

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

***Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) como agente
etiológico de lesões subcutâneas purulentas em coelhos para consumo
(*Oryctolagus cuniculus*)**

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar

Tânia Sandrina Correia Rebelo

Orientadora: Professora Doutora Patrícia Alexandra Curado Quintas Dinis Poeta

Coorientadora: Professora Doutora Maria Madalena Vieira Pinto



Vila Real, 2017

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

***Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) como agente
etiológico de lesões subcutâneas purulentas em coelhos para consumo
(*Oryctolagus cuniculus*)**

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar

Tânia Sandrina Correia Rebelo

Orientadora: Professora Doutora Patrícia Alexandra Curado Quintas Dinis Poeta

Coorientadora: Professora Doutora Maria Madalena Vieira Pinto

Composição do Júri:

Presidente: Professor Doutor Luís Avelino da Silva Coutinho Patarata

Vogal: Professor Doutor Gilberto Paulo Peixoto Igrejas

Vogal: Professora Doutora Maria Madalena Vieira Pinto

Vila Real, 2017

As doutrinas apresentadas no presente trabalho são da exclusiva responsabilidade do autor. É autorizada a reprodução parcial desta tese apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

O autor:

Tânia Rebelo
Vila Real, 2017

“Dizem que na vida, quem perde o telhado ganha as estrelas. É assim mesmo. Às vezes perde-se o que não queríamos, mas conquista-se o que nunca imaginamos...

Nem tudo depende de um tempo, mas sim de uma atitude.”

Josué Morais

Orientação

Orientadora

Professora Doutora Patrícia Alexandra Curado Quintas Dinis Poeta

Departamento de Ciências Veterinárias, UTAD

Co-orientadora

Professora Doutora Maria Madalena Vieira Pinto

Departamento de Ciências Veterinárias, UTAD

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito
de dissertação do curso de 2º ciclo
em Segurança Alimentar.

Agradecimentos

Tenho a agradecer a várias pessoas que me acompanharam nesta longa caminhada, pois sei que sem elas nada disto teria sido possível.

À minha orientadora, Professora Doutora Patrícia Alexandra Poeta, pela sua boa disposição, pelo profissionalismo sempre demonstrado e pela transmissão de conhecimentos e ideias.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Maria Madalena Vieira Pinto, pela orientação, pela constante disponibilidade, profissionalismo, colaboração e transmissão de conhecimentos.

À Margarida Sousa pela amizade, boa disposição, paciência sem limites e compreensão demonstrada para comigo. A não esquecer também o seu filho Luís, nascido ao longo da realização deste trabalho, pelos momentos de boa disposição que nos proporcionou mesmo sem ter noção disso ainda.

Ao Professor Doutor Gilberto Igrejas pela dedicação e pelo interesse demonstrado neste trabalho.

Às funcionárias do laboratório de microbiologia médica pela boa disposição, dedicação, colaboração e empenho todo o tempo sendo essencial para a concretização deste trabalho.

Um especial obrigado à minha amiga Andreia Gonçalves, por todo o apoio prestado, tanto a nível de trabalho laboratorial como a nível pessoal. Sem dúvida uma das pessoas mais importantes ao longo desta caminhada, pelos momentos bem passados, pelas gargalhadas, pelo companheirismo e até mesmo pelos pequenos incidentes no laboratório.

À minha mãe Lúcia e ao meu pai Alcino por todo o orgulho demonstrado em cada etapa vencida e por todo o amor e carinho. Ao meu irmão Carlos, por todas as anedotas contadas para me fazer rir. Sem eles, nada disto teria sido possível de concretizar.

A não esquecer também as minhas amigas Ana Raquel e Sara, pessoas fundamentais na minha vida que tornaram esta caminhada muito mais divertida e agradável, aprendi muito com vocês!

À minha amiga, de longa data, Andreia Queirós, pela amizade e boa disposição, apesar dos tempos difíceis que tivemos de superar.

Também às minhas colegas de trabalho um obrigado muito especial. Angela, Isabel e Anastácia, pela paciência, carinho e ajuda prestada nesta etapa da minha vida e pelo apoio incondicional nos momentos mais difíceis.

Por último, mas com enorme valor, um agradecimento muito especial ao meu namorado David, que mesmo estando longe, me apoiou sempre ao máximo erguendo o meu ânimo nos momentos mais difíceis deste percurso.

Para finalizar, um enorme obrigado a todas aquelas pessoas que de alguma forma especial contribuíram para a minha formação e para o sucesso deste trabalho. São os pequenos momentos que nos dão as forças necessárias para nunca baixar a cabeça.

Resumo

Nos últimos anos, a carne de coelho tem vindo a ganhar uma grande importância na alimentação humana, tanto pelas suas características nutricionais como dietéticas. Consequentemente, a garantia da segurança sanitária ao longo da fileira de produção de carne de coelho, na qual se inclui a inspeção sanitária, tem-se tornado indispensável.

Staphylococcus aureus são bactérias gram-positivas, podendo causar processos supurativos, mastite e piodermite tanto no Homem como nos animais. Em coelhos, as manifestações clínicas mais características associadas a infeções por *Staphylococcus aureus* são a dermatite exsudativa em coelhos lactantes e lesões purulentas subcutâneas em coelhos de várias idades. Nos coelhos abatidos para consumo, estas infeções constituem um problema significativo na rejeição de carcaças no decurso da inspeção sanitária em matadouro. *Staphylococcus aureus* é um agente patogénico associado a taxas de mortalidade e morbilidade elevadas, tendo capacidade para produzir infeções em vários tecidos do corpo humano. Preocupante para a saúde pública é a sua elevada capacidade de adquirir resistência aos antibióticos, podendo assim, sobreviver às mais diversas circunstâncias ambientais.

Como tal, este estudo teve como principal objetivo identificar a presença de *Staphylococcus aureus* em lesões purulentas de carcaças de coelhos provenientes de matadouro, assim como analisar o significado de MRSA nestas lesões. De acordo com o conhecimento dos autores, este é o primeiro trabalho realizado em Portugal sobre a identificação de MRSA em lesões purulentas de coelhos.

Realizaram-se técnicas microbiológicas, recorrendo a meios diferenciais, permitindo identificar a presença de estafilococos, assim como técnicas moleculares, utilizando genes de interesse: *16S*, *mecA* e *nuc*, que permitiram a identificação rápida de *Staphylococcus aureus*, assim como a deteção de resistência à metilicina em estafilococos.

Foi possível verificar a presença de MRSA em 14 animais, num total de 66 analisados. Destes, foi possível analisar 83 isolados. Trata-se de um valor preocupante devido ao risco que pode representar em termos de contaminações cruzadas ao longo da linha de abate e também devido às consequentes perdas económicas para o produtor, visto que as lesões abcessiformes são a principal causa de rejeição em matadouro. A contaminação cruzada é um aspeto preocupante visto que a transmissão pode ser feita por um simples contacto. Existe uma elevada probabilidade de haver conspurcação dos materiais na linha de abate e, até mesmo, a infeção

dos próprios trabalhadores, podendo-se traduzir num problema de saúde pública de carácter ocupacional caso não sejam implementadas medidas de proteção adequadas.

Os resultados descritos no presente trabalho permitem melhorar o nível de conhecimento das lesões purulentas para, futuramente, ser possível a implementação de medidas de controlo mais eficazes.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, MRSA, coelhos, lesões purulentas, HACCP.

Abstract

In recent years, rabbit meat has gained a great importance in human nutrition, because of its nutritional and dietary characteristics. Consequently, the guarantee of health safety along the rabbit meat production line, which includes the sanitary inspection, has become indispensable.

Staphylococcus aureus are gram-positive bacteria, which can cause suppurative processes, mastitis and pyoderma in both humans and animals. In rabbits, the most characteristic clinical manifestations associated with *Staphylococcus aureus* infections are exudative dermatitis in lactating rabbits and subcutaneous purulent lesions in rabbits of various ages. In rabbits slaughtered for consumption, these infections constitute a significant problem in the rejection of carcasses during the sanitary inspection at the slaughterhouse. *Staphylococcus aureus* is a pathogen associated with high mortality and morbidity rates, being able to produce infections in various tissues of the human body. Concern for public health is the high capacity of acquiring resistance to antibiotics, thus being able to survive the most diverse environmental circumstances.

As such, the objective of this study is to identify the presence of *Staphylococcus aureus* in purulent lesions of rabbit carcass from slaughterhouse, as well as to analyze the significance of MRSA in these lesions. According to the authors' knowledge, this is the first work carried out in Portugal on the identification of MRSA in purulent lesions of rabbits.

Microbiological techniques were used, using differential means to identify the presence of *Staphylococcus* spp. Molecular techniques were also used, using genes of interest: 16S, *mecA* and *nuc*, which allow the rapid identification of *Staphylococcus aureus*, as well as the detection of resistance to methicillin.

It was possible to verify the presence of MRSA in 14 animals, in a total of 66 analyzed. Of these, it was possible to analyze 83 isolates. This is worrying because of the risk it may pose in terms of cross-contamination along the slaughter line and also because of the consequent economic losses to the farmer, since abscessiform lesions are the main cause of slaughter rejection.

Cross-contamination is of concern because transmission can be done by simple contact. There is a high likelihood of material contamination in the slaughter line and even infection of

the workers themselves. This translates into an occupational public health problem if adequate protective measures are not implemented.

The results described in this study allow to improve the level of knowledge of purulent lesions in order to be able to implement more effective control measures in the future.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, MRSA, rabbits, purulent lesions, HACCP.

Índice

Resumo	XV
Índice de Figuras	XXI
Índice de Tabelas	XXIII
Lista de abreviaturas	XXV
I. Objetivos	1
II. Introdução	2
1. <i>Oryctolagus cuniculus</i>	3
1.1. A carne de coelho como fonte de proteína na alimentação	4
1.2. Composição da carne de coelho	5
1.3. Macronutrientes da carne de coelho	5
2. Setor da cunicultura em Portugal	7
2.1. Cadeia de Valor	9
2.2. Nível tecnológico das explorações, equipamento e manejo em Portugal	10
2.2.1. Debilidades do setor e ameaças	10
3. Segurança Alimentar	11
4. Inspeção sanitária de coelhos - Tecnologia de abate	12
4.2. Funções do veterinário oficial	15
4.3. Inspeção <i>ante mortem</i>	16
4.4. Inspeção <i>post mortem</i>	16
4.4.1. Lesões subcutâneas purulentas em coelhos abatidos para consumo	17
4.5. Reprovações totais	17
5. <i>Staphylococcus aureus</i>	19
III. Material e Métodos	24
1. Recolha das amostras	25
2. Isolamento de <i>Staphylococcus aureus</i> em lesões purulentas de coelho	25

3. Testes (Teste Gram, Teste DNase e Teste Catalase).....	29
3.1. Teste Gram.....	29
3.2. Teste DNase	29
3.3. Teste Catalase	30
4. Extração de DNA	31
5. <i>Polymerase chain reaction</i> (PCR).....	33
5.1. Preparação dos tubos da PCR	33
5.2. Eletroforese em gel de agarose	35
5.2.1. Preparação do gel de agarose	35
5.3. Inserção dos produtos de PCR	35
5.4. Visualização do gel	36
5.5. Identificação dos microrganismos isolados	37
IV. Resultados e Discussão	38
1. Estudo das lesões abcessiformes	43
2. Localização das lesões purulentas	43
V. Conclusões	45
VI. Anexos	51
1. Tabela dos resultados dos isolados de coelhos.....	51

Índice de Figuras

Figura 1: Evolução do número de carcaças abatidas em Portugal desde 2008 a 2014 (Fonte: INE 2014).....	8
Figura 2: <i>Staphylococcus</i> spp. visto ao microscópio, resolução 100/1.25, sendo possível visualizar a sua forma (cocos), assim como uma coloração violeta devido à capacidade de retenção do cristal violeta de metilo, da camada de peptidoglicano, presente na parede celular	20
Figura 3: Placa com meio ORSAB onde é possível visualizar colónias azuis brilhantes, indicando uma suspeita de MRSA	26
Figura 4: Placa com meio de MSA, sendo possível observar uma mudança de cor do meio de vermelho para amarelo, indicando a suspeita de <i>Staphylococcus</i> fermentadores de manitol..	27
Figura 5: Resumo do processo de isolamento de <i>Staphylococcus aureus</i> e MRSA, indicando os meios diferenciais utilizados (MSA e ORSAB), assim como os testes realizados, nomeadamente, análises bioquímicas e PCR	28
Figura 6: Exemplo de placa com meio BHI agar, semeada em botão para o teste da DNase, sendo possível observar a formação de halos transparentes em volta de todas as colónias, indicando resultados positivos	30
Figura 7: Representação esquemática dos padrões de PCR, podendo-se observar a presença de MSSA quando são visíveis as bandas de 16S e <i>nuc</i> e a presença de MRSA quando possível de observar as bandas de 16S, <i>mecA</i> e <i>nuc</i>	34
Figura 8: Etapas de trabalho. Canto superior esquerdo: Preparação do mix; Canto superior direito: Eletroforese em gel de agarose; Canto inferior esquerdo: Inserção da amostra nos poços do gel de agarose; Canto inferior direito: Visualização computacional.....	36
Figura 9: Exemplo obtido na eletroforese em gel de agarose podendo-se observar a presença de MSSA quando são visíveis as bandas de 16S e <i>nuc</i> e a presença de MRSA quando possível de observar as bandas de 16S, <i>mecA</i> e <i>nuc</i>	37

