos isolados da espécie *S. saprophyticus* recolhidos de diferentes origens (T2-4, E1-1, OD2L 117-1, ML1-5, OS1S 112-5, P2-3, OD2S 116-5). Todos os isolados foram resistentes à gentamicina e suscetíveis a linezolide, quinupristina/dalfopristina, trimetoprim/sulfametoxazole, teicoplanina, tetraciclina, rifampicina e fosfomicina.

O subgrupo dos isolados OS1S 112-5 (*S. xylosus*), P2-3 (*S. saprophyticus*), F15Z1-4 (*Staphylococcus*) e F9Z2-3 (*S. epidermidis*) que foram recolhidos das mãos dos operários na zona sangria, na pá, das mãos dos consumidores antes do início de trabalho e após lavagem apresentaram-se suscetíveis a todos os antibióticos testados com exceção da gentamicina. Não se consegue encontrar uma relação entre estes isolados pois são de fontes diferentes e de espécies diferentes.

No terceiro cluster estão incluídos os isolados de espécies diferentes recolhidos das mãos dos operários na zona sangria e também da desmancha, do tapete sujo, da entremeada e da pá (OS1S 112-2 (*S. carnosus*), OS1L 113-2 (*S. equorum*), OS2L 113-3 (*S. epidermidis*), OD2S 116-4 (*S. saprophyticus*), TS 1-4 (*S. xylosus*), E5-2 (*S. saprophyticus*), P1-5 (*S. epidermidis*), P2-5 (*S. carnosus*)).

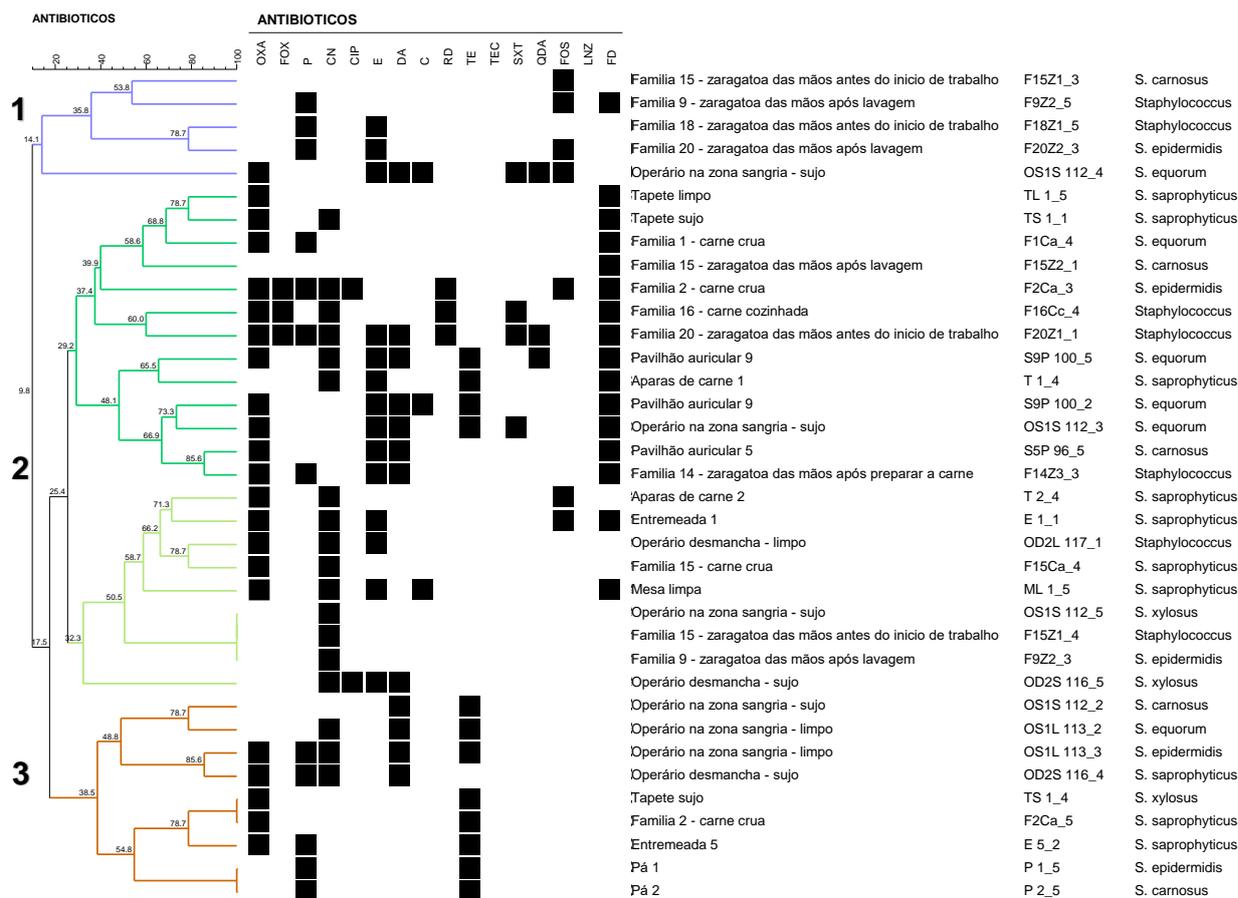


Figura 4.20. Dendrograma dos perfis de antibioresistência de 37 SCN

Na Figura 4.21 observa-se o dendrograma do perfil genético e de antibioresistência dos isolados SCN. Conseguem-se observar neste dendrograma dois grandes cluster cada um destes clusters agrega isolados com uma semelhança de aproximadamente 29% o que traduz a enorme diversidade encontrada quer de perfil genético quer de perfil de resistência a antibióticos.

O primeiro cluster é composto essencialmente pelas espécies *S. carnosus*, *S. epidermidis* e isolados do género *Staphylococcus* sendo difícil estabelecer qualquer relação entre eles pois foram isolados das mãos de consumidores de famílias diferentes. Mesmo no caso onde as semelhanças são na ordem dos 75%, como por exemplo para as estirpes OS1L 113-3 (*S. epidermidis*), F9Z2-5 (*Staphylococcus*), F20Z1-1 (*Staphylococcus*), F20Z2-3 (*S. epidermidis*), P2-5 (*S. carnosus*), F15Z1-3 (*S. carnosus*), não encontramos uma relação clara sobre a potencial contaminação cruzada entre carne e consumidores.

O segundo cluster é composto essencialmente pela espécie *S. saprophyticus*. Contudo, observou-se que no caso onde as semelhanças são na ordem dos 75%, elas ocorrem para as espécies F1Ca-4 *S. equorum* e F2Ca-5 *S. saprophyticus* devido à sua filogenia próxima tal como descrito por Nunes et al. (2015), assim a carne tendo sido produzida

e fatiada nas mesmas condições apresentou duas espécies diferentes com perfis de resistência diferentes. No caso das estirpes T2-4 (*S. saprophyticus*) e TS 1-1 (*S. saprophyticus*) com uma semelhança de 76,2%, uma contaminação cruzada entre o tapete e as aparas pode potencialmente ter ocorrido. Finalmente entre a estirpe E5-2 (*S. saprophyticus*) e a TL 1-5 (*S. saprophyticus*) com uma semelhança de 86,4%, a existência de contaminação cruzada entre a entremeada e o seu contacto com uma superfície limpa (tapete) também pode ser um hipótese plausível. Neste cluster não existe uma clara relação entre a carne e os consumidores, com uma potencial transferência de estirpes com resistência a antibióticos entre os dois. No entanto, o fato de as estirpes serem resistentes a antibióticos e de existirem muitas que são multirresistentes aumenta o perigo de transmissão de genes de resistência na cadeia de produção de carne de suíno.

