

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

Detecção de *Staphylococcus sciuri* em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) em fase de terminação criadas em tanque rede

Fernando Cardoso Gomes

Jaboticabal, São Paulo

CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

***Staphylococcus sciuri* em tilápia-do-Nilo
(*Oreochromis niloticus*) em fase de terminação
criadas em tanque rede**

Fernando Cardoso Gomes

Orientador: Profa. Dra. Fabiana Pilarski

Dissertação apresentada ao programa
de Pós-graduação em Aquicultura do
Centro de Aquicultura da UNESP –
CAUNESP, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre.

Jaboticabal, São Paulo

2018

G633d Gomes, Fernando Cardoso
Detecção de *Staphylococcus sciuri* em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) em fase de terminação criadas em tanque-rede / Fernando Cardoso Gomes. – – Jaboticabal, 2018
iii, 21 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2018
Orientadora: Fabiana Pilarski
Banca examinadora: Marita Vedovelli Cardozo, Rogério Salvador
Bibliografia

1. *In natura*. 2. Saúde pública. 3. Bactéria. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.3.05

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

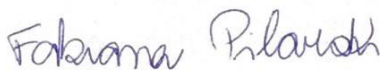
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Detecção de *Staphylococcus sciuri* em tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus*) em fase de terminação criadas em tanque-rede

AUTOR: FERNANDO CARDOSO GOMES

ORIENTADORA: FABIANA PILARSKI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:



Profa. Dra. FABIANA PILARSKI

Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos / Centro de Aquicultura - CAUNESP



Pós-doutoranda MARITA VEDOVELLI CARDOZO

Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. ROGÉRIO SALVADOR

Laboratório de Imunopatologia de Peixes / UENP - Bandeirantes/PR

Jaboticabal, 02 de julho de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo amor, suporte e apoio constante, sempre.

Agradeço à minha orientadora por ter me aceito em seu grupo de estudos, e ter confiado em minha capacidade.

Agradeço aos amigos do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Organismos Aquáticos, que sempre estiveram dispostos a me ajudar nas coletas e no processamento dos materiais, e que sempre garantiram boas risadas.

Agradeço também ao Professor Luiz Augusto do Amaral, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, por ajudar a elaborar o trabalho e tirar várias dúvidas.

Agradeço à CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da bolsa de Mestrado.

2018

SUMÁRIO

Resumo.....	II
Abstract.....	III
1.Introdução.....	1
2.Revisão de Literatura.....	2
2.1 Piscicultura no Brasil.....	2
2.2 Patógenos de interesse em saúde pública.....	3
2.3 <i>Staphylococcus</i>	4
3.Objetivos.....	8
4.Materiais e Métodos.....	8
5.Resultados e Discussão.....	11
6.Conclusão.....	14
7.Referências Bibliográficas.....	15

RESUMO

Dentre as produções de animais aquáticos no Brasil para fins de consumo, a tilápia-do-Nilo está em destaque, e justamente por ser tão apreciada, sua qualidade microbiológica deve se apresentar adequada. Assim, este trabalho teve como objetivo verificar a presença ou não de *Staphylococcus* spp., uma bactéria responsável por surtos de intoxicação alimentar, em tilápias na fase de terminação e criadas em tanques-rede. Para isso, foram selecionados 40 peixes, destinados ao abate, de uma piscicultura comercial. As amostras para avaliação microbiológica foram coletadas da pele com uso de swab, e foi coletado o intestino para análise do conteúdo intestinal. As amostras de pele e de conteúdo intestinal foram semeadas em ágar Baird-Parker com emulsão de gema de ovo e telurito de potássio, incubadas a 37°C, por 48h. As colônias que cresceram foram caracterizadas através da coloração de Gram, do teste da catalase e coagulase. Não houve crescimento de colônias características de *Staphylococcus aureus*, que neste meio são pretas, lisas, brilhantes e com halo fosco, todavia, colônias características de outras espécies de importância em saúde pública foram identificadas, como o *Staphylococcus sciuri* e na produção animal, como o *Macrococcus caseolyticus*, todos identificados através do sequenciamento do gene 16S. Assim, este estudo demonstra a possibilidade de transmissão de bactérias potencialmente patogênicas para humanos, representando risco à saúde do consumidor.

Palavras-chave: bactérias, *in natura*, contaminação, saúde pública

ABSTRACT

Among the aquatic animal production in Brazil for consumption purposes, Nile tilapia is prominent, and precisely because it is so appreciated, its microbiological quality must be adequate. Thus, this work had as objective to verify the presence or not of *Staphylococcus* spp., A bacterium responsible for outbreaks of food poisoning, in tilapia in the termination phase and created in net tanks. For this, 40 fish were selected for slaughter from a commercial fish farm. Samples for microbiological evaluation were collected from the skin using swab, and the intestine was collected for intestinal contents analysis. The skin and intestinal contents samples were seeded in Baird-Parker agar with egg yolk emulsion and potassium telluride and then incubated at 37°C for 48h. The colonies that grew were characterized by Gram stain, catalase and coagulase test. There were no characteristic colonies of *Staphylococcus aureus*, which are black, smooth, shiny and with a matte halo. However, colonies characteristic of other species of public health importance have been identified, such as *Staphylococcus aureus* and of importance in animal production, such as *Macrococcus caseolyticus*, all identified by the 16S gene sequencing. Thus, this study demonstrates the possibility of transmission of potentially pathogenic bacteria to humans, representing a risk to the health of the consumer.

Key words: bacteria, *in natura*, contamination, public health

1. INTRODUÇÃO

A piscicultura no Brasil teve início em 1971, e desde então vem crescendo anualmente, o que pode ser observado no crescimento de 2013 a 2015, que foi de 48,6%, contrastando com a diminuição progressiva da pesca (FAO, 2016).

A espécie mais produzida no Brasil é a tilápia-do-Nilo, representando 47% da produção total no ano de 2016 (IBGE, 2017). Isso se deve à sua rusticidade, resistência, crescimento rápido, qualidade do filé, com ausência de espinhas e outras características interessantes para a produção em escala comercial (MEURER et al., 2003), e também pelo pacote tecnológico já bem estabelecido para essa espécie. Seu bom desempenho em termos de produção é notável, sendo esta espécie a segunda mais produzida no mundo todo, tendo seu volume de produção quadruplicado na última década (WANG et al., 2016).

Os peixes por estarem inseridos em um ambiente aquático estão, portanto, em contato direto com uma grande diversidade de microrganismos, cuja composição está em constante mudança e reflete a qualidade da água. De modo geral, existe uma relação direta entre a poluição ambiental e a detecção de espécies dos gêneros *Listeria*, *Salmonella* e *Staphylococcus* em peixes. Considerando-se que em peixes saudáveis os tecidos internos são estéreis, os microrganismos presentes naturalmente encontram-se principalmente no muco que os reveste externamente, brânquias e intestino, locais de maior contato com o meio externo (JAY, 2005; PÉREZ et al., 2010).