Índice de Tabelas

Tabela 1: Composição da carne de coelho (100g de parte edível). Fonte: (Instituto nacional da segurança alimentar, 2016).....	5
Tabela 2: Macronutrientes da carne de coelho. Fonte: (Instituto nacional da segurança alimentar, 2016)	6
Tabela 3: Tabela com a evolução do número de carcaças abatidas em Portugal desde 2008 a 2014 (Fonte: INE 2014)	8
Tabela 4: Representação esquemática da cadeia de valor, identificando os diferentes locais por onde a carne de coelho passa até chegar ao consumidor final (Monteiro et al., 2013)	9
Tabela 5: Componentes e concentrações usadas para a reação de PCR (50µL/tubo de PCR)	34
Tabela 6: Sequências nucleotídicas dos primers de PCR para genes identificadores de <i>Staphylococcus aureus</i>	37
Tabela 7: Tabela de resultados obtidos no presente estudo, com a quantificação de MRSA, MSSA, <i>mecA</i> ⁺ , CNS e MRSP	40
Tabela 8: Estudos realizados na pesquisa de <i>Staphylococcus aureus</i> e MRSA em diversos animais	42

Lista de abreviaturas

%	Porcentagem
®	Marca registada
µg	Microgramas
µL	Microlitro
BHI	Brain-heart infusion
CNS	Estafilococcus coagulase negativos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP's	Desoxiribonucleótidos trifosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
g	Grama
HACCP	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controlo (<i>Hazard analysis and critical control points</i>)
mL	Mililitro
MRSA	Estafilococos resistentes à meticilina (Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
MSA	Mannitol Salt Agar
NaCl	Cloreto de sódio
ORSAB	Oxacillin Resistance Screening Agar Base
°C	Graus Celsius
PCR	Reação em cadeia por ação da polimerase (polimerase chain reaction)
pH	Potencial hidrogénico
TBE	Solução tampão de Tris, ácido bórico e EDTA
TE	Solução tampão de Tris e EDTA
UTAD	Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

I. Objetivos

Objetivo geral do presente estudo:

- ✓ Avaliar o envolvimento de *Staphylococcus* spp. como agente etiológico de lesões subcutâneas purulentas em coelhos, que condicionam a rejeição total de coelhos em matadouro.

Objetivo específico:

Dentro do grupo de *Staphylococcus* spp. evidenciar, por técnicas microbiológicas e moleculares:

- ✓ O envolvimento de MRSA nestas lesões, utilizando os genes 16S, *mecA* e *nuc*;
- ✓ Detetar, adicionalmente, a presença de outros agentes, como: MSSA e *Staphylococcus* não aureus resistentes à meticilina.

II. Introdução

1. *Oryctolagus cuniculus*

Oryctolagus cuniculus, vulgarmente conhecido como o coelho europeu, apresenta características que fazem dele um modelo atrativo para investigação. É um animal que apresenta tamanho corporal intermédio (cerca de 35 a 50 cm), disposição dócil, uma capacidade de reprodução fácil e com tempo de geração curto. Ao longo da convivência entre o coelho e o Homem, este animal foi valorizado pela sua carne e pelo seu pelo. Muito provavelmente é esta mesma utilidade que nos abstrai da sua essência: trata-se de uma espécie antiga, com enorme capacidade de adaptação a uma variedade de ecossistemas, existindo em paralelo com a humanidade, mas não dependente dela (Rampin et al., 2008; citado por: Naff e Craig, 2012).

O coelho é uma espécie cinegética de pêlo, é um mamífero lagomorfo, pertencente à família dos Leporídeos, que existe no estado selvagem denominados por coelho-bravo, havendo também subespécies domesticadas por todo o mundo (coelho-doméstico).

Trata-se de uma espécie com origem na Península Ibérica, no entanto, atualmente, a sua área de distribuição é muito mais abrangente, encontrando-se o coelho por toda a Europa, pelo Norte de África, Nova Zelândia, Austrália, Chile e Argentina. Em Portugal, pode ser encontrado por todas as regiões do país, incluindo Açores e Madeira, onde a sua introdução foi feita pelos navegadores portugueses. Pode-se associar esta expansão à introdução de animais, mas também às alterações do uso do solo. É possível distinguir duas subespécies: a *Oryctolagus cuniculus algirus*, de menores dimensões e a *Oryctolagus cuniculus cuniculus*, mais encorpado, tendo sido esta a subespécie mais disseminada um pouco por todo o mundo (Heitor, 2009).

A nível da economia doméstica a criação de coelho assume uma grande importância, representando mais uma fonte de rendimento. É vantajoso pelo facto de serem animais de pequeno porte, sociáveis, prolíficos e são fáceis de manipular, apresentando capacidades de se adaptarem a instalações simples e de baixo custo (Ferreira, 2013).

É uma espécie muito apreciada pelos caçadores portugueses, pois, antigamente era uma espécie com elevada abundância. No entanto podem-se salientar dois focos de doenças onde se deu uma redução das populações deste lagomorfo a nível da Península Ibérica: mixomatose em 1960 e hemorrágica viral em 1990, conjugando com uma maior competição com herbívoros de grande porte, elevada densidade de predadores generalistas (como por exemplo as raposas) e

os animais assilvestrados (como por exemplo os cães e gatos), ação do Homem, perda do uso tradicional do solo e resultante abandono da terra.

Relativamente à alimentação, os coelhos são oportunistas, aproveitando o que o meio lhes oferece para sobreviver, nomeadamente, rebentos e outras partes tenras das plantas. Nas áreas agrícolas alimentam-se dos cereais enquanto estes ainda não atingiram a maturidade. Quando há escassez de vegetação herbácea, alimentam-se de raízes, rebentos e cascas de árvores. Pode-se dizer que os coelhos adaptam a sua alimentação conforme as alterações da quantidade e qualidade do alimento disponível na área onde se encontram (Heitor, 2009).

1.1. A carne de coelho como fonte de proteína na alimentação

A carne de coelho é um alimento que apresenta propriedades dietéticas e nutricionais excelentes. É tradicional na cozinha mediterrânica, podendo ser apresentada inteira ou desmanhada. É uma carne rica em proteínas, ajudando a um melhor desenvolvimento a nível da massa muscular e à manutenção óssea (Tabela 1). Com a ingestão da vitamina B12, também presente nestas carnes, vai haver uma contribuição para reduzir o cansaço e a fadiga (Dalle Zotte, 2002).

É aconselhável incluir a carne de coelho na alimentação dos atletas de alto rendimento devido à elevada qualidade nutricional que esta apresenta. Para além da presença de proteínas e de vitamina B12, tem uma elevada qualidade de ácidos gordos e o teor de gordura ronda apenas os 5%.

Outra razão pela qual também deve ser incluída numa dieta equilibrada, é pelo seu fornecimento de minerais (Tabela 2). Minerais estes que são essenciais para a atividade física, como o selénio, que protege as células dos danos oxidativos, o fósforo, que ajuda no bom estado ósseo e o potássio, que auxilia ao funcionamento normal a nível muscular. No entanto, todos nós devemos manter uma alimentação equilibrada e, as carnes magras, como a de coelho, são indicadas para todas as pessoas (Litoral Coelho, 2016).

A carne de coelho é classificada como carne branca e é apreciada por ser uma carne tenra, saborosa, suculenta, de preparação simples e de fácil digestão, sendo aconselhada para todo o tipo de consumidores. Conjugando os benefícios destas carnes com a preocupação atual da população para uma dieta saudável e equilibrada, é de elevada importância que a cunicultura industrial se continue a desenvolver (Dalle Zotte *et al.*, 2014).

1.2. Composição da carne de coelho

A carne de coelho é menos calórica em relação à carne de porco, 221 Kcal/100g de parte edível, sendo que esta é a carne mais consumida pelos portugueses (Instituto nacional da segurança alimentar, 2016). Na Tabela que se segue é possível verificar a composição da carne de coelho (100g de parte edível):

Tabela 1: Composição da carne de coelho (100g de parte edível). Fonte: (Instituto nacional da segurança alimentar, 2016)

Coelho cru (100g de parte edível)	
Kcal	117 Kcal
Hidratos de Carbono	0 g
Lípidos	4,0 g
Fibra Alimentar	0 g
Ácidos Orgânicos	0 g
Proteína	20,3 g
Água	74,4 g
Outros	1,3 g

1.3. Macronutrientes da carne de coelho

Na Tabela 2 é possível consultar os macronutrientes que podemos encontrar na carne de coelho, observando que se trata de uma carne rica em ácidos gordos mono e polinsaturados, vitaminas e minerais:

Tabela 2: Macronutrientes da carne de coelho. Fonte: (Instituto nacional da segurança alimentar, 2016)

Lípidos	Ácidos gordos saturados	1,3 g
	Ácidos gordos monoinsaturados	0,9 g
	Ácidos gordos polinsaturados	0,7 g
	Ácido linoleico	0,6 g
	Sal	140 g
	Colesterol	48 mg
Vitaminas	Vitamina D	0,5 µg
	a-tocoferol	0,13 mg
	Tiamina	0,1 mg
	Riboflavina	0,16 mg
	Equivalentes de niacina	7,8 mg
	Niacina	4 mg
	Vitamina B6	0,5 mg
	Vitamina B12	9 µg
	Folatos	5 µg
	Cinza	1,3g
Minerais	Sódio (Na)	58 mg
	Potássio (K)	380 mg
	Cálcio (Ca)	17 mg
	Fósforo (P)	220 mg
	Magnésio (Mg)	20 mg
	Ferro (Fe)	1 mg
	Zinco (Zn)	1,5 mg

2. Setor da cunicultura em Portugal

A cunicultura é considerada um setor de produção animal singular. Trata-se de uma produção pecuária onde não é necessário o uso de terra, não é uma produção intensiva, não devendo ser comparada à avicultura industrial, nem com outro tipo de produções intensivas. Entre as singularidades é possível salientar a necessidade de mão-de-obra qualificada e ser uma espécie com capacidades de utilizar matérias-primas que não competem com a alimentação humana, como as forragens. Trata-se de uma atividade que cria emprego no meio rural.

É um setor muito afetado pelo aumento do custo a nível das matérias-primas, como alimentos compostos, mas também pela constante pressão que existe para uma diminuição de preços desta carne, proveniente das grandes superfícies comerciais.

Portugal apresenta condições muito boas para a produção de coelho, nomeadamente, um clima temperado e uma ótima qualidade química da água, levando a que os resultados de produção sejam mais elevados que os padrões normalmente descritos para este setor (Ferreira, 2013).

A carne de coelho é tradicionalmente consumida nos países latinos, encontrando-se entre as carnes mais procuradas. De acordo com os dados exibidos pela EFSA (European Food Safety Authority, 2005) o consumo de carne de coelho dos portugueses estima-se que seja de 1,7 kg *per capita*. A quantificação da produção de carne de coelho não é um estudo fácil, visto que os dados estatísticos oficiais são poucos ou então encontram-se agrupados com a produção de outras espécies (Tabela 3 e Figura 1).

Tabela 3: Tabela com a evolução do número de carcaças abatidas em Portugal desde 2008 a 2014 (Fonte: INE 2014)

Ano	c
2008	6,514
2009	5,925
2010	6,029
2011	5,415
2012	5,470
2013	5,206
2014	5,364