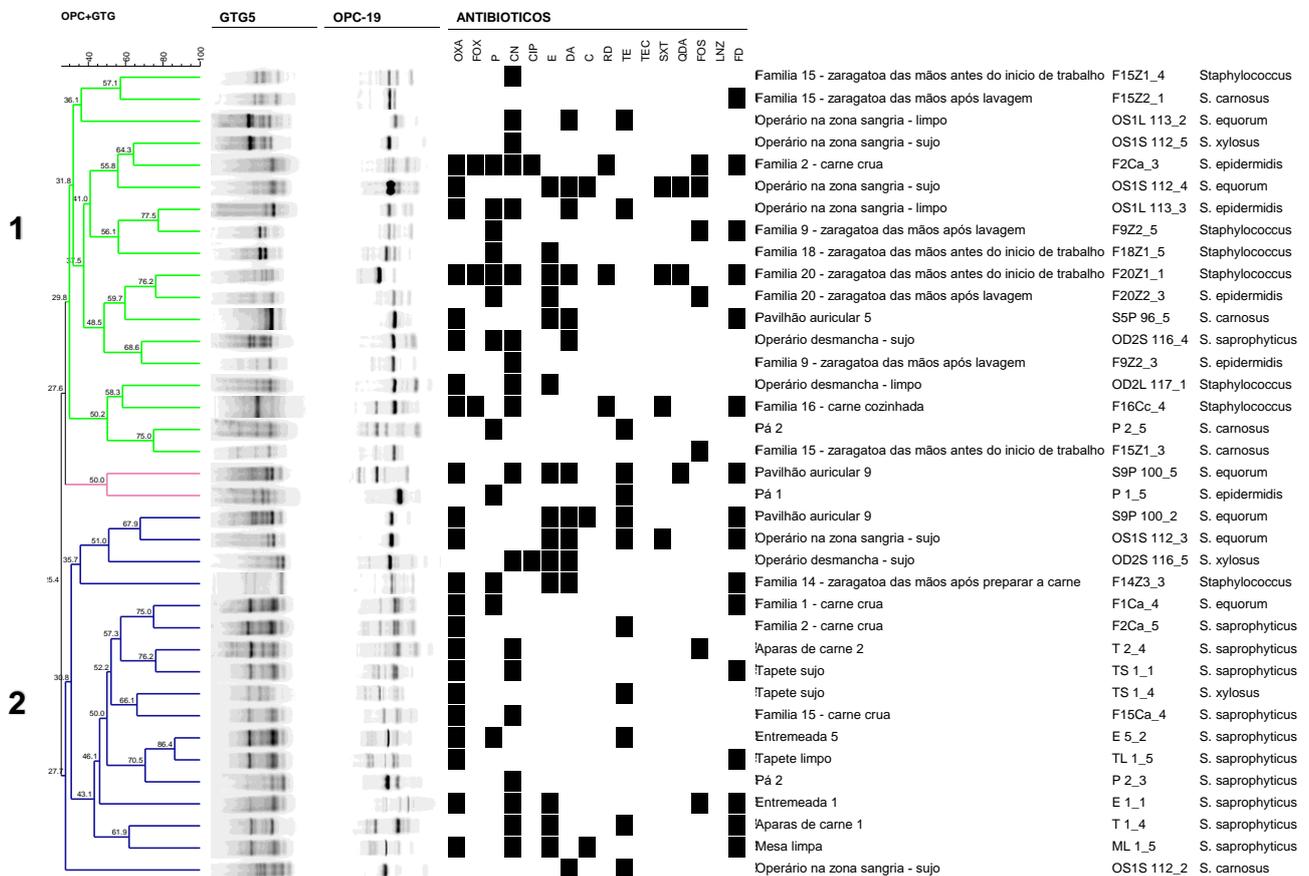


Figura 4.21. Dendrograma do perfil genético e de antibioresistência dos isolados SCN

Conclusões

Os 145 isolados de *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) apresentaram diferentes capacidades metabólicas para o manitol, uma vez que nem todos metabolizaram este açúcar ou o fizeram à mesma velocidade.

Nos isolados identificados genotípicamente como pertencentes ao gênero *Staphylococcus* foi possível identificar 3% isolados como *Staphylococcus xylosus*, 9% como *Staphylococcus equorum*, 14% como *Staphylococcus carnosus*, 14% como *Staphylococcus epidermidis*, 19% foram apenas identificados como *Staphylococcus spp.*, 36% como *Staphylococcus saprophyticus*.

Neste estudo, foi possível identificar que os principais SCN associados aos suínos pertenciam à espécie *S. equorum*, que também estavam presentes na carne, ambiente, operários e consumidores, enquanto os isolados de *S. carnosus* estavam presentes principalmente nos consumidores e na carne que lhes foi oferecida. Além disso, espécies patogênicas, *S. epidermidis* também foram isoladas principalmente nos consumidores e operários, e ainda na carne cozinhada.

Nos isolados de SCN estudados (n=37) cerca de 51% mostrou ser resistente à gentamicina e 58% à oxacilina. Os índices de resistência antimicrobiana dos isolados foram baixos para a cefoxitina (8%), ciprofloxacina (5%), rifampicina (8%), quinupristina/dalfopristina (8%) e cloranfenicol (8%). Não foram encontrados isolados com resistência aos antibióticos teicoplanina e linezolid. Cerca de 16% dos isolados SCN apresentaram resistência a pelo menos um antibiótico e 62% foram multirresistentes.

Verificou-se uma maior resistência nas estirpes de *S. equorum* à clindamicina e oxacilina (16%). Foi também identificada uma maior resistência da espécie *S. saprophyticus* à oxacilina (26%), seguida da gentamicina (24%) e ácido fusídico (15%).

Os isolados multirresistentes, foram principalmente das espécies *S. epidermidis* e *S. equorum*.

Verificou-se que o perfil de resistência encontrado nos isolados da carne fatiada não correspondiam a um perfil de multirresistência e não era idêntico ao perfil de resistência encontrado nos isolados das mãos sujas ou limpas dos operários da sangria e do pavilhão auricular dos suínos.

Não existe uma clara relação entre os perfis genéticos dos isolados de espécies SCN presentes na carne e nos consumidores, nem sobre a potencial transferência de estirpes com resistência a antibióticos entre os dois. No entanto, o fato de as estirpes serem resistentes a antibióticos e de existirem muitas que são multirresistentes aumenta o perigo de transmissão de genes de resistência na cadeia de produção de carne de suíno.

V. Referências Bibliográficas

Aarestrup FM, Jensen VF, Emborg H-D, Jacobsen E, Wegener HC. 2010. Changes in the use of antimicrobials and the effects on productivity of swine farms in Denmark. *Am. J. Vet. Res.* 71, 726 – 733 (doi:10.2460/ajvr.71.7.726).

Agda do Carmo P. 2010. Vinagre Braga, Angela Pires Brandão, Cecilia Helena V. F. G. Carvalhaes, Itacy Siqueira. Manual - Modulo 4. Gram – Positivos. [Internet]. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [Accessed 2010]. https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/objetivos.htm

Alatoom AA, Cunningham SA, Ihde SM, Mandrekar J, Patel R. 2011. Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of Gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology.* v. 49, p. 2868–2873.

Allison DG, Lambert P. 2015. Modes of Action of Antibacterial Agents. *Molecular Medical Microbiology.* 2. ed. Amsterdam : Elsevier BV, p. 583-597.

[Anvisa] Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2007. Antimicrobianos – bases teóricas e uso clínico. Parte III. Antimicrobianos - principais grupos disponíveis para uso clínico. https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_w eb/modulo1/macrolideos.htm

[Anvisa] Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2013. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica / Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 150p, 9 volumes – Brasília: Anvisa, 2013.

Amaro A, Correia I, Clemente L. 2020 Aug 5. Resistência aos antibióticos em bactérias com origem em animais da cadeia alimentar. Projeto PTDC/CVT-CVT/28469/2017. [Internet]. Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária (INIAV). [accessed 2020 Agosto 5] <https://www.veterinaria-atual.pt/destaques/resistencia-aos-antibioticos-em-bacterias-com-origem-em-animais-da-cadeia-alimentar/>.

Argudín MA, Vanderhaeghen W, Butaye P. 2015. Antimicrobial resistance and population structure of *Staphylococcus epidermidis* recovered from pig farms in Belgium. *The Veterinary Journal* 203, p. 302–308.

Aryal S. 2019. Mannitol Salt Agar for the isolation of *Staphylococcus aureus*. [Internet]. [Accessed 2022 August 10]. <https://microbiologyinfo.com/mannitol-salt-agar-for-the-isolation-of-staphylococcus-aureus/>.

Azelmad K, Hamadi F, Mimouni R, Amzil K, Latrache H, Mabrouki K, Boulani EI. 2017. Adhesion of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus xylosus* to materials commonly found in catering and domestic kitchens. *Food Control.* Elsevier. Volume 73, Part B, March 2017, Pages 156-163.

Bannerman TL. 2003. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. *Manual of Clinical Microbiology*, American Society Microbiology, Washington, p. 384-404.

Bannerman TL, Kleeman KT, Kloos WE. 1993. Evaluation of the Vitek systems Gram-positive identification card for species identification of coagulase-negative staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*. 31: p. 1322-1325.

Bambeke F, Michot JM, Eldere J, Tulkens PM. 2005. Quinolones in 2005: an update. *Clinical Microbiology and Infection*, v.11, p. 256-280.

Bauer A, Kirby W, Sherris J, Turk M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standard single disc diffusion method. *Am J Clin Pathol*;45(4): p. 493-496.

Beceiro A, Tomás M, Bou G. 2013. Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World? *Clinical Microbiology Reviews* 26, p. 185-230. doi:10.1128/CMR.00059-12.

Becker K, Lahom NA, Fegeler W, Proctor RA, Peters G, von Eiff C. 2006 Sep. Fourier-transform infrared spectroscopy analysis as a powerful tool for studying the dynamic changes in *Staphylococcus aureus* small colony variants. *Jornal Clinical Microbiology*, 44:3274-8.

Becker K, von Eiff C. 2011. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci, In Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW. *Manual of clinical microbiology*, 10th ed. ASM Press, p. 308-330.

