

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Maximiliano Dias da Silva de Moraes

Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em cortes de frango e
avaliação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos

Rio de Janeiro

2016

Maximiliano Dias da Silva de Moraes

Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em cortes de frango e avaliação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Orientadoras: Maria Helena Simões Villas Bôas

Silvia Maria dos Reis Lopes

Rio de Janeiro

2016

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Moraes, Maximiliano Dias da Silva de

Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em cortes de frango e avaliação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. / Maximiliano Dias da Silva de Moraes – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2016.

73 f.: il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2016.

Orientadoras: Maria Helena Simões Villas Bôas; Silvia Maria dos Reis Lopes.

1. *Listeria monocytogenes*. 2. *Salmonella*. 3. Contaminação de Alimentos. 4. Galinha. 5. Anti-Infeciosos . I. Título

Research of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in poultry cuts and evaluation of susceptibility profile to antimicrobial agents

Maximiliano Dias da Silva de Moraes

Pesquisa de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em cortes de frango e avaliação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária.

Aprovado em: 19/02/2016

BANCA EXAMINADORA

Antônio Eugênio Castro Cardoso Almeida (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Raquel Regina Bonelli (Doutor)
Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes

Marco Antonio Lemos Miguel (Doutor)
Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes

Maria Helena Simões Villas Bôas (Doutor) – Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Silvia Maria dos Reis Lopes (Doutor) – Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico este trabalho à memória de José
Carlos de Moraes, meu pai herói.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por essa oportunidade de adquirir maior conhecimento e qualificação. Por me sustentar em inúmeras situações e permanecer junto de mim nos momentos mais difíceis que passei.

Aos meus pais José Carlos (*in memoriam*) e Rosane, por todo amor, carinho, apoio e educação que me deram durante toda a minha vida. O homem que sou hoje é fruto de seus esforços.

À Ana Carla, por todo apoio, amor e dedicação que têm me dado nestes dois anos que estamos juntos. Você é a prova de que por trás de todo grande homem, há uma grande mulher a lhe auxiliar.

Aos meus familiares por sempre acreditarem em mim e me apoiarem a crescer em minha vida profissional.

Às minhas orientadoras, Maria Helena e Silvia, por terem me aceitado como seu aluno e por toda a paciência, apoio e ensinamentos dedicados à elaboração deste projeto.

Aos meus amigos do Setor de Alimentos, por toda ajuda, paciência e afeto que me ajudaram a amadurecer como ser-humano e como profissional.

À Daniella e Gabrielle, por sempre estarem dispostas a me ajudar quando me deparei com novas técnicas e pelas divertidas conversas nas (raras) horas vagas.

Aos setores de Meio de cultura e de Esterilização do INCQS/FIOCRUZ em Saúde, por todo apoio na disponibilidade dos insumos necessários ao projeto. Além disso, sou grato às amizades ali conquistadas. Obrigado por todo zelo que tiveram comigo.

Ao Laboratório de Bactérias de Referência - INCQS/FIOCRUZ e ao setor de Biologia Molecular do Laboratório de Alimentos e Saneantes - INCQS/FIOCRUZ, pelo suporte em ceder por diversas vezes o espaço para realização das técnicas.

Ao Laboratório de Zoonoses Bacterianas – IOC/FIOCRUZ e ao Laboratório de Enterobactérias – IOC/FIOCRUZ, pelo auxílio da identificação dos isolados.

Aos Doutores Antônio Eugenio, Raquel Bonelli e Marco Miguel, por sempre terem estado dispostos a me ajudar na elucidação e solução de diferentes obstáculos durante o decorrer do projeto.