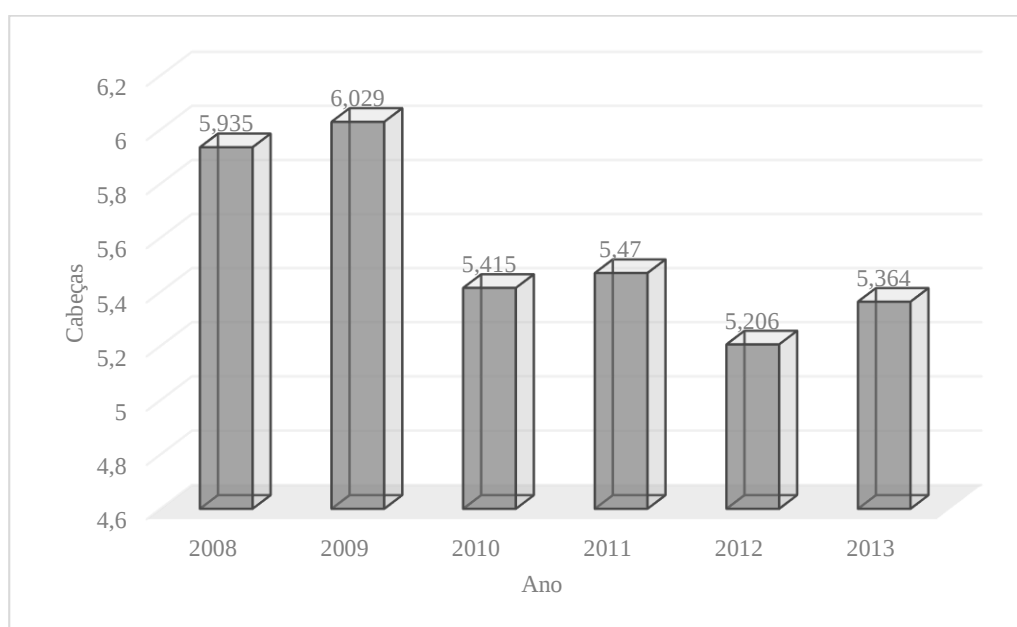


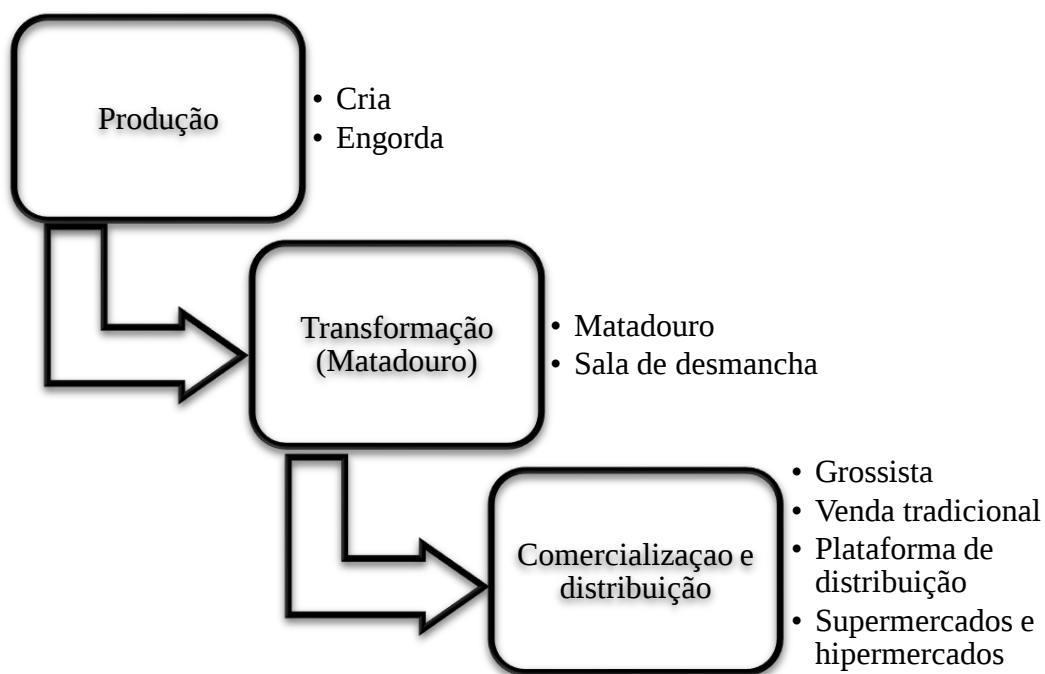
Figura 1: Evolução do número de carcaças abatidas em Portugal desde 2008 a 2014 (Fonte: INE 2014)

2.1. Cadeia de Valor

A cadeia de valor do setor da carne de coelho é muito semelhante às outras produções pecuárias. Estamos frente a uma produção tipo fechada, ou seja, apresenta maternidade e engorda numa só exploração.

Na cadeia de valor em questão (Figura 2), pode-se considerar a produção como o “elo mais fraco”, visto que tem a necessidade de comprar todos os alimentos para os animais e também porque tem dificuldade em repercutir o aumento de custos a nível da produção aos seus clientes, os matadouros (Instituto nacional da segurança alimentar, 2016; Monteiro *et al.*, 2013).

Tabela 4: Representação esquemática da cadeia de valor, identificando os diferentes locais por onde a carne de coelho passa até chegar ao consumidor final (Monteiro *et al.*, 2013)



2.2. Nível tecnológico das explorações, equipamento e maneio em Portugal

A grande maioria dos matadouros de Portugal tem sistemas de alimentação por carrinhos, sistema semiautomático, no entanto alguns já apresentam alimentação automática. Este tipo de sistemas permite que a distribuição do alimento composto seja feita em parte ou mesmo na totalidade ao longo da exploração.

Tem-se dado maior atenção ao bem-estar animal sendo que, em algumas explorações, podemos encontrar equipamento como ventilação forçada, com painéis de humidificação, o que permite um decréscimo da temperatura, tornando-se fundamental, principalmente, no verão (Instituto nacional da segurança alimentar, 2016; Monteiro *et al.*, 2013).

2.2.1. Debilidades do setor e ameaças

- Elevados custos de produção/preço venda (Grande necessidade de mão de obra, possíveis doenças enzoóticas (Mixomatose e enteropatia enzoótica), elevados custos, principalmente, nas matérias primas para a ração, variações acentuadas na produtividade e falta de oferta de produtos veterinários específicos;
- Falta de hábito de consumo da carne de coelho por grande parte da população;
- Importação de carcaças de matadouros de Espanha, matadouros estes que apresentam maiores dimensões e possibilidade de trabalhar em dois mercados;
- Custos acrescidos devido à modernização, obrigatórias por lei, não existindo ajudas para a sua adaptação;
- Baixo preço das carnes alternativas no mercado, como o porco e a galinha (Ferreira, 2013).

3. Segurança Alimentar

Na Europa, a legislação a nível da segurança alimentar tem vindo a aumentar, tornando-se cada vez mais exigente. Hoje em dia é fundamental que os manipuladores de carnes tenham uma formação adequada, sabendo aplicar os princípios de HACCP (*Hazard analysis and critical control points*) de forma correta. É fundamental o melhoramento da formação nesta área, garantindo que todos os manipuladores possuam conhecimentos adequados às suas funções, como as boas práticas na indústria alimentar, assegurando desta forma a proteção da saúde pública (Gomes-Neves *et al.*, 2011).

O manuseamento incorreto por parte dos manipuladores é uma das principais causas dos surtos de doenças na área alimentar. Estes surtos têm como consequência as perdas económicas graves, sendo então muito importante a formação dos manipuladores de alimentos, como referido anteriormente. Este tipo de formações permitem um aumento a nível da segurança alimentar, trazendo benefícios a longo prazo neste tipo de indústrias (Gomes-Neves *et al.*, 2011).

O Regulamento (UE) n.º 853/2004 (União Europeia, 2004a) vem salientar a importância de identificar todas as etapas de produção nas indústrias alimentares, garantindo desta forma a segurança para os consumidores. Esta lei vem também reconhecer a importância a nível da educação dos manipuladores de alimentos como um ponto essencial na prevenção de doenças transmitidas via alimentos. Os operadores são responsáveis pelo cumprimento dos requisitos de higiene estabelecidos ao longo de todo o processo de produção, passando pela transformação até à distribuição dos géneros alimentícios.

Segundo o *Codex Alimentarius* é fundamental a correta implementação de um sistema de HACCP, respeitando os princípios deste sistema exigindo todo empenhamento e cooperação dos colaboradores das empresas alimentares. Para a correta implementação deste sistema, os operadores devem possuir conhecimentos em várias áreas, nomeadamente, segurança alimentar, processos de fabrico, microbiologia e higiene pessoal, dos equipamentos e do espaço de trabalho. Após a correta implementação de um plano de HACCP é fundamental que os manipuladores apliquem os conhecimentos adquiridos na formação, para se tornarem capazes de gerir e controlar todos os pontos críticos de controlo (PCC).

É fundamental que os operadores das empresas do sector alimentar garantam aos consumidores que todas as fases da produção, transformação e distribuição de géneros alimentícios, satisfaçam os requisitos de higiene estabelecidas (União Europeia, 2004a).

4. Inspeção sanitária de coelhos - Tecnologia de abate

A implementação de boas práticas de higiene e a garantia do cumprimento dos requisitos estabelecidos nas normas de segurança de alimentos nos matadouros são pontos cruciais para a segurança da carne (Jenni e Janne, 2016).

Consideram-se os matadouros como um ponto fundamental na monitorização das doenças dos coelhos, pois qualquer tipo de observação e/ou informação conseguida no matadouro pode ajudar a compreender e ajustar toda a cadeia, desde a produção até ao abate dos animais. O veterinário inspetor apresenta como principal função sanitária garantir a salubridade dos produtos que abandonam o matadouro, para mais tarde chegarem até ao consumidor final. Cada vez mais se nota uma preocupação do consumidor a nível da qualidade do produto que está a consumir, tornando-se muito mais cauteloso e desconfiado após alguns escândalos alimentares (Garcia, 2003).

Na segunda metade dos anos 90 a União Europeia (EU) decidiu tomar medidas no sector da segurança alimentar, sendo que, a partir de 1 de Janeiro de 2006, a inspeção sanitária passou a ser guiada pelos Regulamentos (CE) nº854/2004 e nº882/2004 de 29 de Abril. O Regulamento estabelece as regras particulares a nível da execução dos controlos oficiais de produtos de origem animal com destino ao consumo humano (União Europeia, 2004a). Este documento completa os regulamentos que dizem respeito à higiene dos géneros alimentícios, às exigências específicas relativas aos géneros alimentícios de origem animal e aos controlos oficiais dos géneros alimentícios e dos alimentos para animais (Caetano, 2015).

No regulamento (CE) nº853/2004 encontram-se regras para os operadores das empresas do sector alimentar, referindo-se à higiene dos géneros alimentícios de origem animal que estão a ser manipulados (União Europeia, 2004b).

Segundo o regulamento (CE) nº853/2004, Capítulo II, da Seção II, do anexo III, os matadouros de lagomorfos para serem aprovados necessitam de cumprir vários requisitos, nomeadamente:

1. Deve haver uma sala ou local coberto que se destina à receção dos animais e à sua inspeção *ante mortem*;
2. Devem existir garantias da presença de um número suficiente de salas adaptadas para as operações que irão ser efetuadas;

3. Garantir a separação, no espaço ou no tempo, das seguintes operações:
 - 3.1. Atordoamento e sangria
 - 3.2. Esfolia
 - 3.3. Expedição da carne
 - 3.4. As instalações devem impedir o contacto entre a carne e o chão, paredes e dispositivos fixos
 - 3.5. Os matadouros devem dispor de cadeias de abate criadas de forma a permitir um andamento constante do processo de abate e de evitar contaminações cruzadas entre as diferentes partes da cadeia
4. Os matadouros devem dispor de um sistema de desinfecção dos utensílios, onde a água quente atinja, no mínimo, uma temperatura de 82°C, ou um sistema alternativo com igual efeito;
5. Deve existir um local separado onde seja possível proceder à limpeza, lavagem e desinfecção do equipamento de transporte.

4.1. Tecnologia de abate

A insensibilização nos coelhos realiza-se por electronarcose, podendo também ser utilizado o método de câmara de CO₂. O atordoamento deve ser realizado de forma correta, de forma a evitar qualquer tipo de sofrimento desnecessário no animal e também para que a sangria seja efetuada de forma rápida e completa. Após a insensibilização, os animais são suspensos na cadeia de abate pelas patas posteriores. É importante haver esta separação de salas, uma vez que a zona do cais de espera dos animais vivos é contaminada com pó e excrementos (Ferreira, 2013; União Europeia, 2004b).

Realiza-se a sangria manualmente, com incisão num dos lados do pescoço do animal, de forma a seccionar a jugular e a carótida. Após a realização da sangria, os animais passam para outra sala, onde se procede à esfolia (Garcia, 2003).

Não há um fluxograma fixo que os matadouros possam aplicar para a esfolia dos coelhos. Este depende de cada matadouro e do que este decide definir no seu manual de procedimentos. Independentemente do método de esfolia utilizado, é fundamental que o corte se realize de dentro para fora, de forma a que não se cortem os pelos, evitando assim a contaminação dos

tecidos subjacentes. É fundamental que a face externa da pele não contacte com a carcaça e que as mãos do operário não sejam também uma fonte de contaminação.

Segue-se a sala de evisceração, sendo esta uma sala considerada como zona limpa. A evisceração realiza-se manualmente e imediatamente após a esfolação. Quando não há rutura das vísceras é uma operação limpa, sendo necessário ter especial atenção à higiene das facas e das mãos dos operários para o sucesso desta operação (Garcia, 2003).

Salientam-se três operações concretas que devem ser efetuadas com máximo cuidado evitando assim que a carcaça seja conspurcada: retirada da bexiga, recessão do intestino a nível do reto e extirpação da vesícula biliar do fígado. É nesta fase que a inspeção *post mortem* deve ser feita. A inspeção da carne quente vai facilitar a observação de algumas alterações a nível da forma, consistência e cor da carcaça, assim como dos seus órgãos. Em função da aprovação sanitária da carcaça é anexada a marca de salubridade. A carcaça pode ou não passar por um duche, seguindo-se um processo de arrefecimento rápido. Por último, segue-se a refrigeração, sendo a carcaça de coelho geralmente constituída pela cabeça, fígado, rins, coração e pulmões (Garcia, 2003).

Considera-se o início das operações de abate quando os animais são declarados como aprovados. Esta permissão realiza-se após a submissão à inspeção *ante mortem*, realizada pelo veterinário oficial (União Europeia, 2004b)

4.2. Funções do veterinário oficial

O veterinário oficial exerce várias funções, nomeadamente funções de verificação:

1. Da execução permanente de boas práticas de higiene, nomeadamente, manutenção do equipamento da exploração, formação, higiene da exploração e do pessoal, tratamento dos subprodutos animais que não sejam destinados ao consumo humano, entre outros;
2. Dos procedimentos que se baseiam no sistema HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Point*) de análise de riscos e de controlo de pontos críticos, nomeadamente nos seguintes domínios:

- Existência de conformidade dos produtos de origem animal com os critérios microbiológicos estabelecidos;
- Ausência de substâncias proibidas, de contaminantes ou de resíduos químicos em níveis excessivos;
- Ausência de riscos físicos, como corpos estranhos, ausência de anomalias ou de alterações fisiopatológicas e ausência de contaminações (Caetano, 2015).

4.3. Inspeção *ante mortem*

Deve proceder-se a uma inspeção *ante mortem*, de todos os lotes de animais, para poder dar permissão ao início do abate no matadouro em causa (Garcia, 2003).