Becker K, Heilmann C, Peters G. 2014. Coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*. October 2014;27(4): p.870-926.

Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn M, et al. 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection*. v.13, p.1-46.

Bannerman T, Gotz F, Schleifer KH. 2006. The genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Dworkin, M. (Ed.), *The Prokaryotes*, vol. 4. Springer, New York, p. 5-75.

Bertoncheli CM, Horner R. 2008. Uma revisão sobre metalo- β -lactamases. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. v. 44, n. 4:577-99.

Blaiotta G, Casaburi A, Villani F. 2005. Identification and differentiation of *Staphylococcus carnosus* and *Staphylococcus simulans* by species-specific PCR assays of *sodA* genes. *Systematic and Applied Microbiology*, 28, p. 519-526.

Blair JMA. et al. 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*. v. 13, n. 1:42-51.

Blaiotta G, Ercolini D, Mauriello G, Salzano G, Villani F. 2004. Rapid and reliable identification of *Staphylococcus equorum* by a Species-Specific PCR Assay targeting the *sodA* gene, *Systematic and Applied Microbiology*, 27, p. 696-702.

Bhargava K, Zhang Y. 2012. Multidrug-Resistant Coagulase-Negative Staphylococci in Food Animals. *Journal of Applied Microbiology* 113, p. 1027-1036.

Bhargava K, Zhang Y. 2014. Characterization of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci (MRCoNS) in retail meat. *Food Microbiol*. 42, p. 56-60.

Bhumbra S, Mahboubi M, Blackwood A. 2014. *Staphylococcus lugdunensis*: novel organism causing cochlear implant infection. *Infect Dis Rep*. 6(2): 5406.

Boelter R. 1998. Resíduos de antibióticos nos alimentos de origem animal. In: Magalhães HM, organizador. Farmacologia veterinária – temas escolhidos. Guaíba: Agropecuária.

Bolon MK. 2011. The newer fluoroquinolones. Medical Clinics of North America. 2011 July; 95(4): p. 793- 817, viii.

Brian J. Werth. 2020. Considerações gerais sobre antibióticos. Manual MSD. [Internet]. PharmD, University of Washington School of Pharmacy. [Accessed 2020 Julho] <https://www.msdmanuals.com/pt-pt/casa/infec%C3%A7%C3%B5es/antibi%C3%B3ticos/considera%C3%A7%C3%B5es-gerais-sobre-antibi%C3%B3ticos>.

Brian J. Werth. 2022. Bactérias e fármacos. Sulfonamidas. Manual MSD. [Internet]. PharmD, University of Washington School of Pharmacy. [Accessed 2022 May] <https://www.msdmanuals.com/pt-profissional/doen%C3%A7as-infeciosas/bact%C3%A9rias-e-f%C3%A1rmacos-antibacterianos/sulfonamidas>

Brown GM. 1962 Feb. The biosynthesis of folic acid. The Journal of Biologic Chemistry, 237:536-540.

Caierão J, Musskopf M, Superti S, Roesch E, Dias CG, d'Azevedo PA. 2004. Evaluation of phenotypic methods for methicillin resistance characterization in coagulase-negative staphylococci (SCN). J Med Microbiol. 54 (Pt 12):1195-9.

Cameron D, Jiang JH, Hassan K, Elbourne L, Tuck K, Paulsen I, Peleg A. 2015. Insights on virulence from the complete genome of Staphylococcus capitis. Frontiers in Microbiology 0, 980.

[CDC] Centers for Disease Control and Prevention. 2013. Antibiotic resistance threats in the United States. Current, p. 114.

Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, Day N, et al. 2011. mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. Clinical Biochemistry. v. 44, p. 104–109.

Carvalho LM. 2010. Identificação e caracterização de isolados de Staphylococcus: sua utilização como culturas de arranque em enchidos fermentados e fumados. [dissertação de mestrado]. Faculdade de Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

Cervantes HM. 2010 Feb 5. El futuro de los antibióticos en la producción animal. Indústria Avícola; p. 14-18.

Chajęcka-Wierzchowska W, Zadernowska A, Nalepa B, Sierpińska M, Łaniewska-Trokenheim L. 2015. Coagulase-negative staphylococci (CoNS) isolated from ready-to-eat food of animal origin – Phenotypic and genotypic antibiotic resistance. Food Microbiology. Volume 46, april 2015, pages 222-226.

Cheng G, Hao H, Dai M, Liu Z, Yuan Z. 2013 Aug. Antibacterial action of quinolones: From target to network. European Journal of Medicinal Chemistry 66: p. 555–562.

Chopra I, Hawkey PM, Hinton M. 1992. Tetracyclines, molecular and clinical aspects. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 29:245-277.

Chopra I, Roberts MC. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65:232-260.

[CLSI] Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. 4th ed. CLSI supplement VET08. ISBN 978-1-68440-010-2; ISBN 978-1-68440-011-9.

Conlan S, Mijares L, NISC Comparative Sequencing Program, Becker J, Blakesley RW, Bouffard GG, Brooks S, Coleman H. 2012 Jul 25. Staphylococcus epidermidis pan-genome sequence analysis reveals diversity of skin commensal and hospital infection-associated isolates. *Genome Biology*; 13(7): p. 64.

Cookson B. 1998. The emergence of mupirocin resistance: a challenge to infection control and antibiotic prescribing practice. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41, p. 11-18.

Cunha MLRS, Sinzato YK, Silveira LVA. 2004. Comparison of methods for the identification of coagulase-negative staphylococci. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* v. 99, p. 855-860.

Davies J, Wright G. 1997. Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. *Trends in Microbiology*, 5, p. 234-240.

Decristophoris P, Fasola A, Benagli C, Tonolla M, Petrini O. 2011. Identification of Staphylococcus intermedius Group by MALDI-TOF MS. *Systematic and Applied Microbiology*. v. 34, p. 45–51.

Delmas J, Chacornac JP, Robin F, et al. 2008. Evaluation of the Vitek 2 System with a Variety of Staphylococcus Species. *Jornal Clin Microbiol*; 46(1): p. 311–313.

Dewulf J, Sternberg-Lewerin S, Ryan M. 2020. Tackling antimicrobial resistance in the food and livestock sector. Cambridge University Press. *Challenges to Tackling Antimicrobial Resistance Economic and Policy Responses*, pp. 99–124. DOI: <https://doi.org/10.1017/9781108864121.006>.

Diekema DJ, Pfaller MA, Schmitz FJ et. al. 2001. Survey of infections due to Staphylococcus species: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, Latin America, Europe, and the Western Pacific region for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin Infect Dis*. 32 (suppl 2): p. 114-132.

Dordet-Frisoni E, Dorchies G, Araujo C, Talon R, Leroy S. 2007. Genomic Diversity in Staphylococcus xylosus. *Applied and Environmental Microbiology* 73, 7199.

Drawz SM, Bonomo RA. 2010 Jan. Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. *Clinical Microbiology Reviews* 23(1): 160-201.

Dzidic S, Suskovic J, Kos B. 2008. Antibiotic resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. *Food Technology Biotechnology*. 46(11), p. 11-21.

[ECDC] European Centre for Disease Prevention and Control, [EFSA] European Food Safety Authority, [EMA] European Medicines Agency. 2015. ECDC/EFSA/EMA first joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. *EFSA Journal*;13(1):4006, p. 114.

[ECDC] European Centre for Disease Prevention and Control. 2018. Main conclusions and options for prevention and control Rapid Risk Assessment Multidrug-resistant *Staphylococcus epidermidis*.

Economou V, Gousia P. 2015 Apr 1. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial resistant bacteria. PMID: 25878509.

Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN, Wenzel RP. 1999. Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis* 1999; 29:239–44.

[EMA] European Medicines Agency, 231573. 2016. Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health. 26 May 2016.

[EMA] European Medicines Agency, 688114. 2020. Categorisation of antibiotics used in animals promotes responsible use to protect public and animal health. 28 January 2020.

[ESVAC] European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption. 2022. Country reports on sales trends (2010-2021). EMA/767013/2022. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/veterinary-regulatory/overview/antimicrobial-resistance/european-surveillance-veterinary-antimicrobial-consumption-esvac>

[EUCAST] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Disk Diffusion Method for Antimicrobial Susceptibility Testing. Version 10. January 2022. Available from: www.eucast.org.

[EUCAST] Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Avril 2020. Available from: www.eucast.org.

Euzeby JP. 2014. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). [Internet]. [Accessed 2014 Janeiro 18]. <http://www.bacterio.cict.fr/s/staphylococcus.html>.

Euzéby JP. 2018. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature – Genus *Staphylococcus*. [Accessed 2018 March 22]. <http://www.bacterio.net/s/staphylococcus.html>.

Even S, Leroy S, Charlier C, Ben Zakour N, Chacornac JP, Lebert I. 2010. Low occurrence of safety hazards in coagulase negative staphylococci isolated from fermented foodstuffs. *International Journal of Food Microbiology*. 139, 87–95. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.019.