Como todo alimento, o pescado também é passível de contaminação, que pode ocorrer em qualquer momento da cadeia de produção. A proliferação microbiana ocorre principalmente pela atividade de água elevada, alta biodisponibilidade de macro e micronutrientes, teor de gorduras insaturadas de fácil oxidação e pH próximo da neutralidade (ARGUDÍN et al., 2010). No Brasil, o que regulamenta a qualidade microbiológica aceitável é a resolução RDC N° 12 de 2001, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a ANVISA, que estabelece padrões microbiológicos para alimentos de venda e exportação. Neste documento está estabelecido que o limite para a presença de estafilococos coagulase positivo em pescados é de 10^3 UFC/g.

O gênero *Staphylococcus* (Família Micrococcaceae) é composto por cocos Gram positivos, predominantemente anaeróbios facultativos e mesófilos, capazes de crescer entre 7°C a 47,8°C. Bactérias deste gênero não fazem parte da microbiota natural dos peixes e as coagulase positivas são apontadas como patogênicas para humanos, como o *S. hyicus*, *S. intermedius* e *S. aureus*. São responsáveis por surtos de intoxicações alimentares no mundo, devido a presença de enterotoxinas nos alimentos, devido a

qualidade sanitária inadequada do pescado na piscicultura, contaminações durante o abate, pelos manipuladores ou contaminação de fômites (NETO, 2002; JAY, 2005; GONÇALVES, 2011). Esta bactéria pode estar presente na água em decorrência de contaminação por dejetos humanos e animais, efluentes industriais e domésticos (ASHBOLT, 2015).

2.REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Piscicultura no Brasil

O Brasil é um país com grande extensão territorial, mas também com grande quantidade de rios, estuários e uma longa faixa costeira, e surpreendentemente essas reservas aquáticas atualmente, ainda são pouco utilizadas para a produção de animais aquáticos visando a alimentação humana (COSTA-PIERCE, 2002).

A proteína obtida dos peixes apresenta boa qualidade e é possível de ser vendida a preços competitivos, pois possui ampla aceitação pelos consumidores, podendo assim, atingir todos os tipos de mercados, o que torna a piscicultura uma boa opção de investimento para produção de alimento de boa qualidade (BOMBARDELLI et al, 2005).

A produção de tilápia no Brasil teve início no ano de 1971 com auxílio de um programa governamental que visava a produção de alevinos para a povoação de reservatórios públicos. No entanto, devido à falta de conhecimento e pouca difusão de técnicas de manejo o programa não teve bons resultados. Somente a partir da década de 1980, a produção de tilápias adquiriu caráter comercial, e pesquisas começaram a ser desenvolvidas na década de 1990 (JÚNIOR, 2008).

Desde então, essa atividade está em ritmo de crescimento contínuo e acelerado no Brasil, sendo que de 2003 a 2009 o setor cresceu 105% (FAO, 2009), o que é bom, visto que a atividade leva a criação de novos empregos e maior desenvolvimento de toda cadeia de produção (ROSS et al., 2011), além de ser uma fonte alternativa de proteína. Atualmente, o Brasil vem se tornando um produtor de destaque no cenário mundial e, apesar de estar atrás de grandes produtores como China e Egito, ainda há muito potencial a ser explorado na piscicultura do país, por isso espera-se um grande crescimento na atividade para os próximos anos (FAO, 2016).

Atualmente, a atividade no Brasil se mostra em plena expansão, com a produção em 2015 chegando em 485 mil toneladas, e em 2016 a 507 mil toneladas (IBGE, 2017). Além disso a mudança no consumo de alimentos, como por exemplo a busca por uma

1 alimentação mais saudável tem acarretado um aumento no consumo de pescado, sendo
2 que em 2015 na América latina o consumo per capita foi de 9,8kg, segundo a FAO em
3 2018. No entanto, esse consumo ainda é baixo, pois o mínimo recomendado pela
4 Organização Mundial da Saúde é de 12kg.

5 A piscicultura no Brasil desde o início se mostrou focada na produção de peixes
6 de água doce, apesar do país possuir uma longa faixa costeira que possibilitaria também
7 uma grande produção de peixes marinhos. Isso provavelmente se deve ao fato de que
8 a piscicultura marinha requer maior investimento e oferece mais riscos, já que os mares
9 e oceanos sofrem maiores intempéries que os rios, lagos e açudes. É possível notar
10 bem esta diferença pelos dados de produção, os quais demonstraram que a aquicultura
11 marinha produziu 91 toneladas em 2015, enquanto que a aquicultura de água doce
12 produziu 483 toneladas (FAO, 2016).

13 Apesar do país possuir um grande número de espécies de peixes de água doce,
14 poucas são utilizadas comercialmente, geralmente por falta de um pacote tecnológico
15 estabelecido e confiável, como por exemplo, informações quanto à reprodução e
16 produção, como por exemplo requerimentos nutricionais para as diferentes fases de
17 desenvolvimento do animal, bem como períodos de reprodução e seus cuidados
18 necessários.

19 Por esses motivos, o maior volume de produção é de espécies exóticas,
20 originadas de países que já possuem um pacote tecnológico bem estabelecido e com
21 características bem elucidadas. Dentre essas espécies, destaca-se a tilápia-do-Nilo
22 (*Oreochromis niloticus*) de origem africana, mas que foi importada por apresentar
23 rusticidade e uma maior resistência às doenças (ROBERTS e SOMMERVILLE, 1982),
24 além de ser uma espécie muito apreciada pelos produtores.

25 Porém, com a intensificação da produção e elevada densidade de estocagem,
26 (AYROZA et al., 2014; CHAKRABORTY et al., 2010), seja ela em tanques escavados
27 ou em tanques-rede um número cada vez maior de patógenos têm sido diagnosticados,
28 influenciando negativamente a saúde e bem-estar dos animais (FAO, 2016). Isso reflete
29 diretamente na produção, gerando perdas econômicas significativas para os produtores,
30 devido as lesões ocasionadas e taxa elevada de mortalidade.

31 32 **2.2 Patógenos de interesse em saúde pública**

33
34 Além dos patógenos que podem levar ao adoecimento e morte dos animais de
35 produção existem também alguns patógenos que muitas vezes podem estar presentes
36 na água utilizada para a criação destes peixes, e que podem representar um risco à

saúde pública, como por exemplo, os coliformes termotolerantes, Enterococos, *Clostridium perfringens* e *Staphylococcus* spp (HARWOOD et al., 2005).

Como a água é um elemento utilizado em todas as etapas de produção do pescado estas bactérias podem estar presentes nos animais desde o início do ciclo de produção até após o processamento e encaminhamento para os centros de consumo e disponibilizados para o consumidor (VALLANDRO et al., 2011), ou podem também ser resultantes da contaminação cruzada, a partir dos manipuladores ou maquinário (SIMON e SANJEEV, 2006) utilizado durante o processamento da matéria-prima, especialmente na parte de limpeza da carcaça e filetagem.

Ainda é possível que essa contaminação cruzada seja causada por deficiências nas práticas de higiene pelas indústrias e seus colaboradores, já que as bactérias podem aderir às superfícies que entram em contato com os alimentos e formam biofilmes, que facilitam a sobrevivência dessas bactérias mesmo após a limpeza e desinfecção (BROOKS et al., 2008; YANG et al., 2012).

A dificuldade em eliminar completamente esse risco é bem grande, tanto que não é raro encontrar estes patógenos em alimentos prontos para consumo, como peixes crus, filés de peixe e até mesmo em peixes já defumados (AYULO et al., 1994; CHAJE, CKA-WIERZCHOWSKA et al., 2015; HAMMAD et al., 2012).