A inspeção *ante mortem* tem como principal objetivo verificar a existência, ou não, de sinais que provam um comprometimento do bem-estar animal, assim como qualquer outro fator que possa ter efeitos nefastos na saúde animal ou humana. Deve ser dada especial atenção para a presença de possíveis doenças, assim como de doenças de declaração obrigatória, doenças que constam na lista da OIE (Organização Mundial de Saúde Animal).

4.4. Inspeção *post mortem*

A inspeção *post mortem* é um exame macroscópico da carcaça e das vísceras. A avaliação à carcaça é constituída por vários parâmetros: grau da sangria, cor, odor, serosas e lesões (Garcia, 2003). É necessário fazer mais testes complementares, nomeadamente, palpação e incisão de partes da carcaça e das miudezas. Testes laboratoriais devem ser efetuados sempre que se ache relevante (Carranca *et al.*, 2010; citado por: Ferreira, 2013). De acordo com o estudo desenvolvido por (Ferreira, 2013), a principal causa de rejeição total e parcial de coelhos em matadouro são as lesões subcutâneas purulentas.

4.4.1. Lesões subcutâneas purulentas em coelhos abatidos para consumo

A lesão mais frequente encontrada na pele do coelho é a lesão purulenta, podendo ser simples ou múltipla, assim como de tamanho e localização diversa (Rampin *et al.*, 2008). *Pasteurella multocida* e *Staphylococcus* spp. são os agentes que estão, maioritariamente, associados a este tipo de lesões purulentas (Tantiñà *et al.*, 2000; citado por: Ferreira, 2013).

As lesões purulentas subcutâneas são importantes devido à sua incidência técnica, económica e também no bem-estar dos animais, visto que podem estar presentes nos coelhos de qualquer idade. Este tipo de lesões purulentas são, normalmente, resultado da contaminação de feridas dérmicas por bactérias piogénicas onde se podem salientar: *Staphylococcus* spp. (principalmente *S. aureus* e *S. hyicus*), *Streptococcus* spp., *Pasteurella multocida* e *Pasteurella aeruginosa* (Rosell *et al.*, 2000; citado por: Ferreira, 2013).

Trata-se de um problema que atinge todas as explorações, provocando em algumas delas um maior impacto, o que se vai refletir em taxas reprovação mais elevadas e, automaticamente, maiores perdas económicas. O conjunto de dados adquiridos nesta investigação pode possibilitar aos veterinários responsáveis um foco maior em relação às prováveis causas da ocorrência deste tipo de lesões purulentas e da forma como podem ser controlados de forma eficaz. Foi possível concluir que, este tipo de lesões, devem ser monitorizadas no matadouro como ferramenta de auxílio na implementação de boas práticas de manejo. São vários os pontos que se têm que ter em conta para o controlo das lesões purulentas, designadamente, densidade animal por jaula e a higiene da cunicultura, entre outros (Ferreira, 2013).

4.5. Reprovações totais

As reprovações totais em coelhos podem ter varias causas, nomeadamente: artrite, aspeto febril, caquexia, cistite, conspurcação, icterícia, pneumonia e traumatismo. As pneumonias por estafilococos caracterizam-se pela presença de múltiplas lesões purulentas nas carcaças de coelhos (Badiola, 2000).

Quando, por algum motivo, se verifica conspurcação das carcaças, pelo conteúdo intestinal dos animais, resulta imediatamente em reprovação total das mesmas. Para tentar minimizar possíveis danos, é fundamental que se respeite o jejum prévio dos animais, desta forma o conteúdo gástrico e intestinal é mínimo (União Europeia, 2004b).

De acordo com o conhecimento dos autores, este é o primeiro trabalho realizado na pesquisa de MRSA em lesões purulentas de coelhos. Mesmo assim, podem ser salientados três grandes riscos provenientes de estafilococos: risco ocupacional, contaminações cruzadas (segurança alimentar) e a capacidade de aquisição de resistência a antibióticos.

A nível de saúde pública, é um tema preocupante e com necessidade extrema de ser investigado. A partir do momento em que o agente se encontra num único animal, é crucial agir com o maior cuidado possível. As contaminações cruzadas podem constituir um grave problema na linha de abate, assim como a falta de cuidado por parte dos trabalhadores, como por exemplo, a má higienização dos aparelhos ou a falta de equipamento adequado, por exemplo: luvas. Torna-se crucial a implementação de uma análise de bom funcionamento de perigos e pontos críticos de controle (HACCP) para a segurança da carne nos matadouros (Jenni e Janne, 2016).

5. *Staphylococcus aureus*

Sabe-se que antes da introdução dos antibióticos, na década de 40, *Staphylococcus* spp. era o agente maioritariamente responsável pelas infecções hospitalares, salientando-se os pacientes com pneumonias. Iniciou-se a comercialização da penicilina, observando-se a suscetibilidade desta bactéria a esse mesmo medicamento. No entanto, passados alguns anos, foi possível verificar-se estirpes isoladas com resistência a esse mesmo antibiótico. Tentando contornar o problema, colocaram-se no mercado novos antibióticos, como eritromicina, tetraciclina e aminoglicosídeos. Na década de 50, houve registo de um aparecimento de estirpes multirresistentes. Por volta de 1960 foi lançado um novo antibiótico com capacidade para combater bactérias multirresistentes, a metilicina. Pensou-se então que se teria encontrado uma arma poderosa para combater qualquer tipo de infeção que pudesse vir a surgir. Tal não aconteceu, pois pouco tempo após o lançamento deste antibiótico estava a ser descrita uma estirpe com capacidade de resistência. *Staphylococcus aureus* apresenta como principal característica a aptidão de desenvolver eficazmente resistência aos agentes antimicrobianos. Conclui-se que, a elevada utilização de antibióticos se traduz num aumento da resistência de *Staphylococcus aureus* (Leite, 2008; Monteiro, 2013).

As bactérias do género *Staphylococcus* são gram-positivas e organizam-se em cachos ou aglomerados arredondadas e irregulares (cocos), sendo que estes não apresentam mobilidade. *Staphylococcus* spp. são anaeróbios facultativos, ou seja, apresentam capacidade de crescimento em baixas quantidades de oxigênio, não esporulados e apresentam uma baixa carência a nível nutricional. Estes organismos colonizam naturalmente o organismo humano, podendo estar presentes em vários locais como na pele, nas mucosas e, temporariamente, também no trato gastrointestinal do ser humano (Rodolfo, 2014).

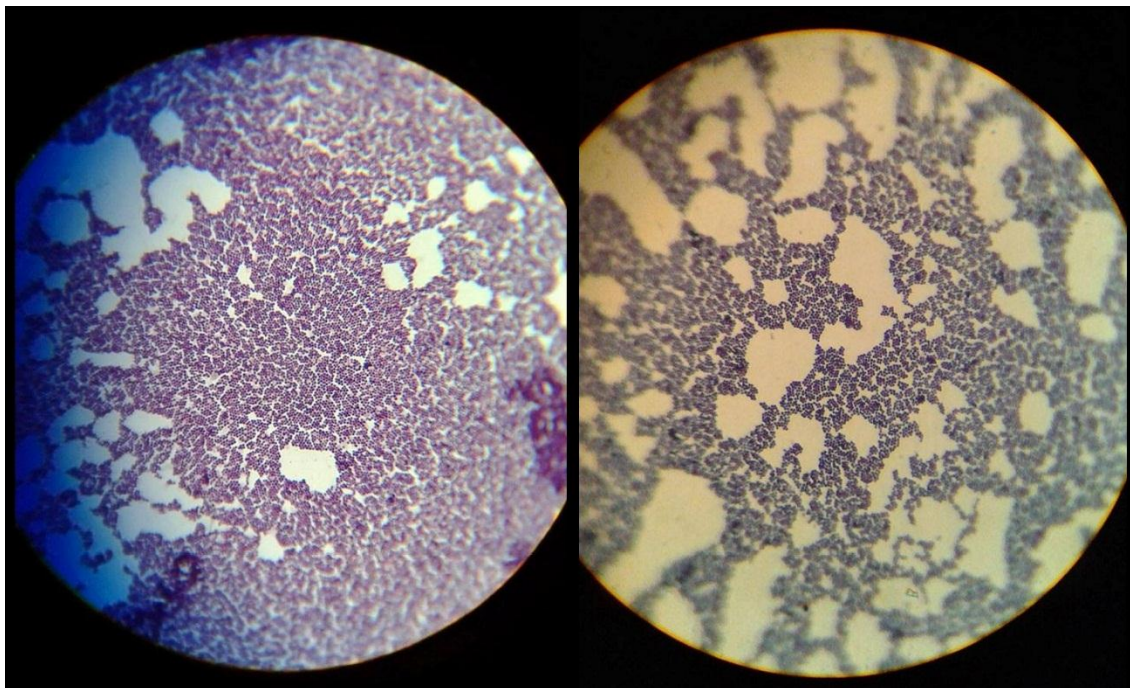


Figura 2: *Staphylococcus* spp. visto ao microscópio, resolução 100/1.25, sendo possível visualizar a sua forma (cocos), assim como uma coloração violeta devido à capacidade de retenção do cristal violeta de metilo, da camada de peptidoglicano, presente na parede celular

Staphylococcus aureus é uma bactéria ubiquamente distribuída na natureza. É possível isolá-la a partir de vários produtos alimentares, sendo considerado um dos mais importantes contaminantes nesta área (Morente *et al.*, 2016). É um agente patogénico oportunista adaptável que apresenta capacidade de originar intoxicação alimentar, designada por estafilocócica, através da produção de enterotoxinas nos alimentos (Rodríguez-Calleja *et al.*, 2006; Viana *et al.*, 2007). É considerado um agente patogénico humano importante, não só pela capacidade de originar intoxicações alimentares, mas também pela capacidade de provocar infeções de pele e respiratórias (Liu, 2015). As infeções provocadas por *Staphylococcus aureus* podem ser divididas em quatro partes fundamentais: colonização, evasão a nível das defesas dos hospedeiros afetados, divisão celular e, por último, dispersão bacteriana (Leite, 2008).

Trata-se de um agente patogénico associado a taxas de mortalidade e morbilidade elevadas, tendo capacidade para produzir infeções em vários tecidos do corpo humano. Apresentam também, como referido anteriormente, uma elevada capacidade em adquirir resistência aos antibióticos, podendo assim, sobreviver às mais variadas circunstâncias ambientais. São estas propriedades que tornam este agente numa bactéria perigosa no ambiente hospitalar (Leite, 2008). *Staphylococcus aureus* pode causar um vasto leque de doenças em

seres humanos, podendo variar entre infecções de pele e doenças mais graves. *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) foi descrito pela primeira vez no ano 1961 adquirindo importância a nível dos cuidados de saúde (Agnoletti *et al.*, 2014).

Staphylococcus aureus é uma bactéria comum no ser humano, encontra-se nas narinas de cerca de 20% da população, sendo que grande parte dos portadores são assintomáticos (Davi Traverso *et al.*, 2013). O processo que permite a infecção no ser humano, geralmente, acontece quando o nosso sistema imunitário se encontra debilitado, ou seja, quando sujeito a tratamentos agressivos, doenças, ou outro tipo de intervenções que possibilitam uma entrada para estes microrganismos (Leite, 2008).

A intoxicação alimentar estafilocócica é uma intoxicação causada pela ingestão de alimentos contaminados, no mínimo, por uma das várias enterotoxinas pré-formadas por *Staphylococcus* spp. (Hart, 2015).

São bactérias gram positivas, pertencentes à família *Micrococaceae*, com capacidades de provocar processos supurativos, mastite e piodermite, verificando-se tanto no Homem como nos animais. A aptidão de propagação deste microrganismo deve-se, principalmente, à sua rápida e eficaz capacidade de adaptação aos mais diversos ambientes, tanto a nível de pH, pressão osmótica, humidade ou até deficiência de nutrientes. Esta capacidade de adaptação vai viabilizar a colonização do Homem, assim como a do ambiente ao seu redor (Leite, 2008).

É possível detetar o microrganismo com facilidade nas carcaças de coelho, ainda assim, as particularidades das estirpes em questão são escassas (Merz *et al.*, 2016a). Contudo, é conhecido que *Staphylococcus aureus* é uma bactéria versátil com capacidade de conviver em vários nichos tanto de seres humanos como de animais (Rodríguez-Calleja *et al.*, 2006). As bactérias usam as feridas superficiais da pele do coelho como via de entrada, sendo que estas são muito frequentes em coelhos mantidos em gaiolas ou em coelhos de tamanho considerável. Outra situação frequente é no período de lactação, onde podem surgir ferimentos a nível da glândula mamária (Davi Traverso *et al.*, 2013).

A mastite bovina é uma consequência causada pelos agentes patogénicos do género *Staphylococcus*. Tem-se vindo a verificar uma resistência desse género à meticilina, como já foi referido, levando a uma imensa preocupação, visto que pode levar à redução da eficácia dos tratamentos para mastite (Fernandes *et al.*, 2015).

A possível aquisição de resistência a antibióticos, como *Staphylococcus* resistentes à meticilina, pode ser um problema tanto para animais como para os humanos, por exemplo, no tratamento de infecções (Fernandes *et al.*, 2015).

Em animais, este tipo de infecções pode causar elevadas perdas económicas quando os coelhos são criados para produção de carne (Agnoletti *et al.*, 2014). No caso dos coelhos, esta bactéria infecta e invade os tecidos subcutâneos originando lesões, tais como processos supurativos, mastite e piodermatite (Viana *et al.*, 2007). Dois tipos de estirpes de *Staphylococcus aureus* têm sido relacionados com as infecções de coelhos, as estirpes de "baixa virulência" e estirpes de "alta virulência". As de "baixa virulência" afetam um número reduzido de animais e as estirpes de "alta virulência" provocam elevada morbilidade e mortalidade (Hermans *et al.*, 1999).