[FAO] Food and Agriculture Organization. 2016. Drivers, dynamics and epidemiology of antimicrobial resistance in animal production. ISBN 978-92-5-109441-9.

Ferreira Duarte Karina. 2020. Panorama do uso de antibióticos na nutrição animal. [Internet]. [Accessed 2020 Janeiro 2] <https://nutricaoesaudeanimal.com.br/uso-de-antibioticos-na-nutricao-animal/>.

Fernandes R, Amador P, Prudencio C. 2013. Beta-Lactams: Chemical Structure, Mode of Action and Mechanisms of Resistance. Volume 24, Número 1, p. 7-17 (11).

Fijałkowski K, Peitler D, Karakulska J. 2016. Staphylococci isolated from ready-to-eat meat – Identification, antibiotic resistance and toxin gene profile. *International Journal of Food Microbiology*. Volume 238. 5 December 2016, p. 113-120.

Fines M, Perichon B, Reynolds P, Sahm DF, Courvalin P. 1999. VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43, p. 2161-2164.

Finley RL, Collignon P, Larsson DGJ, McEwen S, Gaze WH, Reid-Smith R, Timinouni M, Graham D. e Topp E. 2013 May 30. The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. *Clinical Infectious Diseases*. 57(5): 704-10.

Fišarová L, Pantůček R, Botka T, Doškař J. 2019. Variability of resistance plasmids in coagulase-negative staphylococci and their importance as a reservoir of antimicrobial resistance. *Research in Microbiology* 170, p. 105–111.

Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ. 2001 Oct. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 14:837-871.

García P, Rodríguez L, Rodríguez A, Martínez B. 2010 Aug. Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. *Trends in Food Science and Technology*. 21(8): 373-82.

Georgopapadakou NH. 1993. Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to beta-lactams. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37, p. 2045-2053.

Ghebremedhin B, König W, König B. 2008. Genetic classification and distinguishing of *Staphylococcus* species based on different partial gap, 16S rRNA, hsp60, rpoB, sodA, and tuf gene sequences. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 46: p. 1019-1025.

Giguère S, Prescott JF, Baggot J, Walker R, Dowling P. 2013. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine* (5^a ed.). Iowa, USA: John Wiley & Sons, Inc.

Gillespie MT, Lyon BR, Loo LS, Mathhews PR, Stewart PR, Skurray RA. 1987. Homologous direct repeat sequences associated with mercury, methicillin, tetracycline and trimethoprim resistance in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters*, 43: p.165-171.

Giormezis N, Kolonitsiou F, Foka A, Drougka E, Liakopoulos A, Makri A, Papanastasiou AD, Vogiatzi A, Dimitriou G, Marangos M, Christofidou M, Anastassiou ED, Petinaki E, Spiliopoulou I. 2014 Jul 31. Coagulase-negative staphylococcal bloodstream and prosthetic-device-associated infections: the role of biofilm formation and distribution of adhesin and toxin genes. *Jornal of Medical Microbiology*. 63(Pt 11):1500-1508.

Goodman and Gilman's. 2008. *Manual of Pharmacology and Therapeutics*. 2nd Edition. Nova Iorque: McGraw Hill.

Griffith DE. 2019. *Mycobacterium abscessus* and Antibiotic Resistance: Same As It Ever Was. *Clinical Infectious Diseases* 2019; 69:1687. Hennekinne JA, De Buyser ML, Dragacci S. 2012. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FEMS Microbiol Rev*. 36:815-36.

Guimarães DO, Momesso LS, Pupo MT. 2010. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quím. Nova* 33 (3).

Hauschild T, Stepanovic S. 2008. Identification of *Staphylococcus* spp. by PCRrestriction fragment length polymorphism analysis of *dnaJ* gene. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 46, p. 3875–3879.

Heikens E, Fleer A, Paauw A, Florijn A, Fluit AC. 2005. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 43: p. 2286-2290.

Heo S, Lee JH, Jeong DW. 2020. Food-Derived Coagulase-Negative *Staphylococcus* as Starter Cultures for Fermented Foods. *Food Science and Biotechnology* 29, p. 1023–1035.

Hoek AH., Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, Aarts HJM. 2011 Sep 28. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front. Microbiol.* 2, p. 1–27.

Janssens M, Myter N, de Vuyst L, Leroy F. 2012. Species diversity and metabolic impact of the microbiota are low in spontaneously acidified Belgian sausages with an added starter culture of *Staphylococcus carnosus*. *Food Microbiology* 29, p. 167–177.

Kadlec K, Schwarz S. 2012. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius*. *Veterinary Dermatology*, 23:276-e55.

Kamath U, Singer C, Isenberg HD. 1992. Clinical significance of *Staphylococcus warneri* bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology* 30, p. 261.

Kanuparth A, Challa T, Meegada S, Siddamreddy S, Muppidi V. 2020. *Staphylococcus warneri*: Skin Commensal and a Rare Cause of Urinary Tract Infection. *Cureus* 12.

Kathie L, Rogers PhD, Paul D. FeyPh, DabMark E. Rupp MD. 2009 Mar. Coagulase-Negative Staphylococcal Infections. Department of Pathology and Microbiology, University of Nebraska Medical Center. *Infectious Disease Clinics of North America*. 23(1):73-98.

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

Kemnic TR, Coleman M. 2022. Trimethoprim Sulfamethoxazole. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. 2022 Nov 28. PMID: 30020604. Bookshelf ID: NBK513232.

Kirst HA, Thompson DG, Nicas TI. 1998. Historical yearly usage of vancomycin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42, p. 1303-1304.

Khiralla GM. 2019. Technological Activities and Antibiofilm Effect of *Staphylococcus Equorum* Isolated from Fermented Sausage. *Journal of Food Engineering and Technology* 8, p. 22–28.

Kloos WE, Schliefer KH. 1975. Simplified scheme for routine identification of human *Staphylococcus* species. *Journal of Clinical Microbiology*. v.1:82-88.

Kloos WE, Bannerman TL. 1994. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci. *Clin Microbiol Rev* 7: p. 117-140.

Kloos WE, Bannerman TL. 1999. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. Washington: American Society Microbiology; p. 264-82.

Kosecka-Strojek M, Buda A, Międzobrodzki J. 2018. Staphylococcal Ecology and Epidemiology. Pet-to-Man Travelling Staphylococci: A World in Progress, p. 11–24. doi:10.1016/B978-0-12-813547-1.00002-9.

Kot B, Piechota M, Antos-Bielska M, et al. 2012. Antimicrobial resistance and genotypes of staphylococci from bovine milk and the cowshed environment. *Pol J Vet Sci.* 2012;15(4):741–749. doi:10.2478/v10181-012-0113-4.

Kotra LP, Haddad J, Mobashery S. 2000. Aminoglycosides: perspectives on the mechanism of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, p. 3249-3256.

Kwok AYC, Wilson JT, Coulthart M, Mutharia L, Chow AW. 2002. Phylogenetic study and identification of human pathogenic *Vibrio* species based on partial hsp60 gene sequences. *Canadian Journal of Microbiology.* v. 48, p. 903–910.

Kwok AYC, Chow AW. 2003. Phylogenetic study of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species based on partial hsp60 gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* v. 53, p. 87–92.

Lambert T. 2012. Antibiotics that affect the ribosome. *Rev. Sci. Tech.* 31:57-64.

Lawal OU, Fraqueza MJ, Bouchami O, Worning P, Bartels MD, Gonçalves ML, Paixão P, Gonçalves E, Toscano C, Empel J, Urbaś M, Domínguez MA, Westh H, Lencastre H, Miragaia M. 2021. Foodborne Origin and Local and Global Spread of *Staphylococcus saprophyticus* Causing Human Urinary Tract Infections. Volume 27, Number 3, March 2021. *Emerging Infectious Diseases journal, CDC. Emerging Infectious Diseases* 27, p. 880–893.

Lawal OU, Barata M, Fraqueza MJ, Worning P, Bartels MD, Goncalves L, Paixão P, Goncalves E, Toscano C, Empel J, Urbaś M, Domínguez MA, Westh H, de Lencastre H, Miragaia M. 2021. *Staphylococcus saprophyticus* From Clinical and Environmental Origins Have Distinct Biofilm Composition. *Frontiers in Microbiology* 0, p. 1255.

Laxminarayan R et al. 2013. Antibiotic resistance: the need for global solutions. *Lancet Infect. Dis.* 13, 1057 – 1098 (doi:10.1016/S1473-3099(13)70318-9).

Layer F, Ghebremedhin B, Moder KA, et al. 2006. Comparative study using various methods for identification of *Staphylococcus* species in clinical specimens. *J Clin Microbiol;* 44(8): p. 2824–2830.

Leclercq R. 2002. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin. Infect. Dis.* 34: p. 482-492.