2.3 *Staphylococcus*

2.3.1 Classificação

Os *Staphylococcus* são seres pertencentes ao reino Bacteria, ao filo Firmicutes, a classe Bacilli, a ordem Bacillales e inseridos na família Staphylococcaceae.

As bactérias do gênero *Staphylococcus* se apresentam na forma de cocos (0,5 – 1,5 μ m) imóveis, gram-positivos, não formadores de esporos e podem ocorrer agrupados aos pares ou em cadeias curtas. São na sua grande maioria catalase-positivos, anaeróbios facultativos, quimiorganotróficos, com metabolismo fermentativo e respiratório, apresentando temperatura ótima de multiplicação entre 30 e 37 graus celsius e podem apresentar resultados positivos ou negativos no teste da coagulase. De forma geral os estafilococos são encontrados na pele e nas mucosas de seres humanos e outros animais.

2.3.1.1 Estafilococos Coagulase-Negativos

Antigamente estes estafilococos coagulase-negativos eram considerados contaminantes apatogênicos, comensais e, portanto, sem importância clínica. Porém com o decorrer do avanço científico e identificação mais detalhada de agentes patogênicos começou-se a perceber a importância destes estafilococos como

causadores de doenças em seres humanos, dentre algumas podemos citar osteomielite, infecções de trato urinário, bacteremia, infecções oculares e cutâneas, dentre outras. Como componentes deste grupo podemos citar o *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus simulans* e *Staphylococcus warneri*. O *S. epidermidis* se apresenta como sendo a espécie de maior importância, representando mais de 50% dos isolados de estafilococos coagulase-negativos em casos clínicos.

2.3.1.2 Fatores de Virulência

Dentre os fatores de virulência que podem estar presentes no gênero *Staphylococcus* podemos começar citando a produção de biofilmes, que são exopolissacarídeos que podem impedir a fagocitose por células polimorfonucleares e também a ação de antimicrobianos, facilitando assim a sua permanência no ambiente e local em que se instalam (ARCIOLA et al., 2012).

Temos também a presença de peptoglicanos e ácidos teicóicos presentes nas paredes celulares destas bactérias, que são responsáveis pela aderência à mucosas, ativação do complemento, aumento da quimiotaxia de células de defesa e outras funções.

As bactérias deste gênero produzem também diversas enzimas, como por exemplo a catalase, que serve inclusive de teste bioquímico para sua identificação. A função da catalase é inativar o peróxido de hidrogênio e os radicais livres tóxicos produzidos e formados pelas células de fagocitose. Outra enzima é o fator de agregação, que faz com que a bactéria seja capaz de se ligar ao fibrinogênio. A coagulase é outra enzima que pode ser produzida e liberada no meio ou então ligada à parede da bactéria. Sua função é de se ligar e ativar a protrombina, fazendo assim a conversão do fibrinogênio em fibrina, o que pode recobrir a célula bacteriana, deixando-a mais resistente.

Pode ocorrer também a presença de fibrinolisinases, que rompem os coágulos de fibrina e facilitam a disseminação da bactéria, assim como as hialuronidases, que fazem a quebra da matriz extracelular presente nos tecidos, facilitando assim também na disseminação da bactéria.

Essas bactérias podem ainda produzir hemolisinas, classificadas em alfa, beta e gama hemolisinas. Sua importância se deve a capacidade de formar poros nas membranas das células, ou suas propriedades surfactantes, o que acabam levando à lise das células afetadas.

2.3.1.3 Toxinas

Dentre as toxinas produzidas por este gênero temos as toxinas epidermolíticas (ET-A e ET-B), sendo a ET-A termoestável e a ET-B termolábil. A função de ambas é

semelhante, que se resume em dissolver a matriz mucopolissacarídica da epiderme, facilitando a disseminação da bactéria.

Temos também a possível presença de enterotoxinas, que são monoméricas, globulares, solúveis em água e termoestáveis. Até o momento foram reladas 23 enterotoxinas diferentes e são identificadas por letras, como SEA, SEB, SEC, SED, SEE e assim sucessivamente, com seu peso variando de 25 a 30kDa (ARGUDÍN et al., 2010; ONO et al., 2015; WU et al., 2016).

Essas enterotoxinas produzem efeitos eméticos e conseguem penetrar na barreira intestinal e promover respostas imunes locais e sistêmicas. Esta resposta inflamatória pode acabar lesionando o trato gastrointestinal e juntamente com o bloqueio na reabsorção de água e eletrólitos pode levar ao aparecimento de um quadro de diarreia (ARGUDÍN et al., 2010).

Há relatado também a presença de um superantígeno, a toxina da síndrome do choque tóxico-1 (TSST-1), que consegue estimular a proliferação de linfócitos T sem precisar de nenhuma especificidade antigênica (KONEMAN et al., 2006).

O potencial destas toxinas é tão grande que são vistas inclusive como potencial arma biológica para guerra e terrorismo (GREENFIELD et al., 2002).

Apesar da sua importância apenas 5 enterotoxinas possuem kit comercial para sua detecção: SEA, SEB, SEC, SED e SEE (OSTYN et al., 2016).

2.3.2 Fontes de Infecção

Encontradas frequentemente no ar, em fezes, esgoto, alimentos (ROCHA et al., 2013; SILVA-JÚNIOR et al., 2015) e, principalmente na mucosa nasal de humanos e animais, por isso são consideradas indicadores da condição higiênica e qualidade sanitária de um alimento (JAY, 1997; GATTI-JÚNIOR, 2011).

O gênero *Staphylococcus* é responsável por aproximadamente 45% das Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) de origem alimentar no mundo, cuja contaminação pode ocorrer durante os estágios de produção ou estocagem do alimento, por cepas de origem ambiental ou humana (KADARIYA et al., 2014).

A forma comum de infecção por *Staphylococcus* é o contato direto com indivíduos que apresentem sintomas clínicos da bacteriose, mas também é possível a contaminação por fômites e ambiente, inclusive, há estudos em que a bactéria foi isolada de pisos, maçanetas, mesas, camas, bombas de infusão dentre outros (LIN et al., 2017).

Essas bactérias podem causar nos humanos desde uma simples foliculite até a síndrome do choque tóxico, podem também causar intoxicações alimentares, devido a produção de toxinas, que são termoestáveis e que não alteram as características dos

alimentos, mas que dentro de poucas horas após a ingestão desencadeiam vômitos, diarreias, dentre outros sinais e sintomas constituindo-se um risco à saúde pública.

Em estudo realizado por BARRETO & VIEIRA (2003), os pesquisadores demonstraram que 60% dos funcionários de empresas de pesca do Estado do Ceará eram portadores de *S. aureus*, o que ressalta a necessidade de se implantar programas de controle das condições sanitárias nesses estabelecimentos, visando a redução dos riscos que a manipulação do pescado representa para a saúde pública.

Em outro estudo realizado por ROCHA et al. (2013), em 100% das amostras de filé de tilápia coletadas *in natura* no mercado modelo, de Seridó, Rio Grande do Norte, foram detectadas populações de *S. aureus*, sendo que em 73,3% dos casos, acima do padrão estabelecido pela legislação vigente. As altas contagens verificadas evidenciam a inadequação sanitária do material analisado, denunciando as baixas condições de higiene em sua produção e comercialização e um potencial risco à saúde do consumidor.