RESUMO

A avicultura em escala industrial sofre problemas decorrentes do elevado número de frangos e das limitações do controle higiênico-sanitário, o que pode ocasionar um grande número de doenças. O uso de antimicrobianos como terapêutica é uma das ferramentas existentes para o controle de patógenos. Tais substâncias também podem ser usadas como aditivos na ração e água dos frangos, objetivando a melhoria no ganho de peso e desenvolvimento animal. Entretanto, o uso em larga escala de diferentes classes de antibióticos contribui para o desenvolvimento de resistência e pode agravar o problema da disseminação de bactérias patogênicas como *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. Estas duas bactérias estão entre as maiores causadoras de doenças transmitidas por alimentos (DTA) no mundo, tornando-se importante problema em saúde pública atualmente. Diferentes estudos isolaram cepas de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. de alimentos, incluindo carne de frango, e identificaram padrões de resistência a vários antibióticos. O presente estudo teve como objetivo pesquisar a ocorrência e o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em 40 amostras de cortes de frango de diferentes marcas comercializadas na cidade do Rio de Janeiro. Como resultado, 80% das amostras resfriadas e 54,3% das amostras congeladas apresentaram contaminação por *Salmonella* e *L. monocytogenes*. Os sorotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b, de *L. monocytogenes* e os sorovares Agona, Heidelberg, Brandenburg, Infantis, Worthington e Enteritidis de *Salmonella*. foram isolados. Através da Multiplex-PCR de Doumith e colaboradores (2004) um exemplar da variante IVb-v1 de *L. monocytogenes*, normalmente relacionado a amostras clínicas, foi detectado entre as amostras isoladas. Quanto à sensibilidade aos antimicrobianos testados, foi detectada a resistência de três isolados de *L. monocytogenes* à eritromicina, enquanto houve sensibilidade a meropenem e trimetoprim-sulfametoxazol. Já os isolados de *Salmonella* spp. apresentaram resistência a ampicilina, amoxicilina + ác. clavulânico, tetraciclina, ác. nalidíxico, nitrofurantoína, ceftriaxona e aztreonam.

Palavras-chave: *Listeria monocytogenes*. *Salmonella* spp. Resistência. Carne de Frango

ABSTRACT

Poultry farming on an industrial scale suffers problems due to the high number of chickens and limitations of the hygienic- sanitary control, which may cause a huge number of diseases. Antimicrobial therapy is one of the existing tools for the control of pathogens. Such substances can also be used as additives in feed and water for the chickens, aiming at the improvement in weight gain and animal development. However, the large-scale use of antibiotics of different classes contributes to the development of resistance and can aggravate the problem of spreading of pathogenic bacteria such as *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. These two bacteria are among the major cause of foodborne illness in the world, making it important concepts in public health today. Different studies have isolated strains of *L. monocytogenes* and *Salmonella* spp. of foods, including chicken and identified different antibiotic resistance patterns. This study aimed to research the occurrence and antimicrobial susceptibility profile of isolates of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in 40 samples of chicken parts from different brands sold in the city of Rio de Janeiro. Considering that 80 % of the cooled samples and 54.3 % of frozen samples were contaminated by *Salmonella* and *L. monocytogenes*. The serotypes 1/2a, 1/2b, 1/2c and 4b of *L. monocytogenes* and serotypes Agona, Heidelberg, Brandenburg, Infantis, Enteritidis and Worthington of *Salmonella* they were isolated. By Multiplex -PCR Doumith and colleagues (2004) a copy of the IVb - v1 of *L. monocytogenes* variant, usually related to clinical samples, was detected among the samples. Concerning antibiotics sensitivity was detected resistance of three strains of *L. monocytogenes* to erythromycin, there was sensitivity to meropenem and trimethoprim - sulfametoxazole. The isolates of *Salmonella* spp shown resistance to ampicillin, amoxicillin + clavulanic acid, tetracycline, nalidixic acid, nitrofurantoin, ceftriaxone and aztreonam.