A transmissão das estirpes de *Staphylococcus aureus*, tanto de baixa como de alta virulência, do Homem para os coelhos ou entre os próprios coelhos, pode ser direta ou indireta. A transmissão indireta pode acontecer através das jaulas, pelos ou alimentos (Hermans *et al.*, 2003; citado por: Ferreira, 2013).

Staphylococcus aureus é uma bactéria de fácil transmissão, requer somente a existência de um contacto entre os animais. É também fundamental ter atenção às mãos dos tratadores e às agulhas ou à cama dos ninhinhos, pois representam importantes veículos contaminantes (Boucher & Nouaille, 1996; citado por: Ferreira, 2013). Um outro ponto que não deve ser esquecido, é a mobilidade dos animais nas explorações, tornando assim a disseminação muito mais fácil e rápida (Ferrian *et al.*, 2010). As reprodutoras, que são portadoras de estafilococos nas suas cavidades nasais, transmitem com grande facilidade as bactérias aos filhos, devido ao contacto existente, tanto direto como por aerossóis. Esta transmissão resulta de atividades como a amamentação e cuidados prestados aos láparos (Patton *et al.*, 2008; citado por: Ferreira, 2013).

Quando o problema com *Staphylococcus aureus* afeta uma exploração é essencial tomar as medidas corretas, ou seja, proceder ao abate dos animais, desinfetar as instalações de modo correto e só depois dar início a uma nova reprodução. A higienização é um passo fundamental, pois se não for realizado de forma correta, ao instalar os novos animais, estes irão entrar em contacto com a estirpe, o que irá afetar todo o rebanho como aconteceu anteriormente (Vancraeynest *et al.*, 2007).

A contaminação da carne por agentes patogénicos é um ponto fundamental na área da segurança alimentar, visto que pode comprometer a saúde dos consumidores. Os animais que chegam aos matadouros são, frequentemente, portadores de *Staphylococcus aureus*. Como já foi mencionado, este agente pode ser encontrado em vários pontos da carcaça, nomeadamente, em cortes ou lesões. Estirpes humanas podem também estar presentes, principalmente, quando

um processo implica uma elevada manipulação e se existir um processo de higienização insuficiente (Rodríguez-Calleja *et al.*, 2006).

Como principais grupos de microrganismos que representam uma possível ameaça para os consumidores é fundamental referir as estirpes *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA) e *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP), de origem animal. As estirpes de MRSA são consideradas oportunistas hospitalares adquiridas, quando isoladas em seres humanos, tornando-se assim num problema de saúde pública a nível mundial (Cuny *et al.*, 2010).

III. Material e métodos

1. Recolha das amostras

Atendendo aos objetivos deste trabalho, a recolha das amostras foi realizada durante as tarefas diárias inerentes à inspeção sanitária dos lagomorfos, num período de quatro meses (Julho 2015 a Setembro 2015). Foram recolhidas 66 amostras de lesões purulentas em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), num matadouro no norte do país, escolhido de modo aleatório. De cada animal foi colhida uma amostra. Tratam-se de amostras purulentas subcutâneas decorrentes de rejeições totais. As lesões eram recolhidas assepticamente, guardadas em recipientes esterilizados, devidamente identificados, e enviadas posteriormente para o laboratório de microbiologia médica, sob condições de refrigeração.

2. Isolamento de *Staphylococcus aureus* em lesões purulentas de coelho

Com objetivo de isolar *Staphylococcus aureus* e MRSA, as amostras foram semeadas em diferentes meios até se conseguir obter culturas puras de estafilococos.

Os meios usados no presente estudo foram combinados com água destilada e autoclavados a uma temperatura de 121°C ao longo de 15 minutos. Os meios foram plaqueados no interior de uma câmara de fluxo laminar vertical. O meio de leite foi distribuído em criotubos que foram posteriormente autoclavados durante de 10 minutos a 121°C. O meio de ORSAB, após de ser autoclavado, foi-lhe adicionado o antibiótico no interior da câmara de fluxo laminar vertical, após o arrefecimento do mesmo, ou seja, a uma temperatura suportada pela mão humana.

Tendo por objetivo o isolamento de *Staphylococcus aureus* foi necessário submergir as lesões purulentas em BHI (*Brain Heart Infusion*) líquido, utilizando para o efeito recipientes estéreis. Trata-se de um meio muito nutritivo e suplementado com 6,5% de NaCl permitindo uma pré-seleção de *Staphylococcus* spp. O pus das lesões foi retirado com o auxílio de um bisturi e uma pinça, ambos estéreis. Os recipientes foram colocados na estufa à temperatura de 37°C durante 24h, simulando condições ótimas de crescimento.

O conteúdo dos recipientes permitiu semear, por esgotamento, em meios seletivos e diferenciais. Os meios utilizados foram MSA (*Manitol Salt Agar*) e ORSAB (*Oxacillin Resistance Screening Agar Base*) suplementado com 2mg/ml de oxacilina, de forma a observar o crescimento de colônias resistentes a este antibiótico. As placas foram colocadas em estufa à temperatura de 37°C durante 24h.

Ambos os meios utilizados para esta metodologia são seletivos, ou seja, permitem o crescimento de determinadas bactérias, assim como a distinção de diferentes espécies devido à mudança de cor dos meios.

Colônias de estafilococos crescem apresentando uma coloração azul brilhante, permitindo fazer uma identificação rápida destas bactérias (Figura 4). Quando as bactérias são fermentadoras de manitol, o meio apresenta uma coloração amarela e indica que as bactérias presentes são, possivelmente, *Staphylococcus aureus* (Figura 5). No caso de não serem fermentadoras de manitol o meio conservar-se cor-de-rosa e indica que as bactérias poderão ser *Staphylococcus epidermidis* ou outros estafilococos coagulase-negativo (CNS). Esta distinção, através da coloração adquirida nas placas, deve-se à alteração de pH.

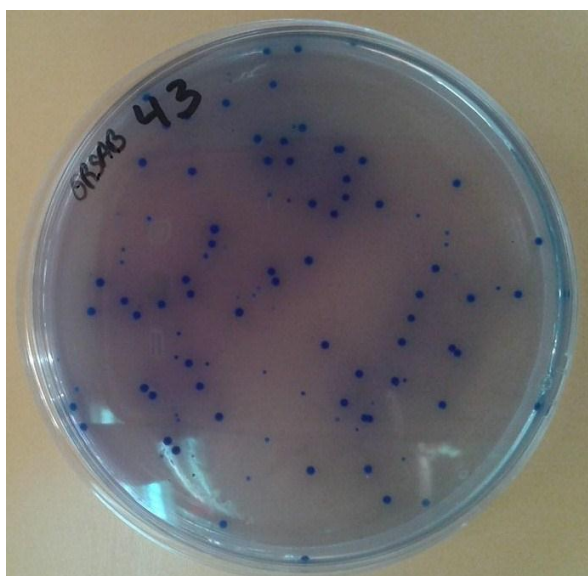


Figura 3: Placa com meio ORSAB onde é possível visualizar colônias azuis brilhantes, indicando uma suspeita de MRSA



Figura 4: Placa com meio de MSA, sendo possível observar uma mudança de cor do meio de vermelho para amarelo, indicando a suspeita de *Staphylococcus* fermentadores de manitol

Seguidamente, isolaram-se colónias de estafilococos, utilizando o método de estria em placas de BHI agar, com o auxílio de uma ansa. Fez-se isolamento em estria com o objetivo de obter uma colónia isolada. As placas foram colocadas na estufa à temperatura de 37°C durante 24h. As colónias isoladas foram semeadas em quarto de placa recorrendo à técnica de esgotamento. As placas foram à estufa a uma temperatura de 37°C ao longo de 24h.

De forma a proceder aos testes bioquímicos (DNase, Gram e Catalase), semearam-se as amostras utilizando o mesmo meio assim como a técnica de esgotamento em quarto de placa com o auxílio de uma ansa estéril.

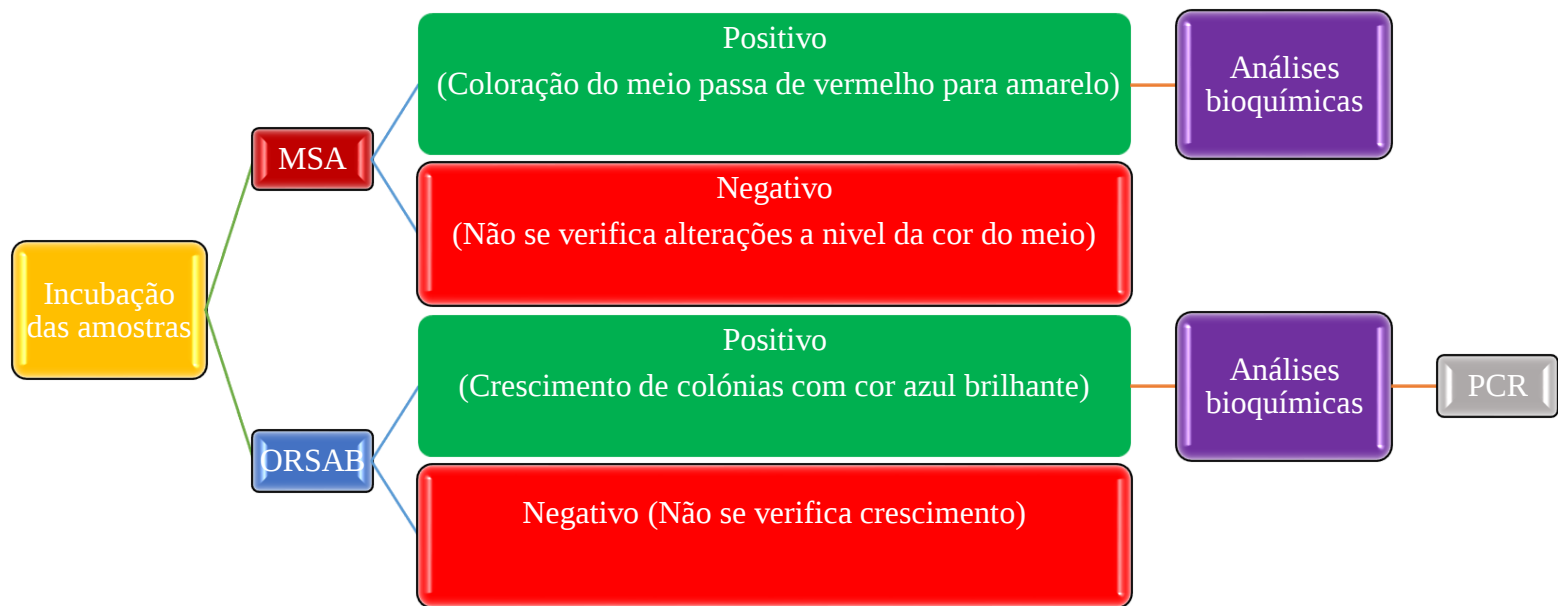


Figura 5: Resumo do processo de isolamento de *Staphylococcus aureus* e MRSA, indicando os meios diferenciais utilizados (MSA e ORSAB), assim como os testes realizados, nomeadamente, análises bioquímicas e PCR

3. Testes (Teste Gram, Teste DNase e Teste Catalase)

3.1. Teste Gram

O teste Gram permite observar as colônias ao microscópio, permitindo distinguir bactérias Gram-positivas (coloração azul violeta, como é visível na Figura 3) de bactérias Gram-negativas (coloração rosa escuro). O teste permite verificar a capacidade de retenção do cristal violeta de metilo, da camada de peptidoglicano, presente na parede celular. Quanto mais espessa for essa camada maior é a retenção. No caso de o microrganismo possuir uma camada fina de peptidoglicano, observa-se uma cor rosa/vermelho, significando que o teste é Gram-negativo.

Para a realização deste teste, coloca-se uma colônia isolada numa lâmina, adiciona-se violeta de metilo (corante), seguido do lugol (fixador). Estes dois reagentes, são absorvidos tanto pelas bactérias Gram-positivas como pelas Gram-negativas, observando-se uma coloração violeta devido à formação de um complexo cristal violeta-iodo, insolúvel. O próximo passo é adicionar álcool, este vai dissolver a porção lipídica das membranas externas das bactérias gram-negativas, provocando a remoção do corante retido. O último passo é a adição o vermelho neutro e posterior visualização ao microscópio.

3.2. Teste DNase

O teste da DNase permite verificar se o microrganismo possui DNase positiva ou negativa, ou seja, se surge a degradação do ácido desoxirribonucleico (ADN).

Para o teste da DNase foi necessário semear em botão, utilizando um controlo positivo no centro da placa (Figura 7). Colocou-se na estufa, a uma temperatura de 37°C, durante 24h. Com o auxílio de uma pipeta, colocou-se ácido clorídrico (HCl a 0,1N) no interior das placas, em volta das colônias. Os resultados seriam avaliados consoante a formação, ou não formação, de um halo transparente em torno do botão (Figura 7). Este halo é visível quando o MRSA degrada o DNA presente na colônia. Sabe-se que existe uma correlação positiva de cerca de 98% entre DNase e coagulase, possibilitando a distinção entre dois grupos, *Staphylococcus* coagulase positivos, como por exemplo *Staphylococcus aureus*, e *Staphylococcus* coagulase negativos, como *Staphylococcus epidermidis*. Ou seja, DNase positivo é seguramente indicativo de estafilococos coagulase positivo (CoPS) e DNase negativo de CNS.