Lee JH, Park HS, Jamg WJ, Koh SE, Kim JM, et la. 2003. Differentiation of rickettsiae by groEL gene analysis. *Journal of Clinical Microbiology.* v. 41, p. 2952–2960.

Lee JH, Jeong DW. 2015. Characterization of Mobile *Staphylococcus equorum* Plasmids Isolated from Fermented Seafood That Confer Lincomycin Resistance. *Plos One* 10.

Lee GY, Yang SJ. 2021. Profiles of coagulase-positive and -negative staphylococci in retail pork: prevalence, antimicrobial resistance, enterotoxigenicity, and virulence factors. *Animal Bioscience* 34, p. 734.

Lee E, Anjum F. 2022. *Staphylococcus Epidermidis*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing.

Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X. 2015 Nov 19. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infectious Disease*. Feb;16(2):161-8. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7.

MacDiarmid SC. 1993. Risk analysis and the importation of animals and animal products. *Rev Sci Tech*. 12:1093-107.

MacFaddin JF. 2000. Coagulase Test. *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 105-19, p. 78-97.

Mamfe LM, Chinedu A, Akwuobu, Emmanuel O. 2021. Phenotypic detection, antimicrobial susceptibility and virulence profile of staphylococci in the pig production setting, Makurdi, Nigeria. *Access Microbiology* 2021; 3:000293. DOI 10.1099/acmi.0.000293.

[MCD] Center for Molecular Diagnostics. 2021. Infections caused by staphylococci. [Internet]. Moscow, Russia: Center for Molecular Diagnostic. [Accessed 2021]. <https://www.cmd-online.ru/vracham/spravochnik-vracha/infektsii-vyzyvaemye-stafilokokkami/>.

McDermott PF, Walker R, White DG. 2003. Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. *International Journal of Toxicology*, 22: p. 135-143.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey R, Carmeli Y, Falagas ME, Giske C, Harbarth S, Hindler J, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, march 2012, volume 18, pp. 268–281.

Malouin F, Bryan L. 1986. Modification of Penicillin-binding proteins as mechanism of betalactam resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 30, p. 1-5.

Marincola G, Liang O, Schoen C, Abouelfetouh A, Hamdy A, Wencker FDR, Marciniak T, Becker K, Köck R, Ziebuhr W. 2021. Antimicrobial Resistance Profiles of Coagulase-Negative Staphylococci in Community-Based Healthy Individuals in Germany. *Front Public Health* 9, 684456.

Marshall BM, Levy SB. 2011 Oct. Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. *Clinical Microbiology Reviews* 24: 718–733.

Martín B, Garriga M, Hugas M, Bover-Cid S, Veciana-Nogues MT, Aymerich T. 2006. Molecular, technological and safety characterization of Gram-positive catalase-positive cocci from slightly fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 107, 148–158. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.024.

Marty E, Bodenmann C, Buchs J, Hadorn R, Eugster-Meier E, Lacroix C. 2012. Prevalence of antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci from spontaneously fermented meat products and safety assessment for new starters. *International Journal of Food Microbiology* 159, 74–83. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.07.025.

Mathew A, Cissel R, Liamthong S. 2007 Dez 4. Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a united states perspective of livestock production. *Foodborne Pathogens and Disease*, 4:2: p. 115-133.

Medley. 2007. Antibióticos. Programa de Desenvolvimento Profissional ao Farmacêutico. Ano II nº 9.

Mérens A. 2010. Mécanismes et épidémiologie de la résistance aux fluoroquinolones en 2010. *Revue Francophone des Laboratoires* 422, p. 33–41.

Miljkovic-Selimovic J et al. 2007. Bacterial Plasmids. *Acta Medica Medianae*. vol. 46, n. 4, p. 61-65.

Mikulášová M, Valáriková J, Dušínský R, Chovanová R, Belicová A. 2013. Multiresistance of *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus equorum* from Slovak Bryndza cheese. *Folia Microbiologica* 2013 59:3 59, p. 223–227.

Mingeot-Leclercq M, Glupczynski Y, Tulkens P. 1999. Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43, p. 727-737.

Mixão MP. 2020. Europa aprova nova classificação dos antibióticos veterinários. [Internet]. Agência Europeia de Medicamentos. [Accessed 2020 Janeiro 29] <https://www.veterinaria-atual.pt/na-pratica/europa-aprova-nova-classificacao-dos-antibioticos-veterinarios/>.

Munita JM, Arias CA. 2016. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4, p. 1–37.

Murray P, Rosenthal K, Pealler M. 2005. *Medical Microbiology*. Fifth edition. Elsevier Mosby, USA.

Nikaido H. 2009. Multidrug Resistance in Bacteria. *Annual Review of Biochemistry* 78:8, p. 28.

Nguyen TH, Park MD, Otto M. 2017. Host Response to *Staphylococcus epidermidis* Colonization and Infections. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7:90. doi:10.3389/fcimb.2017.00090.

Nogueira HS, Xavier MAS, Carvalho AA, Barreto NAP. 2016 Jul-Dez. Antibacterianos: principais classes, mecanismos de ação e resistência. *Montes Claros*, v. 18, n.2. (ISSN 2236-5257). Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. 2002. Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, p. 1-11.

[NRC] National Research Council (US) Committee on Drug Use in Food Animals. 1999. *The Use of Drugs in Food Animals: Benefits and Risks*. Chapter 8: Approaches to Minimizing Antibiotic Use in Food-Animal Production. Washington (DC): National Academies Press (US).

Nunes R, Aguila E, Paschoalin V. 2015. Safety evaluation of the coagulase-negative staphylococci microbiota of salami: superantigenic toxin production and antimicrobial resistance. *Hindawi Publishing Corporation. BioMed Research International*, 483548, 17 pages.

Ogawara H. 1981. Antibiotic resistance in pathogenic and producing bacteria, with special reference to beta-lactam antibiotics. *Microbiological reviews*, 45:591-619.

Opal SM, Pop-Vicas A. 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. In: Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases / [edited by] John E. Bennett, Raphael Dolin, Martin J. Blaser. – Eighth edition. Philadelphia: Elsevier 2015: p. 234-251.

Osman KM, Abd El-Razik KA, Marie HSH, Arafa A. 2015 Aug 16. Coagulase-negative staphylococci collected from bovine milk: species and antimicrobial gene diversity. *Journal of Food Safety*. 36: p. 89–99.

Osmon DR, Sampathkumar P, Cockerill FR. 2000. Prosthetic joint infection due to *Staphylococcus lugdunensis* *Mayo Clinic Proceedings* 75, p. 511-512.

Otto M. 2009. *Staphylococcus epidermidis* – the «accidental» pathogen. *Nat Rev Microbiol* 7:555.

Paul G. Auwaerter M. 2021. Staphylococci, coagulase negative. [Internet]. Virginia, Corporate Headquarters, USA: Johns Hopkins Medicine. [Accessed 2021 Juho 04]. https://www.hopkinsguides.com/hopkins/view/Johns_Hopkins_ABX_Guide/540517/all/Staphylococci_coagulase_negative.

Park HR, Kim TH, Bark KM. 2002. Physicochemical properties of quinolone antibiotics in various environments. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.37, p. 443-460.

Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Sader HS, Kugler K, Beach ML. 1999 Apr. Survey of blood stream infections attributable to gram-positive cocci: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, Latin America from SENTRY antimicrobial surveillance program. SENTRY Participants Group. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 33 (4): 283-97.

Perichon B, Reynolds P, Courvalin P. 1997. VanD-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* BM4339. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41, p. 2016-2018.

Piessens V. 2011. Epidemiology and characterization of coagulase-negative *Staphylococcus* species from dairy farms. [dissertação de doutorado]. Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Belgica.

Pinheiro L, Brito CI, Oliveira A, Martins PY, Pereira VC, Cunha L. 2015 Sep 14. *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus haemolyticus*: molecular detection of cytotoxin and enterotoxin genes. *Toxins*. 7(9):3688-99.

Public Health England. 2019. UK Standards for Microbiology Investigations. Catalase test. Issued by the Standards Unit, National Infection Service, PHE. *Bacteriology – Test Procedure*, TP 8, Issue no: 4:14.

Ramsey MA, Bradley SF, Kauffman CA, Morton TM. 1996. Identification of chromosomal location of *mupA* gene, encoding low-level mupirocin resistance in staphylococcal isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40, p. 2820-2823.

Resch M, Nagel V, Hertel C. 2008. Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci associated with food and used in starter cultures. *International Journal of Food Microbiology* 127, p. 99–104.

Regitano JB, Leal RMP. 2010. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. *Revista Brasil Ciência*; 34(3): 601:16.

Renneberg J, Rieneck K, Gutschik E. 1995. Evaluation of Staph-Id-32 system and Staph-Zym system for identification of coagulase-negative staphylococci. *Journal of Clinical Microbiology*. 33: p. 1150-1153.