A detecção destas toxinas nos alimentos, portanto, é de grande importância, sendo que atualmente temos disponíveis kits comerciais, testes imunológicos, como o ELISA, e técnicas moleculares como a PCR que auxiliam na pesquisa e identificação de tais enterotoxinas.

A técnica de ELISA apresenta uma boa sensibilidade, é simples e rápida e está disponível inclusive em kits comerciais, sendo que esses kits apresentam sensibilidade de 0,1 e 1ng/ml (SU e WONG, 1997). Já a técnica de PCR, apesar de ser altamente sensível e específica acaba detectando o gene responsável pela produção da toxina, e não ela em si, mas por se tratar de uma técnica que pode ser realizada rapidamente e em um curto período de tempo ainda se mostra bastante útil.

As infecções mais comuns por *Staphylococcus* coagulase negativo são causados pelo *Staphylococcus epidermidis*, seguido do *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus haemolyticus* e *Staphylococcus capitis* (BECKER et al., 2014). Em um estudo global sobre endocardite, o segundo agente mais comum encontrado foi o *Staphylococcus lugdunensis* (PETTI et al., 2008).

2.3.3 Resistência a Antimicrobianos

Agravando o problema, tem-se a questão já citada de resistência a antimicrobianos, o que gera um problema não apenas na saúde animal, mas também na saúde humana, já que as evidências apontam que muitas, se não todas as bactérias conseguem compartilhar genes necessários para a sua sobrevivência, através de plasmídeos, transposons e de processos como o de conjugação (BENNETT, 2008).

Isso vem sendo visto com o aumento da resistência a antimicrobianos importantes na medicina humana, como a penicilina e antimicrobianos com anel β -

lactâmico (ALLORI et al., 2006) e mais recentemente a metilina e vancomicina (FEßLER et al. 2011; GAO et al., 2012; GEBREMARIAM et al., 2014; HANNAN et al., 2018).

Por estas razões, podemos considerar que os *Staphylococcus*, tanto os coagulase positivo como os coagulase negativos são bactérias de importância para a saúde humana (CHAJE, CKA-WIERZCHOWSKA et al., 2015) e para a saúde animal (VANDERHAEGHEN et al., 2014; WEESE et al., 2004).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a ocorrência de bactérias do gênero *Staphylococcus*, em tilápia-do-Nilo em fase de terminação e destinadas ao abate, numa piscicultura comercial.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar a presença ou não de bactérias do gênero *Staphylococcus* spp. na pele e no intestino de tilápias em fase de terminação;

Identificar as espécies das bactérias isoladas, através de testes bioquímicos e do sequenciamento do gene 16S.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta de Amostras

Foram utilizadas 40 tilápias saudáveis, em fase de abate, com peso médio de 1105g, provenientes de uma piscicultura comercial, às margens do rio Tietê, localizada no município de Arealva, SP, e produzidas em tanques-rede de 30m³.

Os animais foram selecionados durante a despesca de rotina da piscicultura, de forma aleatória, conforme retirados dos tanques, através de sistema automatizado. Os animais eram destinados ao comércio de pescado fresco e consumo humano.

Foram realizadas duas coletas, uma no mês de janeiro e outra em abril de 2018, nas quais foram selecionados 20 peixes por coleta.

Na própria piscicultura foram coletadas amostras de pele de cada peixe, em áreas aleatórias, utilizando-se de swabs estéreis, descartáveis e individuais, e um molde vazado de ferro, com as medidas de 4x5cm, de forma a manter uma área padrão de 20cm². Este molde foi previamente autoclavado, sendo aberto somente na hora das coletas e esterilizado com álcool 70% entre a utilização em cada peixe coletado. Os swabs foram armazenados individualmente em tubos Falcon de 15mL, contendo 9mL de água peptonada a 0,1%, previamente autoclavados, os quais foram transportados fechados e em temperatura ambiente até o laboratório de Microbiologia e Parasitologia de Peixes, localizado no Caunesp, em Jaboticabal.

Após a coleta dos swabs, os peixes foram colocados em sacos plásticos individuais e estéreis, identificados e então armazenados em caixa térmica contendo gelo para o transporte até o laboratório.

O transporte da piscicultura até o laboratório para análise levou em média 2 horas e meia.

No laboratório, em ambiente asséptico, foi realizado um corte longitudinal do ânus até o opérculo para a remoção do intestino, com auxílio de pinças e tesouras previamente autoclavadas.

O conteúdo intestinal de cada peixe foi removido para uma placa de Petri estéril, sendo então pesado 1g de conteúdo intestinal, o qual foi diluído em tubos Falcon de 15mL, contendo 9mL de água peptonada a 0,1%, sendo então homogeneizados durante 60 segundos, realizadas diluições seriadas, utilizando 1mL desta solução e depositada em tubo Falcon contendo 9mL de água peptonada a 0,1%, e assim sucessivamente, até a diluição de 10⁻³.

4.2 Análise Microbiológica

Após as diluições, procedeu-se a semeadura do material em superfície, utilizando 0,1mL da diluição inicial e das seguintes, em meio ágar seletivo e indicador Baird-Parker acrescido de emulsão de gema de ovo e telurito de potássio. (LABORCLIN, PR, Brasil), que com o auxílio de alças de Drigalski descartáveis e estéreis foram distribuídas por toda a placa até que o ágar absorvesse toda a solução.

A emulsão de gema de ovo é utilizada para verificar a presença de lipólise e proteólise, já o telurito de potássio é usado para verificar se há a sua redução, e caso isso ocorra as colônias adquirem coloração preta, sendo que a presença de halo fosco e colônias pretas e brilhantes nesse meio são indicativas de *Staphylococcus aureus*. As placas foram incubadas, em posição invertida, em estufa, a 37°C durante 24 a 48 horas.

Após esse período foram selecionadas colônias que apresentassem aspecto macroscópico compatível com *Staphylococcus* spp para realização inicialmente do teste

de Gram, sendo então as bactérias Gram positivas repicadas em ágar BHI (Brain Heart Infusion) para se obter colônias puras e então encaminhadas para realização do teste da catalase e coagulase.

Para o teste da coloração de Gram, foi utilizado um kit comercial de coloração (LABORCLIN, PR – Brasil).

4.3 Provas Bioquímicas e Morfológicas

O teste da catalase visa verificar a produção da enzima em questão, e foi realizado depositando uma alçada da colônia pura a ser testada numa lâmina de vidro, e em seguida pingando uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%. A formação de bolhas em até dez segundos representa um resultado positivo.

A técnica em lâmina do teste da coagulase (KATZ, 2010) é um teste rápido, porém não definitivo, no qual objetiva-se verificar a presença da enzima coagulase ligada à parede celular de estafilococos, que atua no fibrinogênio do plasma, levando a formação de fibrina. Para realização do teste foi colocado uma gota de solução salina a 0,85% numa lâmina de vidro, uma gota de plasma ao lado, e dissolvendo uma alçada da amostra de colônia pura a ser analisada na gota de solução salina a 0,85%. Após a completa dissolução da amostra na solução salina a 0,85%, a mesma foi misturada e levemente homogeneizada com a gota de plasma para visualização ou não de grumos. O resultado positivo é caracterizado pela formação de grumos em até um minuto após a homogeneização.