Key words: *Listeria monocytogenes*. *Salmonella* spp. Resistance. Poultry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Quadro1. Substâncias antimicrobianas autorizadas para uso veterinário como aditivos em rações de frangos de corte.....	14
Quadro 2 – Manifestações clínicas descritas em infecções em adultos por <i>L. monocytogenes</i>	27
Quadro 3 - Sequência de iniciadores utilizados para amplificação, tamanho (pb) e especificidade dos sorovares de <i>Listeria monocytogenes</i>	38
Figura 1 - Relação de contaminação por <i>Salmonella</i> spp. e <i>Listeria monocytogenes</i> entre amostras resfriadas e congeladas de cortes de frango comercializados em supermercados do município do Rio de Janeiro.	44
Figura 2 – Sorotipos de <i>Listeria monocytogenes</i> identificados nas amostras resfriadas e congeladas de cortes de frango comercializados em supermercados do município do Rio de Janeiro	46
Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose dos resultados da Multiplex-PCR e do perfil atípico de amplificação do gene <i>Imo0737</i> da cepa identificada <i>L. monocytogenes</i> sorotipo 4b (IVb-v1).....	47
Figura 4 - Sorovares de <i>Salmonella</i> spp. identificados nas amostras resfriadas e congeladas de cortes de frango comercializados em supermercados do município do Rio de Janeiro	50
Tabela 1 - Teste de sensibilidade aos antimicrobianos dos sorotipos de <i>Listeria monocytogenes</i> , segundo o EUCAST (2015) e avaliação da concentração mínima inibitória dos antibióticos Ampicilina e Penicilina, segundo o CLSI (2010).....	54
Tabela 2 - Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos sorovares de <i>Salmonella</i> spp., segundo CLSI (2015b).....	57

LISTA DE SIGLAS

ActA	Proteína de montagem e indução da actina
AMP	Adenosina Monofosfato
APT	Água Peptonada Tamponada
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BAM	<i>Bacteriological Analytical Manual</i>
BLEB	Caldo Tampão para Enriquecimento de <i>Listeria</i>
BSAC	<i>British Society for Antimicrobial Chemotherap</i>
CA-SFM	<i>Committé Antibiogramme – Société Française de Microbiologie</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CLSI	<i>Clinical laboratory Satandards Institute</i>
DIN	<i>Germany Institute for Standarization</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
E-caderina	Caderina epitelial
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	<i>European Comitte on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FbpA	Proteínas ligadoras de fibronectina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fim	Fímbria do tipo I
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HK	Hektoen
Hpt	Hexose-fosfato translocase
InIA	Internalina A
InIB	Internalina B
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
LIA	Ágar Lisina Ferro

LPS	Lipopolissacarídeos
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MDR	Multi-Droga Resistente
MH-F	Ágar Müeller Hinton para micro-organismos fastidiosos
MIC	Minimum inhibitory concentration
NARMS	<i>National Antimicrobial Resistance Monitoring System For Enteric Bacteria</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OppA	Proteína transportadora de oligopeptídeos
PREBAF	Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SIM	Motilidade, Indol, Sulfeto
SRGA	<i>Swedish reference group for Antibiotics</i>
SUS	Sistema Único de Saúde
TSAYE	Ágar Trypticaseína de Soja, contendo 0,6% de Extrato de Levedura
TSBYE	Caldo Trypticaseína de Soja, contendo 0,6% de Extrato de Levedura
TSI	Ágar Tríplice Açúcar Ferro
UBABEF	União Brasileira de Avicultura
USDA	<i>United State Department of Agriculture</i>
XLD	Ágar Xilose, Lisina, Desoxicolato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
1.1 ANTIBIÓTICOS NA AVICULTURA	13
1.2 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	15
1.4 <i>Salmonella</i> spp.....	21
1.4.1 Salmonelose.....	22
1.4.2 Epidemiologia.....	24
1.5 <i>Listeria monocytogenes</i>	24
1.5.1 Listeriose Humana	25
1.5.2 Epidemiologia.....	28
1.6 JUSTIFICATIVA	30
2 OBJETIVOS	31
2.1 OBJETIVO GERAL	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 AMOSTRAGEM	32
3.2 PREPARO DA AMOSTRA	32
3.3 PESQUISA DE <i>Listeria monocytogenes</i>	33
3.3.1 Pré-enriquecimento	33
3.3.2 Plaqueamento seletivo	33
3.3.3 Ensaio presuntivos	34
3.3.3.1 Prova da catalase.....	34
3.3.3.2 Características morfotintórias.....	34
3.3.4 Ensaio Confirmatórios para Identificação de <i>L. monocytogenes</i>	35
3.3.4.1 Utilização de carboidratos	35
3.3.4.2 Prova da mobilidade.....	35
3.3.4.3 Atividade hemolítica	36
3.3.5 Identificação sorológica	36
3.3.6 Tipagem molecular.....	36
3.3.6.1 Extração de DNA.....	37
3.3.6.2 Multiplex-PCR	37
3.4 PESQUISA DE <i>Salmonella</i> spp.....	39