Rice L, Bonomo R. 2005. Genetic and Biochemical mechanisms of bacterial. Em Viclor Lorian, M. D. (Eds). Antibiotics in Laboratory Medicine. Nova Iorque. 5ª ed., p. 441-476.

Riesen A, Perreten V. 2009 Oct 9. Staphylococcus rostri sp. nov., a haemolytic bacterium isolated from the noses of healthy pigs. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 60(Pt 9): 2042-2047.

Roberts MC. 2006. Update on acquired tetracycline resistance genes. FEMS Microbiology Letters, 245:195-203.

Roth B, Falco E, Hitchings G, Bushby S. 1962. 5-benzyl-2,4-diaminopyrimidines as antibacterial agents. I. Synthesis and antibacterial activity in vitro. Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry, 91:1103-1123.

Rupp M. 2019 Jan 19. Coagulase negative Staphylococci. [Internet]. Infectious Disease Advisor. [Accessed 2019 January 19]. <https://www.infectiousdiseaseadvisor.com/home/decision-support-in-medicine/infectious-diseases/coagulase-negative-staphylococci/>.

Salgado BAB. 2012. Identificação Molecular e Caracterização da Resistência à Mupirocina de Cepas de Staphylococcus spp. de Origem Canina. [dissertação de mestrado]. Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Departamento de Microbiologia Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Sampimon O, Barkema HW, Berends I, Sol J, Lam T. 2009. Prevalence of intramammary infection in Dutch dairy herds. Journal of Dairy Science. v. 76: p. 129-136.

Santos AL, Santos DO, Carlos de Freitas C, Alves Ferreira BL, Rodrigues CR, Castro HC. 2007. Staphylococcus aureus: Visiting a strain of clinical importance. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial 43(6):413-423, dezembro 2007. DOI:10.1590/S1676-24442007000600005.

Sarkozy G. 2001. Quinolones: a class of antimicrobial agents. Veterinarni Medicina, v.46, n.9/10, p. 257-274.

Shale K, Lues J, Venter P, Buys E. 2005. The distribution of Staphylococcus sp. on bovine meat from abattoir deboning rooms. Food Microbiology 22: p. 433-438.

Siqueira JF, KC L. 2002. Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus xylosus in a secondary root canal infection with persistent symptoms: a case report. Aust Endod J 28, p. 61-63.

Soares LC. 2010. Correlação entre marcadores fenotípicos e genotípicos de virulência e resistência à oxacilina ea Staphylococcus spp. coagulase-negativos isolados a partir de mastite bovina. [dissertação de doutorado]. Instituto de Veterinária.

Soares MC. 2018. Revisão sobre o uso de antibióticos em animais de produção e suas ligações à resistência antimicrobiana em medicina humana. Simpósio «Soluções de nutrição animal contras as resistências antimicrobianas», Faculdade de Medicina Veterinária. Grupo Valouro, IACA.

Sousa JC. 2006. Manual de antibióticos antibacterianos (2ª edição). Porto: edições Universidade Fernando Pessoa: Fundação Fernando Pessoa, cop. 2006. - 686 p.: il.; 28 cm. Contém bibliografia. - ISBN 972-8830-49-1

Sousa IC. 2007. Interação da Enrofloxacin com modelos biomembranares: influência das suas propriedades físicoquímicas. [dissertação de mestrado]. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Lisboa, Portugal.

Speer BS, Shoemaker NB, Salyers AA. 1992. Bacterial resistance to tetracycline: mechanism, transfer and clinical significance. *Clinical Microbiology Reviews*, 5:387-399.

Spellberg B. 2016 Sep 1. The New Antibiotic Mantra- «Shorter Is Better». PMID: 27455385. *JAMA International Medicina*; 176(9):1254-5.

Sperspiger J, Wieser M, Taubel M, Rossello-Mora RA, Rosengarten R, Busse HJ. 2003 Nov. *Staphylococcus nepalensis* sp. nov., isolated from goats of the Himalayan region. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v.53: p. 2007-2011.

Strube ML, Hansen JE, Rasmussen S, Pedersen K. 2018. A detailed investigation of the porcine skin and nose microbiome using universal and *Staphylococcus* specific primers. *Scientific Reports* 2018 8:1 8, p. 1–9.

Sutherland R, Boon RJ, Griffin KE, Masters PJ, Slocombe E, White AR. 1985. Antibacterial activity of mupirocin (pseudomonic acid), a new antibiotic for topical use. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 27, p. 495-498.

Supre K, De Vlieghe S, Cleenwerck I, Engelbeen K, Van Trappen S, Piepers S, Sampimon OC, Zadoks RN, De Vos P, Haesebrouck F. 2010 Jan 8. *Staphylococcus devriesei* sp. nov., isolated from teat apices and milk of dairy cows. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 60 (Pt 12): 2739-2744.

Takahashi T, Satoh I, Kikuchi N. 1999. Phylogenetic relationships of 38 taxa of the genus *Staphylococcus* based on 16S rRNA gene sequence analysis. *International Journal of Systematic Bacteriology*. v. 49: p. 725-728.

Talon R, Giammarinaro P, Leroy S, Morot- Bizot C, Bover-Cid S, Vidal-Carou C. 2004. Traditional fermented meat products : new microbiological aspects. XIV Congresso de Microbiologia de los alimentos, Girona, 19-22, p. 21-23.

Taponen S, Bjorkroth J, Pyorala S. 2008. Coagulase-negative staphylococci isolated from bovine extramammary sites and intramammary infections in a single dairy herd. *Journal of Dairy Science*. v.75, p. 422-429.

Tapones S, Supre K, Piessens V, Van Coillie E, De Vlieghe S, Koort J. 2011 Feb 18. *Staphylococcus agnetis* sp. nov., a coagulase-variable species from bovine subclinical and mild clinical mastitis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 62 (Pt 1): 61-65.

Teng LJ, Hsueh PR, Wang YH, Lin HM, Luh KT. 2001. Determination of *Enterococcus faecalis* groESL full-length sequence and application for species identification. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 39, p. 3326–3331.

Tenover F. 2006 Jun 1. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of medicine*. 119(6A): 3-9.

Terra NN, Freitas RJS, Cichoski AJ. 2007. Atividade de água, pH, umidade e desenvolvimento de *Staphylococcus xylosum* durante o processamento e armazenamento da paleta suína curada, maturada e fermentada. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, 27(4): p. 756-760, out.-dez.

Thakur P, Nayyar C, Tak V, Saigal K. 2017. Mannitol-fermenting and Tube Coagulase-negative Staphylococcal Isolates: Unraveling the Diagnostic Dilemma. *Journal of Laboratory Physicians* 9, p. 65.

Thiele-Bruhn S. 2003. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*; 166(2): 145- 67.

Tulinski P, Fluit AC, Wagenaar JA, Mevius D, van de Vijver L, Duim B. 2012. Methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci on pig farms as a reservoir of heterogeneous staphylococcal cassette chromosome mec elements. *Appl Environ Microbiol.* 78, p. 299–304.

Uivarosi V. 2013. Metal complexes of quinolone antibiotics and their applications: an update. *Molecules* 18:11153–11197.

Veras JF, Carmo LS, Tong LC, Shupp JW, Cummings C, Dos Santos DA, Cerqueira MM, Cantini A, Nicoli JR, Jett M. 2008 Feb 21. A study of the enterotoxigenicity of coagulase-negative and coagulase-positive staphylococcal isolates from food poisoning outbreaks in Minas Gerais, Brazil. *International Journal of Infectious Diseases.* 12(4):410-5.

Verdayes MAJ, Ortega BP, Rodriguez CH, Cabrera GB, Martinez SR, Diaz MEC, Diaz JCC. 2012. Identification and expression of nor efflux family genes in *Staphylococcus epidermidis* that act against gatifloxacin. *Microbial Pathogenesis.* v. 52: p. 318-325.

Vernozy-Rozand C, Mazuy C, Meugnier H, Bes M, Lasne Y, Fiedler F, Etienne J, Freney J. 2000. *Staphylococcus fleurettii* sp. nov., isolated from goat's milk cheeses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 53 (Pt 6): 2007-11.

Verraes C, Boxstael SV, Meervenve EV, Coillie EV, Butaye P, Catry B, Schaetzen MA, Huffel XV, Imberechts H, Dierick K, Herman L. 2013 Jun 28. Antimicrobial resistance in the food chain: a review. *International Journal of Environmental Research. Public Health*; 10(7): 2643-69.

Versalovic J, Schneider M, De Bruijn FJ, Lupski JR. 1994. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5(1), p. 25-40.

Vieira de Melo V, Duarte IP, Queiroz A. 2012. *Guia Antimicrobianos. Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC-UFG)*, 1 ed. - Goiânia.

Wegener HC, Aarestrup FM, Jensen LB, Hammerum AM, Bager F. 1999 May-Jun. Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. *Emerging Infectious Diseases.* 5(3): 329-35.