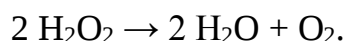
Após a conclusão dos testes bioquímicos as amostras foram guardadas em meio de leite, com auxílio de uma ansa, em criotubos devidamente identificados, a uma temperatura de cerca de -20°C.



Figura 6: Exemplo de placa com meio BHI agar, semeada em botão para o teste da DNase, sendo possível observar a formação de halos transparentes em volta de todas as colônias, indicando resultados positivos

3.3. Teste Catalase

As enzimas desempenham um papel importante em reações químicas industriais. A catalase é uma enzima intracelular, podendo ser encontrada em grande parte dos organismos decompositores de peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Nesta reação, os produtos obtidos são água e oxigénio, tornando-se visíveis a olho nu através de efervescência (Mafra *et al.*, 2016).



O teste da catálase realiza-se utilizando água oxigenada, o reagente é colocado numa lâmina e adiciona-se, com uma ansa, a colónia isolada anteriormente. Se for possível notar efervescência, significa que o é teste positivo à catalase, caso não se verifique efervescência, o é teste negativo.

4. Extração de DNA

Para extrair DNA foi necessário semear as colônias em BHI agar, utilizando uma zaragatoa estéril. As placas foram colocadas na estufa a uma temperatura de 37°C ao longo de 24h.

Nos eppendorfs colocaram-se 45µL de água ultra pura estéril (água MiliQ), onde, de seguida, se colocou a colônia utilizando um fio reto devidamente esterilizado. Foram utilizados 5µL de lisostafina (1mg/ml), permitindo destruir a parede celular dos *Staphylococcus*, expondo o DNA. De seguida, os eppendorfs foram colocados em banho-maria a uma temperatura de 37°C durante 10min, esta temperatura é ótima para a atuação da lisostafina. Adicionaram-se 45µL de água ultra pura estéril (água MiliQ), 150µL de Tris-HCl (0,1N com pH 8) e, por fim, 5µL de proteinase K (2mg/ml). Colocaram-se os eppendorfs a uma temperatura de 60°C ao longo de 10min, sendo esta a temperatura ótima para a atuação da proteinase K. Por fim, passou-se para uma temperatura de 100°C durante 5min com a finalidade de destruir a enzima, estabilizando a reação de extração do DNA. Para guardar as amostras foi novamente utilizado o método de congelação.

5. *Polymerase chain reaction (PCR)*

Como referido anteriormente, *Staphylococcus aureus* é um agente patogénico alimentar com elevada relevância na saúde humana, podendo causar doenças transmitidas por alimentos. Torna-se então fundamental a utilização de um método rápido e eficiente que permita a deteção deste microrganismo, permitindo o controlo das doenças na área alimentar (Xu *et al.*, 2016).

A reação em cadeia por ação da polimerase (PCR) é um instrumento fundamental no que diz respeito ao diagnóstico de agentes patogénicos, permitindo uma deteção rápida e de alto rendimento para múltiplas espécies (Xu *et al.*, 2012). Através da ação da DNA polimerase permite a amplificação de uma sequência específica de DNA delimitada por um conjunto de *primers* (Cheng *et al.*, 2016).

O processo é composto por vários ciclos térmicos que ocorrem no interior do termociclador e é possível dividir a reação em três grandes passos: a desnaturação, o *annealing* e a extensão dos *primers*, tendo-se realizado com o auxílio de um termociclador (T300 Thermocycler, Biometra®).

Para a realização do PCR utilizou-se um multiplex de primers: 16S com 886bp (para o controlo de DNA nas amostras a analisar), *mecA* com 527bp (gene responsável pela resistência à Oxa) e o *nuc* com 255bp (indicador da presença de *Staphylococcus aureus*) como ilustra a Figura 4.

Os *primers* foram selecionados de acordo com os genes de interesse que queríamos testar de forma a caracterizar molecularmente as colónias isoladas.

5.1. Preparação dos tubos da PCR

Para que seja possível a multiplicação do DNA é necessário a utilização de uma mix de reagentes (H₂O, Buffer MgCl₂, DNTPs e Taq polimerase). Cada tubo de reação tem o volume final de 50 µL, sendo 49 µL do mix e 1µL do DNA (Tabela 4).

Para todos os conjuntos de reações foi necessário incluir dois controlos: um positivo que continha DNA de uma estirpe confirmada para a presença do gene de interesse, por sequenciação e um negativo em que não foi adicionada DNA. O controlo positivo. Os controlos utilizados neste trabalho pertencem à coleção de estirpes da Universidade de Trás-os-Montes e

Alto Douro. O controlo negativo não contém DNA, essa mesma quantidade é substituída por água esterilizada.

Tabela 5: Componentes e concentrações usadas para a reação de PCR (50µL/tubo de PCR)

Constituintes	Quantidade (µL)
H ₂ O	32,7
Buffer (MgCl ₂)	5,0
DNTPs	5,0
Primer 16S forward	1,0
Primer 16S reverse	1,0
Primer <i>mecA</i> forward	1,0
Primer <i>mecA</i> reverse	1,0
Primer <i>nuc</i> forward	1,0
Primer <i>nuc</i> reverse	1,0
Taq	0,3
DNA	1,0
Total	50,0

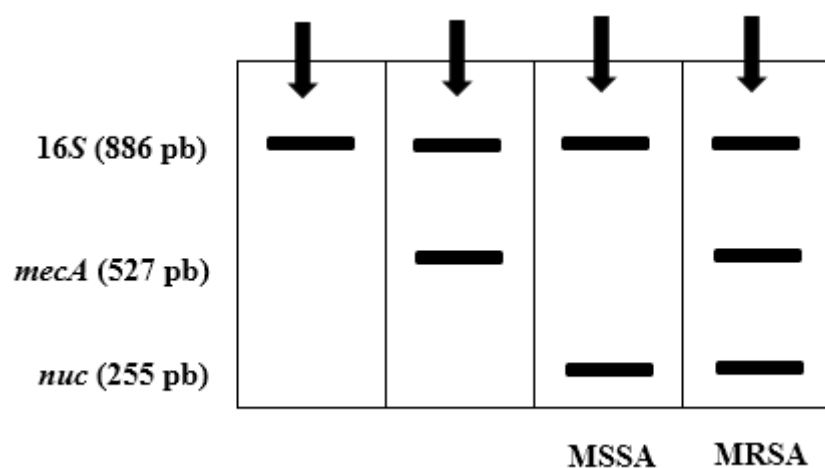


Figura 7: Representação esquemática dos padrões de PCR, podendo-se observar a presença de MSSA quando são visíveis as bandas de 16S e *nuc* e a presença de MRSA quando possível de observar as bandas de 16S, *mecA* e *nuc*

5.2. Eletroforese em gel de agarose

Para ser possível separar e visualizar os amplicões obtidos na técnica de PCR, executou-se a técnica da eletroforese horizontal em gel de agarose com Red Safe incorporado (Figura 9).

5.2.1. Preparação do gel de agarose

Utilizou-se uma concentração de agarose a 1% nos géis. Preparou-se adicionando 1g de agarose a 100mL de tampão TBE 1x (constituído por: 54 g/L Tris (hidroximetil) aminometano; 27,5 g/L ácido bórico e 20 ml EDTA 0,5 M com pH 8). A mistura foi aquecida no micro-ondas, permitindo que a agarose se dissolvesse. Deixou-se arrefecer e adicionaram-se 5µL de tampão RedSafe para a coloração de DNA, ao colocar-se sob a luz violeta.

A mistura é colocada na tina, permitindo a solidificação da mesma e, conseqüentemente, a formação dos poços devido ao molde utilizado. Aguardou-se que o gel arrefecesse e solidificasse.

5.3. Inserção dos produtos de PCR

O molde foi retirado do gel solidificado e depositou-se, em cada poço, uma quantidade total de 10µl do produto PCR juntamente com tampão de deposição. Este tampão tem como constituintes: água, glicerol (1ml), xilenocienol (0,05g) e azul de bromofenol (0,05g). O glicerol apresenta função de deposição e o xilenocienol permitem uma visualização da banda mais nítida.

Os controlos, positivo e negativo, foram colocados no fim de cada gel, respetivamente. A eletroforese foi realizada a 96 Volts, durante 45 minutos.

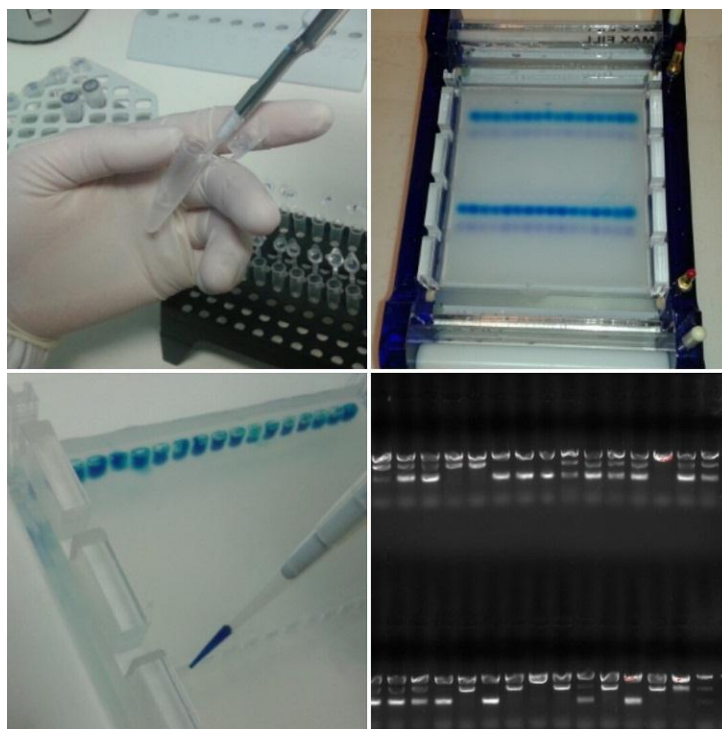


Figura 8: Etapas de trabalho. Canto superior esquerdo: Preparação do mix; Canto superior direito: Eletroforese em gel de agarose; Canto inferior esquerdo: Inserção da amostra nos poços do gel de agarose; Canto inferior direito: Visualização computacional

5.4. Visualização do gel

Após o final da eletroforese, observou-se a presença dos amplicões no gel através de luz UV, utilizando o aparelho ChemiDoc™ XRS+ Image Lab da BioRAD, associado a um *software* específico (ImageLab) de análise computacional, onde é possível obter imagens como a ilustrada na Figura 5:

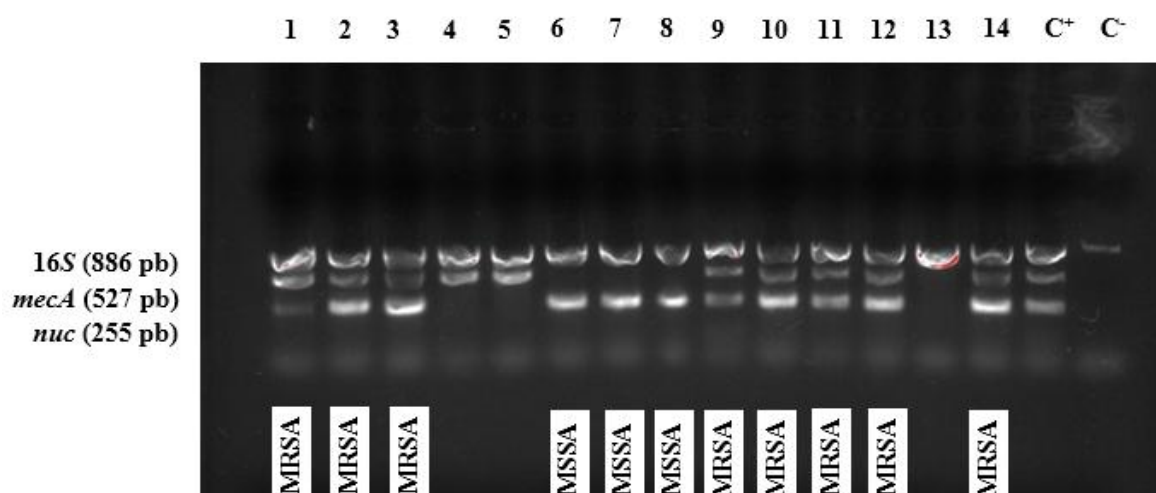


Figura 9: Exemplo obtido na eletroforese em gel de agarose podendo-se observar a presença de MSSA quando são visíveis as bandas de 16S e *nuc* e a presença de MRSA quando possível de observar as bandas de 16S, *mecA* e *nuc*

5.5. Identificação dos microrganismos isolados

O gene *mecA* codifica uma proteína de ligação à penicilina, confere resistência à meticilina. A detecção deste gene é considerado o método de referência para a detecção da resistência à meticilina em estafilococos. *Staphylococcus aureus* podem ser distinguidos dos outros *Staphylococcus* spp. pela presença do gene *nuc*, que codifica uma nuclease extracelular termoestável.

Tabela 6: Sequências nucleotídicas dos *primers* de PCR para genes identificadores de *Staphylococcus aureus*

Gene	Primers	Tamanho do produto	TA (Temperatura de annealing)
<i>nuc</i>	F: TCAGCAAATGCATCACAAACAG R: CGTAAATGCACTTGCTTCAGG	255 bp	55°C
<i>mecA</i>	F: GGGATCATAGCGTCATTATTC R: AACGATTGTGACACGATAGCC	527 bp	
16S	F: GTGCCAGCAGCCGCGGTAA R: AGACCCGGAACGTATTAC	886 bp	

IV. Resultados e Discussão

Trata-se do primeiro estudo realizado na pesquisa de MRSA em lesões purulentas de coelhos, de acordo com o conhecimento dos autores.