3.4.1 Pré- enriquecimento	39
3.4.2 Enriquecimento seletivo	39
3.4.3 Plaqueamento seletivo	39
3.4.4 Triagem bioquímica das colônias suspeitas	40
3.4.5 Sorologia polivalente	40
3.4.6 Identificação sorológica	41
3.5 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	41
3.5.1 <i>Salmonella</i> spp.	41
3.5.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1. Isolamento e identificação	44
4.1.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	45
4.1.2. <i>Salmonella</i> spp.....	49
4.2. Sensibilidade aos Antimicrobianos.....	53
4.2.1. <i>Listeria monocytogenes</i>	53
4.2.2. <i>Salmonella</i> spp.....	57
5 CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

As mudanças no padrão alimentar das duas últimas décadas têm levado a carne de frango a um patamar mais elevado em relação ao consumo. Um dos fatores que contribuiu para este aumento foi a abertura dos mercados, resultante do processo de globalização econômica. Entre os principais países produtores de carne de frango, os Estados Unidos da América (EUA) ocupam a primeira posição com 17.254 toneladas da produção mundial e em seguida estão a China com 13.000 toneladas e o Brasil ocupando a terceira posição, com 12.691 toneladas em 2014. Em conjunto, os três países correspondem a 49,89% da produção mundial de carne de frango (ABPA, 2015, VOILÀ; TRICHES, 2013).

O Brasil conquistou os mercados mais exigentes de carne de frango do mundo. É o líder em exportação, atualmente chegando a 142 países. Em 2010, a previsão de crescimento de produção da carne de frango era alcançar 4,2%, anualmente, nas exportações, com expansão prevista em 5,6% ao ano, mantendo a liderança mundial. A produção brasileira, em 2014, alcançou 12,69 milhões de toneladas, sendo 95% de produtos *in natura* e 5% industrializados. O consumo *per capita* aumentou para 42,78 Kg por habitante, segundo dados da União Brasileira de Avicultura (UBABEF) e do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (ABPA, 2015, BRASIL, 2010).

A cadeia produtiva de frango pode ser dividida em três elos principais: a produção de insumos, onde se encontra a criação de frangos; a industrialização, caracterizada pelos abatedouros (os chamados frigoríficos); e a comercialização/distribuição, constituída pelas empresas que comercializam o produto diretamente com o consumidor. A cadeia produtiva também é alimentada por eixos auxiliares que fornecem a pesquisa e desenvolvimento genético, medicamentos, milho, soja e outros insumos, equipamentos e embalagens (VOILÀ; TRICHES, 2013).

A tecnologia empregada na produção avícola visa otimizar a produção, atingindo melhores resultados econômicos e produzindo alimentos seguros e saudáveis para o consumidor. A criação em escala industrial costuma ter um elevado número de frangos que somada às condições higiênicas do ambiente

podem resultar em um grande número de doenças. Frente a isto, antimicrobianos são utilizados para o controle de enfermidades, como terapêutica, e também como aditivos na ração e água dos frangos (SCHMITZ, 2006).

1.1 ANTIBIÓTICOS NA AVICULTURA

Os antibióticos possuem importante papel na indústria, sendo utilizados de forma terapêutica para o tratamento de doenças infecciosas, e para estímulo do crescimento e melhoramento de desempenho alimentar dos animais criados. A avicultura é um dos setores que mais utiliza esta ferramenta em sua criação devido a alta densidade de produção e as condições higiênicas das granjas, que podem proporcionar a disseminação de patógenos, gerando quadros infecciosos nos animais, o que afetaria a produtividade (DALKE, 2006, SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006).