Werth BJ. 2020. Manual MCD. Betalactâmicos. [Internet]. PharmD, University of Washington School of Pharmacy. [Accessed 2020] <https://www.msdmanuals.com/pt/profissional/doen%C3%A7as-infecciosas/bact%C3%A9rias-e-f%C3%A1rmacos-antibacterianos/betalact%C3%A2micos/>.

Widerström M, Wiström J, Sjöstedt A, Monsen T. 2012. Coagulase-Negative Staphylococci: Update on the Molecular Epidemiology and Clinical Presentation, with a Focus on *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus saprophyticus*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 31, p. 7–20.

Willey J, Sherwood LM, Woolverton CJ. 2008. In Prescott, Harley and Klein's *Microbiology*, 7th. McGraw-Hill Higher Education, New York.

Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. 2004 Jul 15. Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Disease*. 39 (3):309:17.

Witte W, Klare I. 1999. Antibiotikaresistenz bei bakteriellen Infektionserregern: mikrobiologisch-epidemiologische Aspekte. *Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz*, 42, p. 8-16.

Woolhouse M, Ward M, Bunnik BV, Farrar J. 2015 Oct 14. Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 370. rstb.royalsocietypublishing.org.

Worthington RJ, Melander C. 2013. Overcoming Resistance to β -Lactam Antibiotics. *J. Org. Chem.* 78, p. 4207–4213. doi:10.1021/jo400236f. Overcoming.

[WTO] World Trade Organization. 2001. Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2.

Wright G. 2003. Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, p. 1451-1464.

[WTO] World Trade Organization. 2014. Antimicrobial Resistance: Global Report on surveillance. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.

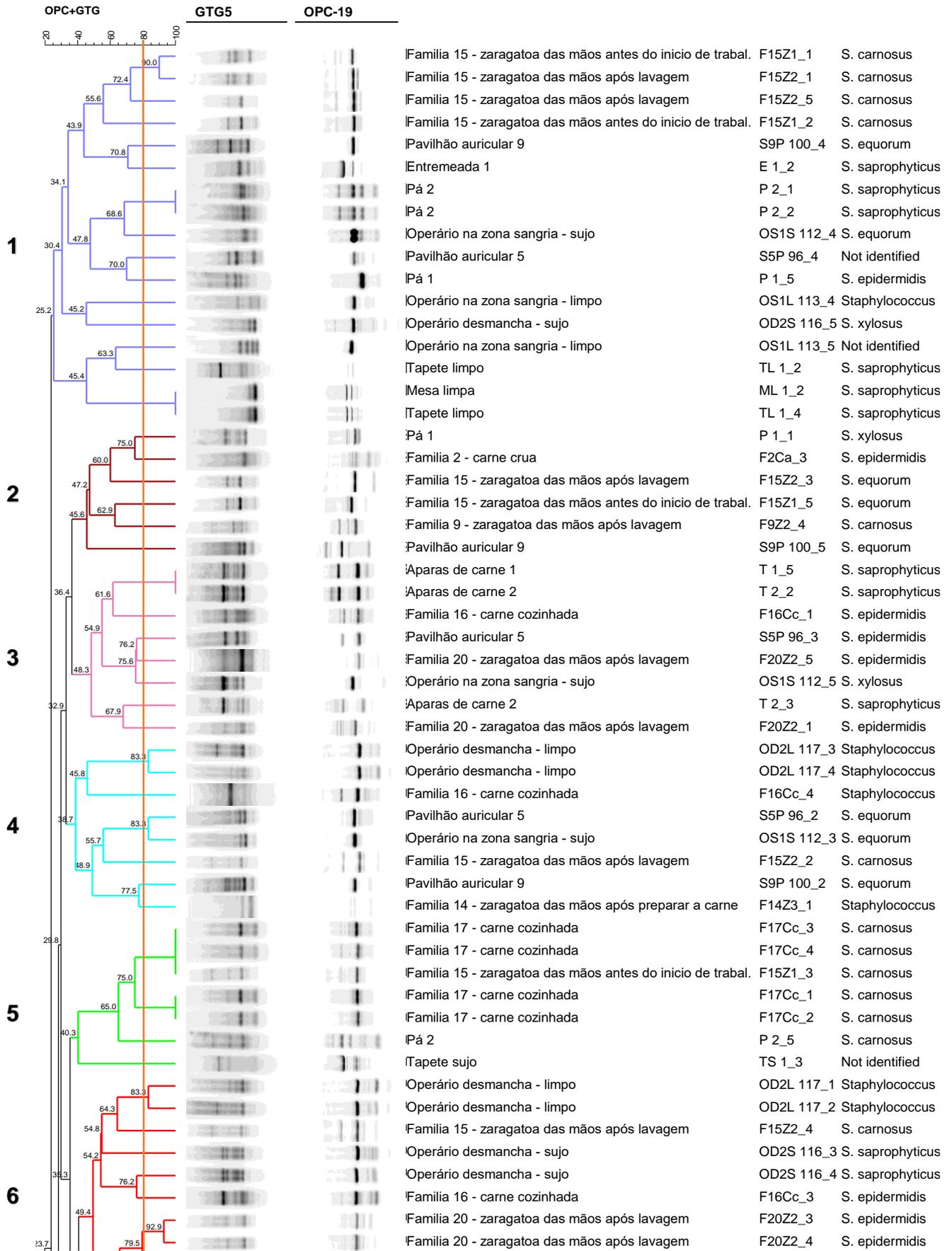
[WTO] World Trade Organization. 2016. Sanitary and phytosanitary measures. The WTO Agreement on the Application of Sanitary and Phytosanitary Measures (SPS Agreement).

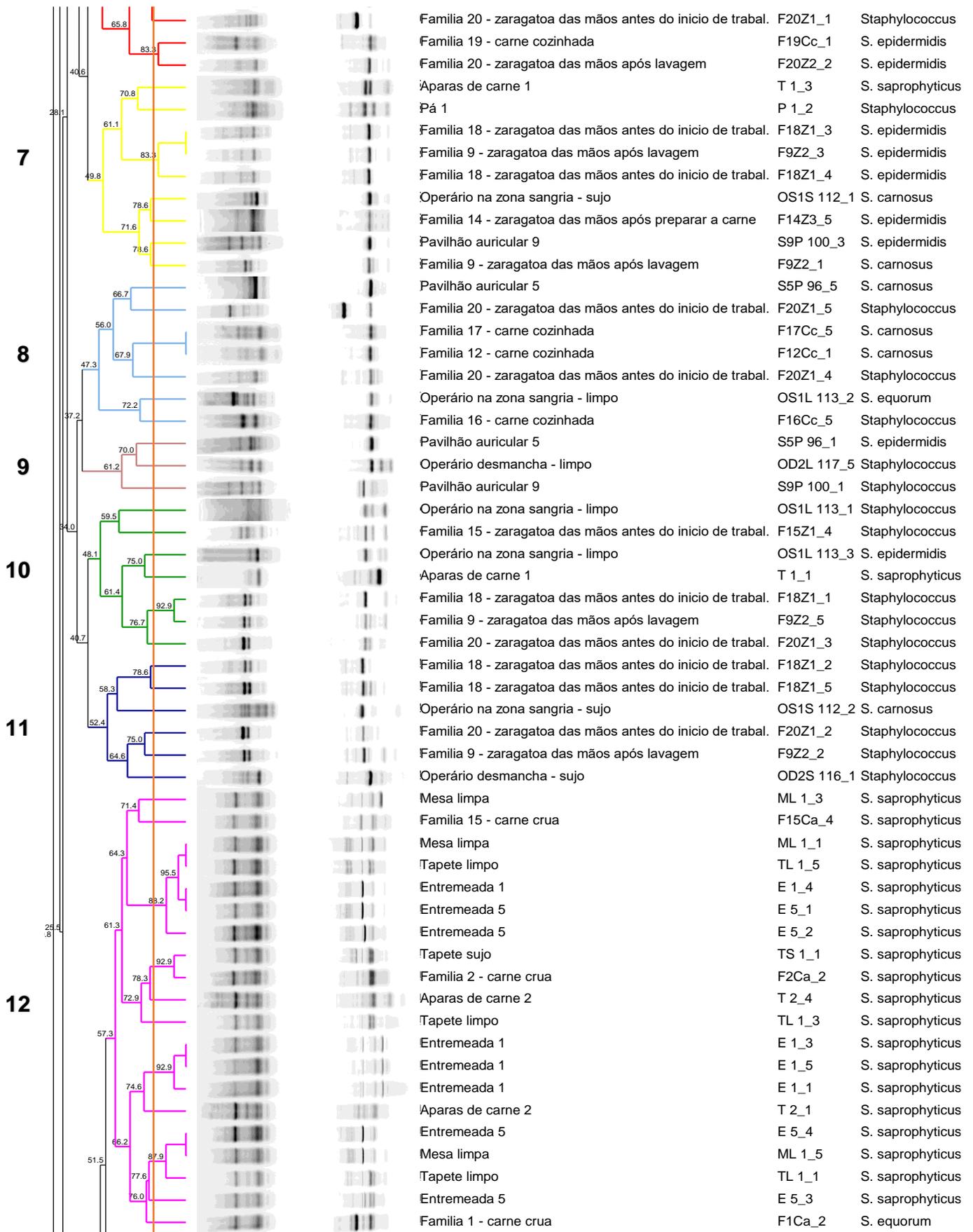
[WTO] World Trade Organization. 2019. Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (AGISAR). Critically important antimicrobials for human medicine, 6th revision. ISBN 978-92-4-151552-8.