Foi realizado também o teste de coagulase em tubos, que é o teste confirmatório para a presença da enzima coagulase livre ou ligada à parede celular, que neste caso reage com um fator plasmático e forma um complexo que atua no fibrinogênio plasmático e leva à formação de fibrina. O teste foi realizado utilizando as amostras de colônias puras, que foram previamente semeadas em meio BHI líquido. Foram então utilizados pequenos frascos de vidro de 5mL, previamente autoclavados e acrescentou-se 100µL da amostra pós crescimento em BHI líquido, e 500µL de plasma de coelho (KATZ, 2010) liofilizado e que foi restituído à forma líquida conforme as instruções do fabricante. As amostras foram mantidas em estufa a 37°C e observadas de hora em hora, durante quatro horas, e incubadas por mais 24 horas para observação da formação inteira ou parcial de coágulos no plasma, o que caracteriza um resultado positivo para o teste.

Após a realização de todos os testes acima descritos, procedeu-se a seleção de colônias sugestivas de estafilocos para o congelamento em freezer a -80°C, utilizando-se 420µL de glicerina a 50% e 580µL da amostra que estava em caldo BHI, as quais

foram colocadas em criotubos de 2mL, vortexados, e mantidos em caixa própria em freezer a -80°C.

4.4 Análise Molecular

Para a identificação definitiva das colônias sugestivas de *Staphylococcus*, foi realizada a extração de DNA de colônias previamente repicadas em ágar BHI, com o auxílio do kit comercial DNeasy Blood & Tissue (Qiagen®), seguindo o protocolo de extração fornecido pelo próprio fabricante.

O protocolo para PCR seguido foi o utilizado por SEBASTIÃO et al. (2015). A PCR foi realizada com 25µL de volume total, sendo que neste volume estava contido 2,5µL de buffer 10X (10mM Tris-HCl, 50mM KCl), 0,2µL de dNTP a 25mM, 1 µL de MgSO₄ a 50mM, 0,2µL de *Taq* High Fidelity (Platinum *Taq* DNA Polymerase, Life Technologies, NY, USA), 2µL de primer específico para o rRNA do gene 16S (10 picomol), 25ng de DNA e o volume restante foi preenchido com água Milli-Q.

O programa de PCR consistiu de 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, and 68°C por 1 minuto e 30 segundos, e a extensão final a 68°C por 10 minutos.

A integridade do DNA extraído foi confirmada utilizando-se o processo de eletroforese em gel de agarose (0,8%), corado com Orange Loading Dye (Thermo Scientific, EUA), e então visualizado em luz ultravioleta, sendo a captura da imagem realizada com o auxílio de aparelho Transilluminator (Loccus Biotecnologia) e visualizado através do programa LPIX Imagem (Loccus Biotecnologia).

A purificação das amostras de DNA foi feita com auxílio do kit comercial PureLink Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen®), seguindo as instruções fornecidas pelo fabricante.

As amostras foram então imediatamente enviadas ao Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) localizado em Jaboticabal, estado de São Paulo para sequenciamento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 48 horas, não houve crescimento bacteriano em nenhuma das placas contendo amostras do conteúdo intestinal, em nenhuma das três diluições testadas.

Das 40 placas contendo amostras de swab de pele, 15 apresentaram características morfológicas compatíveis com *Staphylococcus* spp., que são colônias brilhantes, redondas, de marrom a pretas

Houve uma maior quantidade de amostras morfológicamente compatíveis com *Staphylococcus* spp. no mês de abril (11), totalizando mais que o dobro que a encontrada no mês de janeiro (4).

As colônias com características de *Staphylococcus* spp., que se desenvolveram nas placas variaram principalmente quanto a cor, variando de preto até a coloração castanha escura, porém, todas apresentaram bordas bem definidas, forma circular, aspecto brilhante e resultado positivo no teste da catalase.

Nenhuma das amostras selecionadas apresentou presença de halo fosco ao redor das colônias, e apresentaram resultado negativo no teste da coagulase em lâmina ou em tubo. A presença de halo fosco, e o resultado positivo para teste da coagulase são características da bactéria *Staphylococcus aureus*.

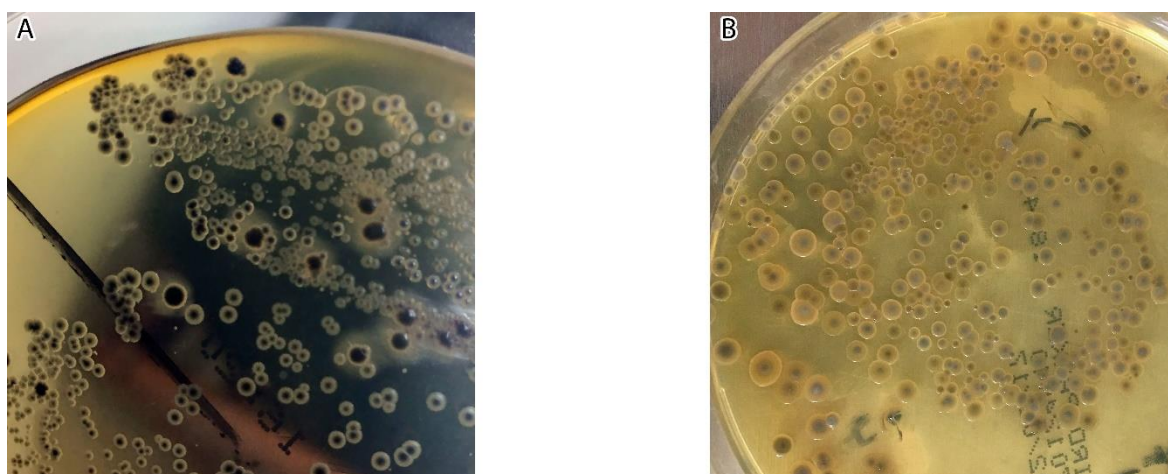


Figura 1: Colônias padrão de *Staphylococcus aureus* (acervo do laboratório) (A), Colônias de *Staphylococcus* coagulase negativos (B).

Quatro amostras foram analisadas com o auxílio das ferramentas moleculares, os resultados obtidos foram duas amostras sendo compatíveis com *Staphylococcus sciuri*, com 98% de identidade semelhante, uma amostra compatível com *Macroccoccus caseolyticus*, com 100% de identidade semelhante e a última amostra apresentou resultado inconclusivo.

O *Staphylococcus sciuri* faz parte do grupo dos *Staphylococcus* coagulase negativo e está comumente presente na pele e mucosas de animais domésticos e selvagens, além de poder ser encontrado no ambiente, como solo e água. Esta bactéria também pode ser encontrada colonizando a nasofaringe, pele e trato urogenital de humanos. Apesar de não estar entre os patógenos mais importantes para humanos, sua importância vem crescendo, já que esta bactéria está associada a infecções importantes

como por exemplo, a endocardite, peritonite, choque séptico, infecções no trato urinário e mais frequentemente infecções em ferimentos. (DAKIC´ et al., 2005).