O uso de antibióticos na dieta animal objetiva tratar animais doentes, prevenir doença em animais susceptíveis à infecção e promover o crescimento quando administrados em baixas doses. O uso como promotores de crescimento é uma tecnologia amplamente utilizada em criações de frangos de corte e apresenta grandes benefícios na produção, principalmente por melhorar o ganho de peso e conversão alimentar além de reduzir a mortalidade (SANTOS et al, 2005).

A utilização como promotores de crescimento se iniciou em 1950, como uma alternativa à adição de substâncias hormonais na alimentação animal, prática esta, que se tornou proibida pela Instrução Normativa nº 17, de 18 de junho de 2004, que proíbe a administração, por qualquer meio, na alimentação e produção de aves, de substâncias com efeitos tireostáticos, androgênicos, estrogênicos ou gestagênicos, bem como de substâncias β -agonistas, com a finalidade de estimular o crescimento e a eficiência alimentar (BRASIL, 2004). Diferentes autores possuem opiniões divergentes quanto ao aumento do desempenho alimentar e ganho de peso de pintos alimentados com rações adicionadas de antibióticos. Alguns autores relataram aumento do desempenho durante os primeiros 21 dias de crescimento (LODDI et al, 2000, ZUANON; FONSECA; ROSTAGNO, 1998), enquanto outros dizem não haver diferenças significativas entre o uso ou não de antibióticos

adicionados à ração (CORRÊA et al, 2003, SANTOS et al, 2005). Ainda assim, esta é uma opção muito utilizada na avicultura contemporânea.

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) autoriza o uso de alguns tipos de aditivos antimicrobianos, anticoccidianos e agonistas na alimentação animal. A relação de antimicrobianos autorizados para uso exclusivo em rações para avicultura encontra-se no quadro 1. Dentre as principais classes de antibióticos utilizados na avicultura, encontram-se os aminoglicosídeos, macrolídeos, lincosamidas, pleuromutilinas, inibidores de folato, polimixina B, quinolonas e fluoroquinolonas. A escolha do antibiótico adequado ao tratamento é fundamentada no conhecimento de suas propriedades que devem se aproximar de um antimicrobiano ideal, que são: capacidade de eliminação (bactericida), inibição do crescimento bacteriano (bacteriostático), possuir amplo espectro de ação, ter alto índice terapêutico, exercer atividade em presença de fluidos orgânicos (exsudato, pus, etc.), não ser agressivo ao organismo animal (atrapalhar o sistema imune e produzir reações de sensibilização), fácil distribuição por tecidos e líquidos do organismo em concentrações adequadas, administração por diferentes vias (oral, parenteral e local) preço acessível e baixo desenvolvimento de resistência (MAPA, 2008, SANTANA et al, 2011).

Quadro1. Substâncias antimicrobianas autorizadas para uso veterinário como aditivos em rações de frangos de corte.

Substâncias antimicrobianas
Avilamicina
Bacitracina Metileno Disalicilato
Bacitracina de Zinco
Colistina
Clorexidina
Enramicina
Espiramicina
Flavomicina
Halquinol
Lincomisina
Tilosina
Virginamicina

Fonte: MAPA, 2008.

O uso indiscriminado destes agentes antimicrobianos, contudo, pode diminuir a inocuidade do alimento por gerar o risco de contaminação biológica, pelo desenvolvimento e disseminação de cepas bacterianas resistentes à ação dos antibióticos. No Brasil, o MAPA recomendou que o uso de antimicrobianos destinados à terapêutica deveria ser evitado como aditivos alimentares, promotores de crescimento ou conservantes de alimentos para animais. Através da Instrução Normativa nº 26, de 09 de julho de 2009 (que revogou a Portaria nº 193/1998), proibiu o uso de anfenicóis, tetraciclínas, beta-lactâmicos (benzilpenicilâmicos e cefalosporinas), quinolonas e sulfonamidas sistêmicas como aditivos, sendo permitidos somente para fins terapêuticos (BRASIL, 2009).