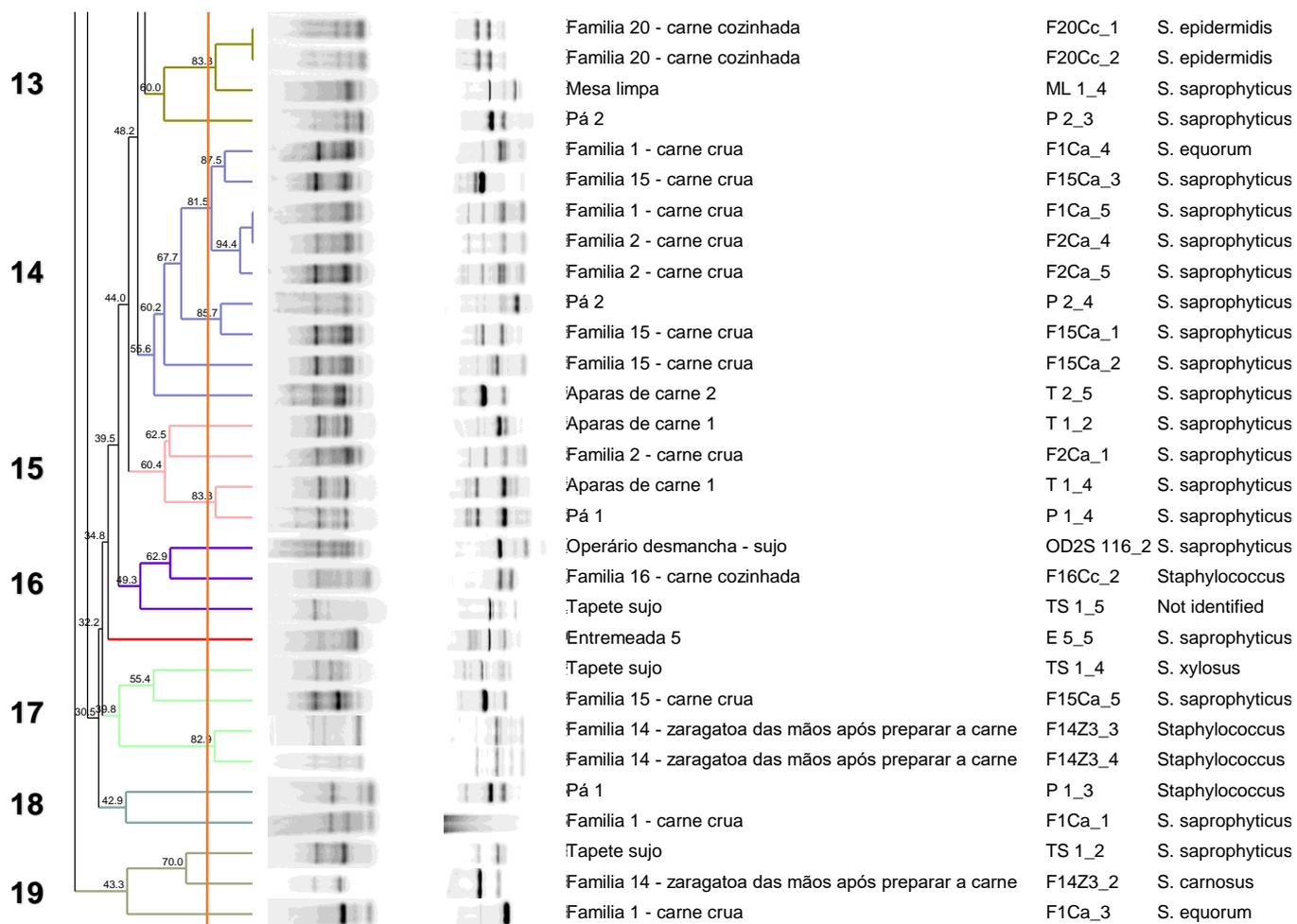
[WHO] World Health Organization. 2020. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. [Accessed on 20 September 2020]; Available: <https://www.who.int/publications/i/item/global-action-plan-on-antimicrobial-resistance>

Yang YJ, Lee GY, Kim S, Park JH, Lee SI, Kim GB, Yang SJ. 2022. Profiles of Non-aureus Staphylococci in Retail Pork and Slaughterhouse Carcasses: Prevalence, Antimicrobial Resistance, and Genetic Determinant of Fusidic Acid Resistance. *Food Science of Animal Resources* 42, p. 225.

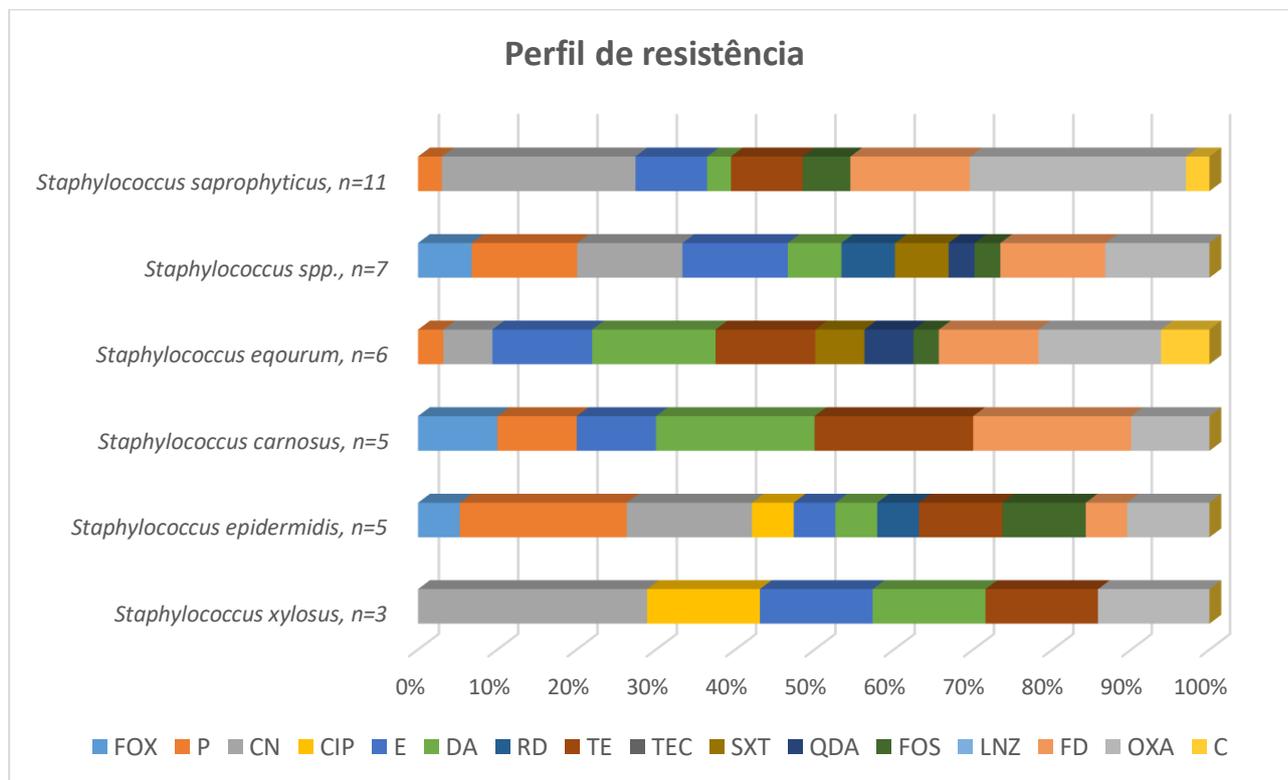
ANEXO 1. Dendrograma constituído pelos perfis genéticos dos 145 isolados de presuntivos SCN obtidos a partir das reações com a utilização dos dois primers (GTG-5 e OPC-19)







ANEXO 2. Perfil de resistência dos isolados por espécies.



FOX – Cefoxitina, P – Penicilina, CN – Gentamicina, CIP – Ciprofloxacina, E – Eritromicina, DA – Clindamicina, RD – Rifampicina, TE – Tetraciclina, TEC – Teicoplanina, SXT – Trimetoprim/sulfametoxazole, QDA – Quinupristina/dalfopristina, FOS – Fosfomicina, LNZ – Linezolide, FD – ácido Fusídico, OXA – Oxacilina, C – Cloranfenicol.