No presente momento não há trabalhos científicos verificando a presença desta bactéria em peixes, e seu possível efeito nestes animais.

Embora a presença das bactérias avaliadas nos peixes tenha sido relativamente baixa, este estudo demonstrou que há a presença destas bactérias no ambiente em que o pescado é produzido e no pescado que é destinado ao consumo humano.

Destacamos a necessidade de definição de protocolos de abate para a prevenção da contaminação da carne do pescado com bactérias do gênero *Staphylococcus*, como, por exemplo, a desinfecção externa do peixe, jejum pré-abate, dentre outros, bem como a necessidade de estudos para identificar os contaminantes dos corpos d'água onde as tilápias são produzidas, principalmente quanto a presença de aves silvestres (garças, patos, biguás, cabeça-seca, etc.) sobre os tanques-rede, descarga de efluente doméstico e industrial, ausência de mata ciliar e presença de animais domésticos destinados à pecuária, em especial gado de corte.

O gênero *Macrococcus* está estreitamente relacionado ao grupo *sciuri*, sendo incluído no gênero *Staphylococcus* até poucos anos atrás, até ser separado em um gênero independente, devido seu genoma ser distintamente menor. Devido ao genoma menor, esse gênero não possui vias metabólicas para produção de vários açúcares e aminoácidos, diversos genes de virulência, sendo um dos motivos deste gênero não causar doenças em animais ou humanos, sendo considerados comensais, e isolados frequentemente da pele de animais homeotérmicos e de alimentos, como carnes e leite (BABA et al., 2009).

Vários trabalhos encontrados na literatura analisaram o pescado processado (VÁZQUEZ-SÁNCHEZ et al., 2012; JUNIOR et al., 2014; SOARES et al., 2012; FRANCO et al., 2013), os quais já tiveram contato com humanos e maquinários, aumentando a chance de contaminação, uma vez que o *S. aureus* está presente naturalmente em grande quantidade principalmente na mucosa nasal de humanos, bem como em superfícies utilizadas para o seu processamento (CASTRO, 2016).

Assim, o resultado deste trabalho demonstra que os peixes *in natura* não apresentaram *Staphylococcus aureus* na pele ou intestino, porém, apresentaram *Staphylococcus sciuri*, uma bactéria emergente para humanos que além de causar doenças pode ter grande importância quanto a resistência à antimicrobianos (COUTO et al., 1996; SHITTU et al., 2003; STEPANOVIC et al., 2003), e a possibilidade de transmitir esta resistência através de plasmídeos (SCHWARZ et al., 2000), que se for o caso é algo que pode interferir negativamente tanto na produção animal (ATYAH et al., 2010; GILLESPIE et al., 2009) quanto na saúde humana, já que poderia dificultar o

tratamento de bactérias que afetam os peixes. Podendo também facilitar a difusão de resistência num ambiente tão amplo e rico em bactérias como é o caso da água, que atende à demanda de pisciculturas e é fonte de abastecimento de municípios e indústrias.

CONCLUSÃO

No trabalho foi identificada a presença de *Staphylococcus sciuri* na pele das tilápias, uma bactéria que pode causar doenças em humanos (DAKIC' et al., 2005) e animais (CHEN et al., 2007; KENGKOOM & AMPAWONG, 2017) e contaminação cruzada durante o processamento do pescado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLORI, M. C. G.; JURE, M.A.; ROMERO, C.; CASTILLO, M.E.C. **Antimicrobial Resistance and Production of Biofilms in Clinical Isolates of Coagulase-Negative *Staphylococcus* Strains**. Biol. Pharm. Bull. v.29, n.8, p.1592-1596. 2006.

ARCIOLA, C. R.; CAMPOCCIA, D.; SPEZIALE, P.; MONTANARO, L.; COSTERTON, J.W. **Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials**. Biomaterials. v.33, p.5967-5982. 2012.

ARGUDÍN, M. A.; MENDOZA, M. C.; RODICIO, M. R. **Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins**. Toxins. V.2, p. 1751–1773. 2010.

ASHBOLT, N. J. **Microbial Contamination of Drinking Water and Human Health from Community Water Systems**. Curr Envir Health Rpt. v.2, p.95-106. 2015.

ATYAH, M. A. S.; ZAMRI-SAAD, M.; SITI-ZAHRAH, A. **First report of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from cage-cultured tilapia (*Oreochromis niloticus*)**. Veterinary Microbiology. v.144, p.502-504. 2010.

AYROZA, D. M. M. R.; SCALOPPI, F. G.; DA SILVA AYROZA, L. M.; DE PAIVA BADIZ FURLANETO, F.; FERRAUDO, A. S.; MERCANTE, C. T. J. **Environmental conditions, fish diseases, management and economic evaluation of tilapia cages in a Brazilian hydroelectric reservoir**. Tilapia: Biology, Management Practices and Human Consumption, p.119-145, NY, 2014.

AYULO, A. M. R.; MACHADO, R. A.; SCUSSE, V. M. **Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the Southern region of Brazil**. International Journal of Food Microbiology, v.24, p.171-178. 1994.

BABA, T.; KUWAHARA-ARAI, K.; UCHIYAMA, I.; TAKEUCHI, F.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. **Complete Genome Sequence of *Macrococcus caseolyticus* Strain JSCS5402, Reflecting the Ancestral Genome of the Human-Pathogenic *Staphylococci***. Journal of Bacteriology. v.191, n. 4, p.1180-1190. 2009.

BARRETO, N.S.E. & VIEIRA, R.H.S.F. **Investigação sobre possíveis portadores de *Staphylococcus aureus* em duas indústrias de pesca**. Revista Higiene Alimentar. v.17, n.104/105, p.49-57, 2003.

BOMBARDELLI, R. A.; SYPERRECK, M. A.; SANCHES, E. A. **Situação atual e perspectivas para o consumo, processamento e agregação de valor ao pescado**. Arq. Ciên. Vet. Zool. v.8, n.2, p.181-195. 2005.

1 BECKER, K.; HEILMANN, C.; PETERS, G. **Coagulase-Negative**
2 **Staphylococci. Clinical Microbiology Reviews.** v.27, n.4, p.870-926. 2014.

3 BROOKS, J. D.; FLINT, S. H. **Biofilms in the food industry: problems and**
4 **potential solutions.** Int. J. Food Sci. Technol., v.43, p.2163-2176, 2008.

5 CASTRO, A.; KOMORA, N.; FERREIRA, V.; LIRA, A.; MOTA, M.; SILVA, J.;
6 TEIXEIRA, P. **Prevalence of *Staphylococcus aureus* from nares and hands on**
7 **health care professionals in a Portuguese Hospital.** Journal of Applied Microbiology.
8 V. 121, p.831-839. 2016.

9 CHAKRABORTY, S. B. **Determination of ideal stocking density for cage**
10 **culture of monosex Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in India.** Proceedings of the
11 Zoological Society, v.63, i.1, p.53-59. 2010.

12 CHAJEĆKA-WIERZCHOWSKA, W.; ZADERNOWSKA, A.; NALEPA, B.;
13 SIERPINSKA, M.; LANIEWSKA-TROKENHEIM, L. **Coagulase-negative**
14 **staphylococci (CoNS) isolated from ready-to-eat food of animal origin - Phenotypic**
15 **and genotypic antibiotic resistance.** Food Microbiology. v.46, p.222-226. 2015.