Staphylococcus aureus, o agente isolado em lesões purulentas de coelho no presente trabalho, está amplamente disperso pelas cuniculturas. Foi referenciado que a maior parte das lesões purulentas tem como ponto de partida a rutura da pele para que seja possível haver colonização da lesão pelas bactérias existentes no meio ambiente, provenientes de outros coelhos ou até mesmo do próprio animal (Ferrian *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos neste estudo confirmam a presença de MRSA em 14 animais, num total de 66 analisados, tendo permitido identificar 83 isolados (Tabela 7).

Os resultados para os testes bioquímicos efetuados no presente estudo encontram-se presentes no Anexo I.

Os resultados encontrados no presente estudo são concordantes com estudos anteriores, mencionados ao longo deste trabalho, que relataram a presença de *Staphylococcus aureus* em lesões de coelhos e, também, em outros animais (Tabela 8).

Tabela 7: Tabela de resultados obtidos no presente estudo, com a quantificação de MRSA, MSSA, *mecA*⁺, CNS e MRSP

Coelho (Nº amostra)	Isolados		MRSA	MSSA	<i>mecA</i> ⁺	MRSP	CNS
	Coelho	Total	Nº animais				
3,6,9,11,15,17,20, 32,35,36,37,38,39, 43,47,48,50,53,55, 57,58,60,64	1	23	2	15	4	-	2
2,4,5,8,10,16,18,22, 23,24,25,26,27,28, 29,30,31,40,41,42, 44,49,51,54,56,59, 61,62,65,66	2	60	12	34	8	1	5
1,7,12,13,14,19,21, 33,34,45,46,52,63	0	0	-	-	-	-	-
Total: 66	Total:	83	14	49	12	1	7

As lesões purulentas subcutâneas são achados comuns em coelhos de matadouros de todas as idades. São relevantes devido à elevada ocorrência que apresentam, na cunicultura e nos matadouros, assim como nas quebras económicas e no bem-estar animal (Ferreira, 2013). Torna-se assim fundamental identificar os principais motivos que levam às reprovações totais. Um ponto de partida é a identificação dos agentes etiológicos envolvidos nas lesões abcessiformes, que, no nosso estudo, foi possível concluir que se trata de *Staphylococcus aureus*. Estes resultados vão ao encontro de estudos feitos anteriormente por outros autores (Hermans *et al.*, 1999; Viana *et al.*, 2007).

Staphylococcus aureus é o agente maioritariamente presente nas lesões purulentas analisadas no presente trabalho, confirmando que se trata de um agente amplamente difundido pela cunicultura. Como foi referido, é uma bactéria que se encontra presente em animais considerados portadores sãos, responsáveis pela transmissão do agente, podendo ser encontrado na pele e mucosas destes animais. Trata-se de uma bactéria facilmente transmissível, exigindo apenas um contacto entre os animais (Ferreira, 2013).

O ponto de partida do nosso estudo foram as lesões abcessiformes em coelhos. Sendo esta a principal causa de reprovação em matadouro considerámos importante o estudo das mesmas, localizando-as na carcaça dos animais.

O potencial risco acrescido para a saúde pública, evidenciado neste estudo, reflete-se através do isolamento de MRSA no presente trabalho. Analisando os resultados obtidos ao longo deste estudo, podemos concluir que, a partir de 66 animais, 66 amostras (uma amostra por animal), 83 isolados, se confirmaram 14 animais com a presença de MRSA, 49 animais com MSSA, 12 *mecA*⁺, 7 CNS e 1 animal com a presença de MRSP.

Estes resultados são provenientes da reação em cadeia por ação da polimerase (PCR), um instrumento fundamental no diagnóstico de agentes patogénicos, permitindo uma deteção rápida e de alto rendimento para múltiplas espécies. Para esta técnica utilizaram-se os primers: 16S, *mecA* e *nuc*. Quando são visíveis as bandas 16S e *mecA*, significa que se trata de um caso de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. Quando são visíveis as bandas 16S e *nuc* significa que se trata de um caso de MSSA. No caso de serem visíveis as três bandas, dos três primers utilizados, significa que estamos perante um caso de MRSA.

Um estudo, publicado em 2016, teve como objetivo a análise de estafilococos coagulase positivos, a partir de animais selvagens (Nowakiewicz *et al.*, 2016). O material para o estudo foi constituído por 76 amostras fecais, recolhidas de animais selvagens de várias espécies. Os autores referem que as bactérias do género *Staphylococcus* podem constituir uma ameaça potencial para a saúde pública, salientando a sua resistência aos fármacos. Acontece que, os microrganismos que vivem no segmento final do aparelho digestivo, incluindo *Staphylococcus*, podem contaminar com elevada facilidade no meio ambiente, juntamente com as fezes dos animais, transferindo-se assim para outros animais e seres humanos (Nowakiewicz *et al.*, 2016).

Staphylococcus aureus também pode estar presente nos animais de produção, podendo constituir um risco de saúde pública como contribuir para perdas económicas. Em 2014 foi publicado o primeiro relato de MRSA numa exploração de coelho industrial. Este estudo envolveu os coelhos da exploração, os trabalhadores rurais e os seus familiares. O caso descrito

por estes autores evidencia a presença de MRSA na produção de carne de coelho industrial (Agnoletti *et al.*, 2014). Na Tabela 8 encontram-se diversos estudos na pesquisa de *Staphylococcus aureus* e MRSA em diferentes animais, podendo-se verificar que o número de resultados positivos de MRSA, em proporção ao número de animais analisados, não é tão alarmante como no presente estudo.

Tabela 8: Estudos realizados na pesquisa de *Staphylococcus aureus* e MRSA em diversos animais

Animal	Tipo de amostra	Número de amostras	Microrganismo identificado	Número de amostras positivas	Autor
Suínos	Amostras nasais	110	MRSA	41	(Cleef, 2014)
Bezerros	Amostras nasais	307	MRSA	6	(Couto <i>et al.</i> , 2014)
Coelhos	Abcessos	31	<i>Staphylococcus aureus</i>	8	(Ferreira, 2013).
Suínos, bovinos e aves	Amostras de infecções	99 suínos 112 bovinos 85 aves	MRSA	Suínos: 1 Bovinos: 0 Aves: 0	(Hasman <i>et al.</i> , 2010)
Coelhos	Amostras fecais e amostras de carcaças	500 amostras fecais e 500 amostras de carcaças	<i>Staphylococcus aureus</i> e MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> : 151 MRSA: 0	(Kohler <i>et al.</i> , 2008)
Animais selvagens	Amostras do ânus	76	MRSA	1	(Nowakiewicz <i>et al.</i> , 2016)
Coelho	Carcaças	51	<i>Staphylococcus aureus</i>	26	(Rodríguez-Calleja <i>et al.</i> , 2006)

1. Estudo das lesões abcessiformes

As lesões purulentas de coelho têm, maioritariamente, como consequência a reprovação total *post mortem* dos coelhos na linha de abate. Estes resultados vão ao encontro das conclusões tiradas por outros autores, nomeadamente, Garcia (2003) e Rampin e colaboradores (2008), indicando também as lesões purulentas como causa maior de reprovação destes animais em matadouro (Garcia, 2003; Rampin *et al.*, 2008). Este tipo de lesões purulentas são muito comuns nas cuniculturas, podendo-se desenvolver de uma forma rápida e atingir tamanho considerável, sem apresentar alterações aparentes no animal (Ferreira, 2013).

2. Localização das lesões purulentas

Como já foi referido neste estudo, sabe-se que o surgimento de lesões purulentas depende de múltiplos fatores relacionados com o meio ambiente em que se encontram os animais (Piccirillo *et al.*, 2008; citado por: Ferreira, 2013). Um bom exemplo é a densidade das jaulas onde estão os coelhos, referido também por Viana e colaboradores (2007). Quanto maior for o número de animais por jaula, maior será a densidade, o que leva a que haja uma maior competição entre os animais tanto pelo alimento como pela água disponível. Ao haver esta necessidade de competição, automaticamente, os animais vão-se tornar mais agressivos, aumentando assim a possibilidade de surgimento de feridas a partir dos equipamentos, assim como haverá também uma facilidade mais acentuada a nível de disseminação dos agentes patogénicos, tanto por contacto direto como indireto. Estes fatores levam a que a contaminação das feridas dérmicas por agentes patogénicos, como *Staphylococcus aureus*, possam levar à formação de lesões purulentas (Badiola, 2000).

O *Codex Alimentarius* salienta a importância da correta implementação de um sistema de HACCP, respeitando os princípios deste sistema exigindo todo empenhamento e cooperação dos colaboradores das empresas alimentares. Os operadores devem possuir conhecimentos em várias áreas, nomeadamente, segurança alimentar, processos de fabrico, microbiologia e higiene pessoal, dos equipamentos e do espaço de trabalho.

Num estudo recente, foi possível concluir que grande parte das não conformidades na implementação de boas práticas estão ligadas à higiene. É preocupante que o não cumprimento relacionado com os métodos de trabalho de higiene não esteja conforme as normas, refletindo-

se em termos de segurança da carne. A falta de higiene ao longo das práticas de abate é considerado um risco importante para a segurança da carne e pode ser relacionado com surtos de intoxicação alimentar graves (Jenni e Janne, 2016).

Torna-se assim fundamental a aquisição de formação, pela parte dos operadores, evitando danos maior. A formação dos trabalhadores, como referido anteriormente, tem vindo a ganhar valor nos últimos anos e está a ser implementada aos poucos. Isto vem de encontro ao estudo relatado em 2011 (Gomes-Neves *et al.*, 2011).

V. Conclusões

A cunicultura é, sem dúvida, um setor onde Portugal deveria apostar no futuro, tendo em conta que é um país deficitário a nível da produção e com probabilidade de um aumento de consumo nos próximos anos. Para tal ser possível, é essencial haver várias alterações relativamente aos apoios, ou seja, conceção de ajudas, a criação de instrumentos de mercado apropriados, a criação de associações, mais informação e também a divulgação dos benefícios nutricionais da carne de coelho.

As lesões abcessiformes levam a uma elevada percentagem de reprovações a nível das carcaças de coelho nos matadouros. Este tipo de lesões afeta todas as explorações, tendo maior relevância em algumas, o que se vai traduzir em percentagens de reprovação mais elevadas e, por sua vez, maiores perdas económicas. Este número mais elevado de reprovações pode estar diretamente relacionado com o número de animais que as explorações possuem, ou seja, o tamanho das explorações. Pode naturalmente estar também associado às condições que os animais têm nas explorações, assim com as condições existentes ao longo do percurso entre a exploração e o matadouro às quais os animais são sujeitos.

Comprova-se que *Staphylococcus aureus* é um agente que está associado à etiologia das lesões abcessiformes. Esta conclusão permite aos veterinários, responsáveis pelas explorações, uma melhor compreensão relativamente às possíveis causas da ocorrência destas lesões purulentas nos animais, assim como lhes dá informações de como o seu controlo e prevenção poderá ser mais eficiente, evitando perdas maiores.

O controlo das lesões abcessiformes, nas carcaças de coelho, é importante para a minimização dos fatores de risco. Após a realização deste estudo, a nosso ver, cremos que é fundamental a existência de monitorização nos matadouros, tornando-se um apoio para a implementação de boas práticas de manejo.

As circunstâncias em que os animais se encontram alojados, assim como a densidade animal por jaula e a higiene na exploração, são pontos essenciais para o controlo das lesões abcessiformes e, conseqüentemente, da rentabilidade das explorações.

Existem diversos procedimentos que permitem a redução de *Staphylococcus aureus* nos animais e, conseqüentemente, levam a uma melhoria a nível de produtividade e rentabilidade da cunicultura. Exemplos destas medidas são, entre outras, o uso de repousa patas, uma higiene

mais cuidada dos ninhos e o uso de matérias secantes nos mesmos. A realização destas boas práticas trará benefícios para o funcionamento das explorações.

Com o presente estudo foi-nos possível verificar que MRSA se encontra presente em lesões abcessiformes subcutâneas. A técnica de PCR é um instrumento fundamental na pesquisa destes microrganismos, sendo uma forma rápida e eficaz para chegar aos resultados pretendidos.

Torna-se assim, a nosso entender, fundamental a continuação deste tipo de estudos, no sentido de perceber se existem mais formas viáveis para evitar o surgimento deste agente etiológico nas explorações/matadouros.