Existem barreiras não-tarifárias de restrição ao consumo de carne de aves alimentadas com rações contendo antimicrobianos, principalmente em países europeus, tornando-se também um problema econômico para os países exportadores que utilizam desta tecnologia. A União Europeia (EU) banuiu o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento em 2006, desde então utilizou de forte fiscalização e proibição da entrada de carne contendo resíduos de antimicrobianos, isto porque o uso de antimicrobianos na alimentação animal contribui para o desenvolvimento e disseminação de cepas resistentes à ação antimicrobiana. A criação de barreiras sanitárias é realizada com o intuito de garantir e preservar a saúde humana e animal dos possíveis riscos gerados pelos produtos contaminados (CONSOLE, 2006, CORRÊA et al, 2003).

1.2 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

A emergência de cepas resistentes à ação de antimicrobianos se tornou um complexo desafio no atual panorama da saúde pública mundial. Na chamada era pós-antibióticos, altas taxas de resistência têm sido observadas em bactérias associadas a quadros infecciosos comuns, como infecções do trato urinário, pneumonias e pequenas lesões, em todos os continentes, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2014). Alguns micro-organismos podem possuir resistência a um determinado agente antimicrobiano, ou a uma classe de agentes, enquanto outros podem apresentá-la a diversos agentes ou classes, caracterizando-

se como multirresistentes. Em alguns casos não existem antibióticos disponíveis eficazes contra a infecção por alguns destes patógenos, o que pode resultar em surtos de bactérias multirresistentes (CDC, 2014).

A resistência microbiana pode ser definida como a capacidade de um micro-organismo sobreviver, e muitas vezes multiplicar-se, na presença de determinados agentes antimicrobianos. Os genes de resistência podem se localizar no DNA genômico ou em plasmídeos extracromossomiais. A resistência pode ocorrer por mutações no material genético de uma bactéria, gerada por diferentes fatores, externos ou internos, que por fim se propagam pelos clones sucedentes desta, ou pela aquisição de DNA exógeno, de outras bactérias. Pode ocorrer também por conjugação, onde há a transferência de plasmídeos inteiros ou transposons (sequências genéticas móveis capazes mudar sua posição pelo cromossomo, podendo carrear segmentos de plasmídeos, ou fragmentos do próprio cromossomo). Outros métodos de obtenção de material genético externo são a transdução, onde ocorre a transferência de material genético pela ação de bacteriófagos, e a transformação, baseada na aquisição de fragmentos genômicos disponíveis no ambiente externo após a lise bacteriana (BRASIL, 2008, KONEMAN, 2008).

A resistência pode ser expressa de forma contínua ou induzida a partir de estímulos bioquímicos. Os mecanismos são variados e se apresentam de maneira individual ou em conjunto, como múltipla resistência em um único micro-organismo. Dentre os mecanismos já descritos encontram-se: a inativação dos agentes antimicrobianos por ação de enzimas secretadas no ambiente extracelular ou ligadas à parede celular (muito encontrados em bactérias Gram-negativas); alterações dos receptores dos antibióticos, reduzindo a afinidade de interação com as proteínas de ligação; alteração da permeabilidade por mudanças nas proteínas transmembranares de transporte (porinas), por força motriz da proteína reduzida ou transporte ativo por “bombas” de efluxo; e o desvio do bloqueio metabólico, pela obtenção de metabólitos pré-formados (KONEMAN, 2008).

Os alimentos se tornaram importantes veículos de disseminação de resistência microbiana, seja pelo acúmulo de resíduos destas substâncias ou pela transferência de genes na microbiota presente. O uso abusivo de antibióticos durante a criação de frangos gera o risco de desenvolvimento e disseminação de cepas bacterianas resistentes, tornando-os alvo de grande preocupação na área da saúde. Algumas bactérias dos gêneros *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* estão

entre os patógenos humanos de destaque por causarem quadros graves de doenças transmitidas por alimentos (DTA), o que somado à possibilidade de surgimento de cepas resistentes se tornam alvos importantes na avaliação da inocuidade de produtos alimentícios (AKBAR; ANAL, 2013).