16 CHEN, S.; WANG, Y.; CHEN, F.; YANG, H.; GAN, M.; ZHENG, S. J. **A Highly**
17 **Pathogenic Strain of *Staphylococcus sciuri* Caused Fatal Exudative Epidemitis in**
18 **Piglets.** PLoS ONE. I. 1, e. 147, p.1-6. 2007.

19 CHO, J. I.; JOO, I. S.; CHOI, J. H.; JUNG, K. H.; CHOI, E. J.; SON, N. R.; HAN,
20 M. K.; JEONG, S. J.; LEE, S. H.; HWANG, I. G. **Distribution of Methicillin-resistant**
21 ***Staphylococcus aureus* (MRSA) in RAW Meat and Fish Samples in Korea.** Food
22 Sci. Biotechnol. v.23, p.999-1003. 2014.

23 COSTA-PIERCE, B. A. **Ecological aquaculture: the evolution of the blue**
24 **revolution.** 1st Ed., Blackwell Science, Oxford, 2002.

25 COUTO, I.; LENCASTRE, H.; SEVERINA, E.; KLOOS, W.; WEBSTER, J. A.;
26 HUBNER, R. J.; SANCHES, I. S.; TOMASZ, A. **Ubiquitous Presence of a *mecA***
27 **Homologue in Natural Isolates of *Staphylococcus sciuri*.** Microbial Drug Resistance.
28 V.2, I. 4, p. 377-391. 1996.

29 DAKIĆ, I.; MORRISON, D.; VUKOVIĆ, D.; SAVIĆ, B.; SHITTU, A.; JEZEK, P.;
30 HAUSCHILD, T.; STEPANOVIC, S. **Isolation and Molecular Characterization of**
31 ***Staphylococcus sciuri* in the Hospital Environment.** Journal of Clinical Microbiology.
32 v.43, n.6, p.2782-2785. 2005.

1 FAO. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016**. Contribución a la
2 seguridad alimentaria y la nutrición para todos. p.192, 2016.

3 FAO. **The State of world fisheries and aquaculture**. FAO Fisheries and
4 Aquaculture Department, Rome, p.173, 2016.

5 FAO. **The State of world fisheries and aquaculture**. FAO Fisheries and
6 Aquaculture Department, Rome, p.72, 2018.

7 FEßLER, A. T.; KADLEC, K.; HASSEL, M.; HAUSCHILD, T.; EIDAM, C.;
8 EHRICHT, R.; MONECKE, S.; SCHWARZ, S. **Characterization of Methicillin-**
9 **Resistant *Staphylococcus aureus* Isolates from Food and Food Products of**
10 **Poultry Origin in Germany**. Applied and Environmental Microbiology. v.77, n.20, p.
11 7151-7157. 2011.

12 FRANCO, M.L.R.S.; AMARAL, L.A.; VIEGAS, E.M.M.; KRONKA, S.N.;
13 GASPARINO, E.; MIKCHA, J.M.G.; DEL VESCO, A.P. **Qualidade microbiológica e**
14 **vida útil de filés defumados de tilápia-do-nilo sob refrigeração ou congelamento**.
15 Pesq. agropec. bras. v.48, n.8, p.1071-1079. 2013.

16 GAO, J., FERRERI, M., YU, F., LIU, X., CHEN, L., SU, J., HAN, B. **Molecular**
17 **types and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine**
18 **mastitis in a single herd in China**. Vet. J. v.192, p.550-552. 2012.

19 GATTI-JUNIOR, P. **Qualidade higiênica e sanitária de tilápias provenientes**
20 **de cultivo, comercializadas no varejo**. Dissertação de Mestrado, Centro de
21 Aquicultura, UNESP, 47 p., Jaboticabal, 2011.

22 GEBREMARIAM, T. T.; ZELELOW, Y. B. **A systemic review of antimicrobial**
23 **resistance pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus***. Saudi Journal
24 for Health Sciences. v.3, i.2, p.71-74. 2014.

25 GILLESPIE, B.E., HEADRICK, S.I., BOONYAYATRA, S., OLIVER, S.P.
26 **Prevalence and persistence of coagulase-negative *Staphylococcus* species in**
27 **three dairy research herds**. Vet. Microbiol. v.134, p.65-72. 2009.

28 GONÇALVES, A. A.; **Tecnologia do pescado: ciência, tecnologia, inovação**
29 **e legislação**. 1ª Ed. Editora Ateneu, São Paulo, 608p, 2011.

30 GREENFIELD, R.A.; BROWN, B.R.; HUTCHINS, J.B.; IANDOLO, J.J.;
31 JACKSON, R.; SLATER, L.N.; BRONZE, M.S. **Microbiological, biological, and**
32 **chemical weapons of warfare and terrorism**. Am. J. Med. Sci. v.323, p.326–340.
33 2002.

HANNAN, A.; AKHTAR, R. W.; SALEEM, S.; QAISAR, A.; JAHAN, S. **Frequency of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* among clinical isolates of MRSA collected from tertiary care hospitals of Lahore, Pakistan.** Pak. Armed Forces Med. J. v. 68, p.580-584. 2018.

HAMMAD, H. A.; WATANABE, W.; FUJII, T.; SHIMAMOTO, T. **Occurrence and characteristics of methicillin-resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from Japanese retail ready-to-eat raw fish.** International Journal of Food Microbiology, v.156, p.286-289. 2012.

HARWOOD, V. J.; LEVINE, A. D.; SCOTT, T. M.; CHIVUKULA, V.; LUKASIK, J.; FARRAH, S. R.; ROSE, J. B. **Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection.** Applied and Environmental Microbiology, v.71, n.6, p.3163-3170, 2005.

IBGE. **Pesquisa no sistema SIDRA.** Tabela disponível em "<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3940>", acessada em 07/10/2017.

JAY, J.M. **Modern food microbiology**, 5th ed. Chapman & Hall, New York. 1997.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**, 6ª Ed. Editora Artmed, Porto Alegre, 711p, 2005.

JÚNIOR, C. A. F. **Cultivo de tilápias no Brasil: Origens e cenário atual.** Apresentação oral. XLVI Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural, 2008.

JUNIOR, P.G.; ASSUNÇÃO, A.W.A.; BALDIN, J.C.; AMARAL, L.A. **Microbiological quality of whole and filleted shelf-tilapia.** Aquaculture. v.433, p.196-200. 2014.

KADARIYA, J.; SMITH, T. C.; THAPALIYA, D. ***Staphylococcus aureus* and Staphylococcal Food-Borne Disease: An Ongoing Challenge in Public Health.** BioMed Research International, v.2014, p.1-9. 2014.

KATS, D.S. **Coagulase Test Protocol.** American Society for Microbiology. 2010.

KENGKOOM, K.; AMPAWONG, S. ***Staphylococcus sciuri* associated to subcutaneous abscess and dermatitis in ICR mouse.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. V.69, n.1, p.117-122. 2017.

KONEMAN, E. W.; WINN, W. C.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; PROCOP, G. W.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WOODS, G. L. **Diagnóstico Microbiológico Texto e Atlas Colorido**. Sexta Edição. p. 617-666. Philadelphia. 2006.