Referências Bibliográficas

- Agnoletti, F. *et al.* (2014). First reporting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 in an industrial rabbit holding and in farm-related people. *Veterinary Microbiology*, 170 (1-2): 172-177.
- Badiola, J. I. (2000). Aparato respiratorio: Pasteurellosis. Em: *Enfermedades del conejo* , Ediciones Mundi-Prensa ed.,Madrid, p. 275-288.
- Caetano, T. (2015). *Caetano, T.* Associação Nacional de Empresas de Segurança Alimentar, 2015. Recuperado em 2015, de <<http://www.anesaportugal.org/seguranca-alimentar-/141/produtos-de-origem-animal/>>.
- Cheng, J. H.; Chou, H. T.; Lee, M. S. e Sheu, S. C. (2016). Development of qualitative and quantitative PCR analysis for meat adulteration from RNA samples. *Food Chemistry*, 192 336-342.
- Couto, N.; Belas, A. e Centeno, M. (2014). First description of *fexA*-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ST398 from calves in Portugal. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2(4): 342-343.
- Cuny, C. *et al.* (2010). Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in different animal species. *International Journal of Medical Microbiology*, 300 (2-3): 109-117.
- Dalle Zotte, A. (2002). Perception of rabbit meat quality and major factors influencing the rabbit carcass and meat quality. *Livestock Production Science*, 75 (1): 11-32.
- Dalle Zotte, A.; Cullere, M.; Sartori, A.; Szendrő, Z.; Kovacs, M.; Giaccone, V. e Dal Bosco, A. (2014). Dietary *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) and Thyme (*Thymus vulgaris*) supplementation to growing rabbits: Effects on raw and cooked meat quality, nutrient true retention and oxidative stability. *Meat Science*, 98 (2): 94-103.
- Davi Traverso, S., L. da Cunha, J. César Teixeira Fernandes, A. Paulino Loretto, A. Rhoden, E. Wunder Jr, and D. Diemeier, (2013). *Mastite com lesões sistêmicas por Staphylococcus aureus subesp. aureus em coelhos*., Santa Maria.
- Fernandes, S. F.; Mendonça, L. C.; Reis, D. R. d. L.; Guimarães, A. d. S.; Lange, C. C.; Ribeiro, J. B.; Machado, M. A. e Brito, M. A. V. P. (2015). Presence of *mecA*-positive multidrug-resistant *Staphylococcus epidermidis* in bovine milk samples in Brazil. *Journal of Dairy Science*.
- Ferreira, A. C. T. (2013). *Contribuição para o estudo das lesões abscessiformes em coelhos abatidos para consumo*. Mestrado em Segurança Alimentar, Universidade de Trás os Montes e Alto Douro, Vila Real.

Ferrian, S.; Guerrero, L.; Penadés, M.; Viana, D.; Coroa, J. M. e Selva, L. (2010). Cómo se transmiten las enfermedades en conejos y qué podemos hacer para evitarlo . *Revista de Cunicultura*, 25-29.

Garcia, B. (2003). Higiene e inspección de la carne de conejo y de caza de cría o granja. *Higiene e inspeccion de carnes*, 441-454 .

Gomes-Neves, E.; Cardoso, C. S.; Araújo, A. C. e Correia da Costa, J. M. (2011). Meat handlers training in Portugal: A survey on knowledge and practice. *Food Control*, 22 (3–4): 501-507.

Hart, M. E. (2015). Chapter 9 - Current Issues in Foodborne Illness Caused by *Staphylococcus aureus*. Em: *Food Safety*, S. C. Ricke, J. R. Donaldson e C. A. Phillips (eds.), Academic Press, San Diego, p. 159-184.

Hasman, H.; Moodley, A.; Guardabassi, L.; Stegger, M.; Skov, R.L. e Aarestrup, F.M. (2010). spa type distribution in *Staphylococcus aureus* originating from pigs, cattle and poultry. *Veterinary Microbiology*, 141(3–4): 326-331.

Heitor, A. (2009). Heitor, A. 2009. Recuperado em 2016, de <http://www.confagri.pt/Floresta/Fichas_especies/Pages/Coelho.aspx>.

Hermans, K.; De Herdt, P.; Devriese, L. A.; Hendrickx, W.; Godard, C. e Haesebrouck, F. (1999). Colonization of rabbits with *Staphylococcus aureus* in flocks with and without chronic staphylococcosis. *Veterinary Microbiology*, 67 (1): 37-46.

Instituto nacional da segurança alimentar (2016). *Instituto nacional da segurança alimentar*. Instituto nacional da segurança alimentar, 2016. Recuperado em 2016, de <<https://insa.foodcase.ch/foodcomp/food?284>>.

Jenni, L., e Janne, L. n. (2016). Compliance in slaughterhouses and control measures applied by official veterinarians. *Food Control*, 68 133-138.

Kohler, R.; Krause, G.; Beutin, L.; Stephan, R. e Zweifel, C. (2008). Shedding of food-borne pathogens and microbiological carcass contamination in rabbits at slaughter. *Veterinary Microbiology*, 132 (1–2): 149-157.

Leite, G. B. (2008). *Análise de portadores assintomáticos de Staphylococcus aureus no hospital universitário de Brasília*. Master, Universidade de Brasília, Brasília.

Litoral Coelho (2016). *Litoral Coelho*. Litoral Coelho, 2016. Recuperado em 2016, de <<http://www.litoralcoelho.pt/novidades/a-carne-de-coelho-como-fonte-de-proteinas-ideal-para-o-optimo-desenvolvimento-da-massa-muscular/>>.

Liu, D. (2015). Chapter 55 - Enterotoxin-Producing *Staphylococcus aureus*. Em: *Molecular Medical Microbiology (Second Edition)*, Y.-W. T. S. L. P. Schwartzman ed., Academic Press, Boston, p. 979-995.

Mafra, A. C. O.; Kopp, W.; Beltrame, M. B.; de Lima Camargo Giordano, R.; de Arruda Ribeiro, M. P. e Tardioli, P. W. (2016). Diffusion effects of bovine serum albumin on cross-linked aggregates of catalase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 133 107-116.

Merz, A.; Stephan, R. e Johler, S. (2016a). Genotyping and DNA microarray based characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from rabbit carcasses. *Meat Science*, 112 86-89.

Merz, A.; Stephan, R. e Johler, S. (2016b). Genotyping and DNA microarray based characterization of *Staphylococcus aureus* isolates from rabbit carcasses. *Meat Science*, 112 86-89.

Monteiro, J. M., I. C. Lindo, C. Alexandre, and E. Alexandre, (2013). *Estratégia para uma cunicultura sustentável - Enquadramento do setor da cunicultura*). Associação portuguesa de cunicultura, Portugal.

Monteiro, R. (2013). *Análise proteómica de uma estirpe clínica de Staphylococcus aureus ST398 resistente à meticilina*. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real.

Morente, E. O.; del Postigo Ruiz, A. G. e Pulido, R. P. (2016). *Staphylococcus*: Detection. Em: *Encyclopedia of Food and Health*, B. Caballero, P. M. Finglas e F. Toldrí (eds.), Academic Press, Oxford, p. 128-132.

Naff, K. A. e Craig, S. (2012). Chapter 6 - The Domestic Rabbit, *Oryctolagus Cuniculus*: Origins and History. Em: *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents American College of Laboratory Animal Medicine*, Academic Press, Boston, p. 157-163.

Nowakiewicz, A.; Ziolkowska, G.; Zieba, P.; Gnat, S.; Wojtanowicz-Markiewicz, K. e Troscianczyk, A. (2016). Coagulase-positive *Staphylococcus* isolated from wildlife: Identification, molecular characterization and evaluation of resistance profiles with focus on a methicillin-resistant strain. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 44 21-28.

Rampin, F.; Piccirillo, A.; Schiavon, E.; Poppi, L. e Grilli, G. (2008). Detection of pathological lesions in slaughtered rabbits. *Italian journal animal science*.

Rodolfo, Felipe (27-9-2014). *Rodolfo, Felipe*. 27-9-2014. Recuperado em 19-5-2016, de <<http://www.institutododelta.com.br/?p=2644>>.

Rodríguez-Calleja, J. M.; García-López, I.; Santos, J. A.; Otero, A. e García-Lopez, M. L. (2006). Molecular and phenotypic typing of *Staphylococcus aureus* isolates from rabbit meat. *Research in Microbiology*, 157 (5): 496-502.

Géneros alimentícios. Regras gerais de higiene dos géneros alimentícios destinados aos Operadores de Empresas do Sector Alimentar - "Regulamento (CE) N.º852/2004". União Europeia.

Géneros alimentícios. Regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios - "Regulamento (CE) N.º853/2004". União Europeia.

Van Cleef, B.A.G.L.; van Benthem, B.H.B.; Verkade, E.J.M.; van Rijen, M.; Kluytmans-van den Bergh, M.F.Q.; Schouls, L.M.; Duim, B.; Wagenaar, J.A.; Graveland, H.; Bos, M.E.H.; Heederik, D. e Kluytmans, J.A.J.W. (2014). Dynamics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* carriage in pig farmers: a prospective cohort study. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(10): O764-O771.

Vancraeynest, D.; Haesebrouck, F. e Hermans, K. (2007). Multiplex PCR assay for the detection of high virulence rabbit *Staphylococcus aureus* strains. *Veterinary Microbiology*, 121 (3-4): 368-372.

Viana, D.; Selva, L.; Segura, P.; Penadés, J. R. e Corpa, J. M. (2007). Genotypic characterization of *Staphylococcus aureus* strains isolated from rabbit lesions. *Veterinary Microbiology*, 121 (3-4): 288-298.

Xu, Y. G.; Liu, Z. M.; Zhang, B. Q.; Qu, M.; Mo, C. S.; Luo, J. e Li, S. L. (2016). Development of a novel target-enriched multiplex PCR (Tem-PCR) assay for simultaneous detection of five foodborne pathogens. *Food Control*, 64 54-59.

Xu, Y.; Cui, L.; Tian, C.; Li, S.; Cao, J.; Liu, Z. e Zhang, G. (2012). A multiplex polymerase chain reaction coupled with high-performance liquid chromatography assay for simultaneous detection of six foodborne pathogens. *Food Control*, 25 (2): 778-783.

VI. Anexos

1. Tabela dos resultados dos isolados de coelhos

Animal	Isolado	Gram	Catalase	DNase	Espécie
Coelho 2	MSA 2	+	+	-	CNS
	OR 2	+	+	+	MRSA
Coelho 3	MSA 3	+	+	+	MSSA
Coelho 4	MSA 4	+	+	+	MSSA
	OR 4	+	+	+	MRSA
Coelho 5	MAS 5	+	+	-	CNS
	OR 5	+	+	+	MRSA
Coelho 6	MSA 6	+	+	+	MSSA
Coelho 8	MSA 8	+	+	-	CNS
	OR 8	+	+	-	<i>mecA</i> ⁺
Coelho 9	MSA 9	+	+	+	MSSA
Coelho 10	MSA 10	+	+	+	MSSA
	OR 10	+	+	+	MRSA
Coelho 11	MSA 11	+	+	+	MSSA
Coelho 15	MSA	+	+	+	MSSA
Coelho 16	MSA	+	+	+	MSSA
	OR	+	+	+	MSSA
Coelho 17	MSA	+	+	-	CNS

Coelho 18	MSA	+	+	+	MSSA
	OR	+	+	+	MSSA
Coelho 20	MSA	+	+	+	MSSA
Coelho 22	MSA	+	+	+	MSSA
	OR	+	+	+	MRSA
Coelho 23	MSA	+	+	+	MSSA
	OR	+	+	+	MRSA
Coelho 24	MSA	+	+	+	MSSA
	OR	+	+	+	MRSA
Coelho 25	MSA	+	+	+	MSSA
	OR	+	+	+	MRSA
Coelho 26	MSA	+	+	+	MSSA
	OR	+	+	-	CNS
Coelho 27	MSA	+	+	+	MSSA
	OR	+	+	+	MRSA
Coelho 28	MSA	+	+	+	MSSA
	OR	+	+	+	MRSA
Coelho 29	MSA	+	+	+	MSSA
	OR	+	+	+	MRSA
Coelho 30	MSA	+	+	+	MSSA
	OR	+	+	+	MRSA
Coelho 31	MSA	+	+	+	MSSA
	OR	+	+	+	MSSA
Coelho 32	OR	+	+	-	<i>mecA</i> ⁺
Coelho 35	MSA	+	+	+	MSSA
Coelho 36	MSA	+	+	+	MSSA
Coelho 37	MSA	+	+	+	MSSA

Coelho 38	MSA	+	+	+	MSSA
Coelho 39	MSA	+	+	+	MSSA
Coelho 40	MSA	+	+	+	MSSA
	OR	+	+	+	MSSA
Coelho 41	MSA	+	+	+	MSSA
	OR	+	+	-	<i>mecA</i> ⁺
Coelho 42	MSA	+	+	+	MSSA
	OR	+	+	-	CNS
Coelho 43	MSA	+	+	+	MSSA
Coelho 44	MSA	+	+	+	MSSA
	OR	+	+	-	<i>mecA</i> ⁺
Coelho 47	OR	+	+	+	MRSA
Coelho 48	MSA	+	+	+	MSSA
Coelho 49	MSA	+	+	+	MSSA
	OR	+	+	-	<i>mecA</i> ⁺
Coelho 50	MSA	+	+	+	MSSA
Coelho 51	MSA	+	+	+	MSSA
	OR	+	+	+	MSSA
Coelho 53	OR	+	+	-	<i>mecA</i> ⁺
Coelho 54	MSA	+	+	+	MSSA
	OR	+	+	-	<i>mecA</i> ⁺
Coelho 55	OR	+	+	-	<i>mecA</i> ⁺
Coelho 56	MSA	+	+	+	MSSA

	OR	+	+	+	MRSP
Coelho 57	OR	+	+	+	<i>mecA</i> ⁺
Coelho 58	OR	+	+	+	MRSA
Coelho 59	MSA	+	+	+	MSSA
	OR	+	+	-	<i>mecA</i> ⁺
Coelho 60	MSA	+	+	+	MSSA
Coelho 61	MSA	+	+	+	MSSA
	OR	+	+	+	MSSA
Coelho 62	MSA	+	+	+	MSSA
	OR	+	+	-	<i>mecA</i> ⁺
Coelho 64	MSA	+	+	-	CNS
Coelho 65	MSA	+	+	+	MSSA
	OR	+	+	+	MSSA
Coelho 66	MSA	+	+	+	MSSA
	OR	+	+	-	<i>mecA</i> ⁺