Durante seu estudo, Álvarez-Fernandez e colaboradores (2012) avaliaram a sensibilidade a alguns antimicrobianos, dos sorovares de *Salmonella* spp., encontrados em carne de frango, no nordeste da Espanha. Foi observada a predominância de resistência aos antibióticos rifampicina, eritromicina e ácido nalidíxico. A multirresistência aos antimicrobianos foi relatada em 40 de 73 cepas das amostras de 1993 e 19 de 153 cepas das amostras de 2006.

No Brasil, Costa e colaboradores (2013) investigaram a resistência de 1.234 cepas de *Salmonella* spp. frente a classes de antibióticos beta-lactâmicos (ampicilina, cefalotina, cefoxitina, ceftriaxona, ceftiofur, ceftiazidima e imipenem), fenicóis (cloranfenicol), tetraciclina (tetraciclina), quinolonas (ácido nalidíxico e ciprofloxacina), aminoglicosídeos (gentamicina), inibidores de folato (trimetoprim-sulfametoxazola) e nitrofuranos (nitrofurantioína). Dos achados, 32% foram sensíveis à ação dos antibióticos, 13,5% foram considerados intermediários e 54,5% constataram resistência a pelo menos um agente antimicrobiano.

Em um estudo, na Malásia, sobre a caracterização genotípica e avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos de cepas de *L. monocytogenes* isoladas de alimentos prontos para o consumo, incluindo frango cozido e produtos de frango, foi avaliada a resistência de 32 cepas a tetraciclina, fluoroquinolonas, cefalosporinas e fosfomicinas, onde 53,1% foram resistentes a penicilina G, 15,6% à tetraciclina, 12,5% à amoxicilina + ácido clavulânico, 9,4% à vancomicina, 6,3% à eritromicina e 3,1% à clindamicina, estreptomicina, canamicina e cloranfenicol (JAMALI; THONG, 2014).

Outro estudo de isolamento de *Listeria* spp. em carnes prontas para o consumo, na Espanha, constatou a presença de 206 cepas de *L. monocytogenes*, que foram submetidas ao teste de sensibilidade a 20 antimicrobianos. Destes isolados, 71 apresentaram resistência a um ou dois antimicrobianos testados e somente, 2,9% apresentaram multirresistência, ou seja, resistência acima de três antibióticos em conjunto. A resistência a oxacilina foi a mais registrada, no estudo (GÓMEZ et al, 2014).

O monitoramento da resistência aos antimicrobianos é essencial para mensurar a magnitude e tendências deste problema, visando o planejamento de intervenções capazes de atenuá-lo. O Brasil, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), implantou de 2006 a 2008, o Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF), a partir de amostras de carcaças de frango congeladas coletadas no comércio. Em 2005, a comissão do *Codex Alimentarius* elaborou um “Código de Práticas para Minimizar e Conter a Resistência Antimicrobiana”, encorajando os países membros a implantarem programas de vigilância frente ao problema da resistência aos antimicrobianos (BRASIL, 2008). Cabe à vigilância sanitária, com o auxílio dos laboratórios de análises para o suporte técnico-científico, utilizar de ações de manutenção da qualidade destes produtos e preservação da segurança alimentar dos consumidores.

Nos EUA existe o *National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria* (NARMS), criado em 1996 como um programa de colaboração entre o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), o *Food and Drug Administration* (FDA) e o *United State Department of Agriculture* (USDA) para o monitoramento da resistência aos antimicrobianos de bactérias entéricas isoladas de humanos e alimentos. Fornecendo apoio à saúde pública por gerar informações relevantes sobre surgimento de resistência bacteriana, as formas de disseminação de resistência e como as infecções por micro-organismos resistentes diferem de infecções por micro-organismos susceptíveis (CDC, 2015a).

Também nos EUA existe o *Clinical laboratory Satandards Institute* (CLSI), responsável pelo estabelecimento da padronização de metodologias clínicas e laboratoriais para a pesquisa de susceptibilidade aos antimicrobianos, auxiliando a pesquisa e o monitoramento, não somente em nível nacional como também global (CLSI, 2015).