LIN, D.; OU, Q.; LIN, J.; PENG, Y.; YAO, Z. **A meta-analysis of the rates of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* contamination on the surfaces of environmental objects that health care workers frequently touch**. American Journal of Infection Control. v.45, p.421-219. 2017.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. R. **Digestibilidade aparente de alguns alimentos proteicos pela tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**. Revista Brasileira de Zootecnia, v.32, p.1801-1809, 2003.

ONO, H. K.; SATO'O, Y.; NARITA, K.; NAITO, I.; HIROSE, S.; HISATSUNE, J.; ASANO, K.; HU, D. L.; OMOE, K.; SUGAI, M. **Identification and characterization of a novel staphylococcal emetic toxin**. Appl. Environ. Microbiol. V.81, p. 7034–7040. 2015.

OSTYN, A.; PRUFER, A. L.; PAPINAUD, I.; HENNEKINNE, J. A.; ASSERE, A.; LOMBARD, B. **European Screening Method of the EURL for CPS including *Staphylococcus aureus* applicable to the detection of SEs in all types of food matrices including milk and milk products**. Disponível online em <<http://eurl-staphylococci.anses.fr>> (acesso realizado em 20/07/2018).

PÉREZ, T.; BALCÁZAR, J. L.; RUIZ-ZARZUELA, I.; HALAIHEL, N.; VENDRELL, D.; DE BLAS, I.; MÚZQUIZ, J. L. **Host-microbiota interactions within the fish intestinal ecosystem**. Mucosal Immunology, v.3, n.4, p.355-360, 2010.

PETTI, C.A.; SIMMON, K.E.; MIRO, J.M.; HOEN, B.; MARCO, F.; CHU, V.H.; ATHAN, E.; BUKOVSKI, S.; BOUZA, E.; BRADLEY, S.; FOWLER, V.G.; GIANNITSIOTI, E.; GORDON, D.; REINBOTT, P.; KORMAN, T.; LANG, S.; GARCIA-DE LA-MARIA, C.; RAGLIO, A.; MORRIS, A.J.; PLESIAT, P.; RYAN, S.; DOCO-LECOMPTE, T.; TRIPODI, F.; UTILI, R.; WRAY, D.; FEDERSPIEL, J.J.; BOISSON, K.; RELLER, L.B.; MURDOCH, D.R.; WOODS, C.W. **Genotypic diversity of coagulase-negative staphylococci causing endocarditis: a global perspective**. J. Clin. Microbiol. v.46, p.1780–1784. 2008.

RASOOLY L, ROSE NR, SHAH DB, RASOOLY A. **In vitro assay of *Staphylococcus aureus* enterotoxin A activity in food**. Appl.Environ Microbiol, v.63, p.2361-2365. 1997.

ROBERTS, R.J.; SOMMERVILLE, C. **Diseases of tilapias**. In: The Biology and Culture of Tilapias. ICLARM Conference Proceedings, v.7, Manila, Philippines. p.247–263. 1982.

ROCHA, F.A.G.; ARAÚJO, L.O.; ALVES, K.S.; DANTAS, L.Í.S.; SILVA, R.P.; ARAÚJO, M.F.F. **Estafilococos coagulase positivos em filés de tilápia (*Oreochromis niloticus*) comercializados no mercado modelo Nerival Araújo, Currais Novos/RN**. HOLOS, ano 29, v. 1, p. 84-91. 2013.

ROSS, L.G.; FALCONER, L.L.; CAMPOS MENDOZA, A.; MARTINEZ PALACIOS, C.A. **Spatial modelling for freshwater cage location in the Presa Adolfo Mateos Lopez (El Infiernillo), Michoacán, México**. Aquaculture Research. v.42, p.797-807. 2011.

SCHWARZ, S.; WERCKENTHIN, C.; KEHRENBURG, C. **Identification of Plasmid-Born Chloramphenicol-Florfenicol Resistance Gene in *Staphylococcus sciuri***. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. V. 44, N.9, p.2530-2533. 2000.

SEBASTIÃO, F.A.; FURLAN, L.R.; HASHIMOTO, D.T.; PILARSKI, F. **Identification of bacterial fish pathogens in Brazil by direct colony PCR and 16S rRNA gene Sequencing**. Advances in Microbiology. v.5, p.409-424. 2015.

SHITTU, A.; LIN, J.; MORRISON, D.; KOLAWOLE, D. **Isolation and molecular characterization of multiresistant *Staphylococcus sciuri* and *Staphylococcus haemolyticus* associated with skin and soft-tissue infections**. Journal of Medical Microbiology. V. 53, p.51-55. 2004.

SILVA-JÚNIOR, A.C.S.; SILVA, A.S.S.; BRITO, T.P.; FERREIRA, L.R. **Ocorrência de *Staphylococcus coagulase positiva* e coliformes termotolerantes em Jaraqui, *Semaprochilodus brama* (Valenciennes, 1850) comercializados na Feira do Pescado, Macapá-AP**. Biota Amazônia, v. 5, n. 1, p.32-36. 2015.

SIMON, S. S.; SANJEEV, S. **Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in fishery products and fish processing factory workers**. Food Control, v. 18, p.1565-1568. 2006.

SOARES, K.M.P.; GONÇALVES, A.A.; SOUZA, L.B., SILVA, J.B.A. **Pesquisa de *Staphylococcus aureus* em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) armazenada em gelo**. Acta Veterinaria Brasilica. v.6, n.3, p.239-242. 2012.

STEPANOVIC, S.; JEZEK, P.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; PETRÁS, P. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 41, N.11, p.5262-5264. 2003.

VALLANDRO, M. J.; KINDLEIN, L.; CAMPOS, T.; PAIM, D.; CARDOSO, M.
Avaliação da qualidade microbiológica de sashimis à base de salmão, preparados em restaurantes especializados em culinária japonesa. Rev. Inst. Adolfo Lutz, v.70, p.144-150, 2011.

VANDERHAEGHEN, W.; PIEPERS, S.; LEROY, F.; VAN COILLIE, E.;
 HAESEBROUCK, F.; DE VliegHER, S. **Invited review: Effect, persistence, and virulence of coagulase-negative Staphylococcus species associated with ruminant udder health.** American Dairy Science Association. v.97, n.9, p.5275-5293. 2014.

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

WANG, M.; LU, M. **Tilapia polyculture: a global review.** Aquaculture Research. v. 47, p.2363-2374. 2016.

WEESE, J. S.; DACOSTA, T.; BUTTON, L.; GOTH, K.; ETHIER, M.; BOEHNKE, K. **Isolation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* from the Environment in a Veterinary Teaching Hospital.** J Vet Intern Med. v.18, p.468-470. 2004.

WU, S.; DUAN, N.; GU, H.; HAO, L.; YE, H.; GONG, W.; WANG, Z. **A Review of the Methods for Detection of *Staphylococcus aureus* Enterotoxins.** Toxins, v.8, i.7, p.176-196. 2016.

YANG, L.; LIU, Y.; WU, H.; SONG, Z.; HØIBY, N.; MOLIN, S.; GIVSKOV, M. **Combating biofilms.** FEMS Immunol. Med. Microbiol. v.65, p.146-157. 2012.