O monitoramento da resistência a antimicrobianos na Europa, é de responsabilidade do *European Food Safety Authority* (EFSA), que providencia apoio científico e aconselhamento aos gestores sobre os riscos à saúde humana e animal, relacionado com a possível emergência, difusão e transferência de resistência antimicrobiana na cadeia produtiva e em populações animais (EFSA, 2015).

A Europa também utiliza os padrões do CLSI disponíveis, para os estudos relacionados à resistência a antimicrobianos, porém, também possui o *European*

Comitte on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Diferentes países europeus possuíam seus próprios padrões nos métodos de disco-difusão e Concentração Mínima Inibitória (CIM) para pesquisa de resistência, incluindo o *British Society for Antimicrobial Chemotherapy* (BSAC/Reino Unido), o *Comité Antibiogramme – Société Française de Microbiologie* (CA-SFM/França), *Germany Institute for Standardization* (DIN-Alemanha) e o *Swedish Reference Group for Antibiotics* (SRGA-Suécia), entre outros. O EUCAST foi formado em 1997, pela necessidade de haver uma padronização na metodologia de análise de resistência no continente europeu. Hoje, muitos países europeus adotam os padrões estabelecidos por este comitê, que anualmente disponibiliza seus *breakpoints* em documentos atualizados (EUCAST, 2013, MATUSCHEK; BROWN; KAHLMETER, 2014).

1.3 VIGILÂNCIA SANITÁRIA

A comercialização de alimentos necessita de adequada fiscalização e inspeção por parte de órgãos competentes para garantir o acesso do consumidor a um alimento seguro. Segundo a Lei Orgânica de Segurança Alimentar e Nutricional (Lei nº 11.346, de 15 de setembro de 2006), entende-se por segurança alimentar e nutricional:

A realização do direito de todos ao acesso regular e permanente a alimentos de qualidade, em quantidade suficiente, sem comprometer o acesso a outras necessidades essenciais, tendo como base práticas alimentares promotoras de saúde que respeitem a diversidade cultural e que sejam ambiental, cultural, econômica e socialmente sustentáveis (BRASIL, 2006).

Um alimento seguro é livre de contaminação física, química ou biológica que possa pôr em risco a saúde do consumidor. A colonização microbiológica da carne de frango é um importante fator de risco a ser considerado quando se trata de sua qualidade. Existem diferentes fontes e rotas de contaminação, sejam elas intrínsecas ao organismo animal, devido à microbiota anfibiônica de seus tecidos como a pele e o trato gastrointestinal; ou associadas ao processo produtivo como falhas na manipulação, por contaminação cruzada de utensílios e equipamentos

indevidamente higienizados e armazenamento indevido. As consequências geradas pela contaminação microbiana podem variar desde a deterioração da carne, alterando suas características sensoriais e diminuindo a vida de prateleira, até a ocorrência de DTA nos consumidores (JAY, 2005a).

Patógenos humanos, sobreviventes às etapas de processamento dos alimentos, podem originar quadros infecciosos a partir da ingestão de alimentos contaminados. Os micro-organismos mais prevalentes e considerados de grande importância, encontrados em carnes e derivados, são *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157:H7 e outras *E. coli* patogênicas, *L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Clostridium perfringens*. Outros patógenos considerados emergentes, ou seja, previamente descritos, porém, recentemente relacionados à ingestão de alimentos contaminados, têm recebido grande destaque. Entre eles encontram-se *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* Typhimurium DT104, *Arcobacter butzleri*, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, *Aeromonas hydrophila* e príons (MOR-MUR; YUSTE, 2010).

A vigilância sanitária, por sua vez, possui um importante papel em ações capazes de minimizar, eliminar ou prevenir os riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse à saúde. Portanto, está incluído o controle de bens de consumo, em todas as etapas e processos (BRASIL, 1990).

A Anvisa estabeleceu os padrões microbiológicos para alimentos, incluindo carnes de aves resfriadas ou congeladas, “*in natura*” (carcaças inteiras, fracionadas ou cortes) pela Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, indicando a tolerância de 10^4 unidades formadoras de colônia (UFC) para coliformes a 45°C, por grama de amostra (BRASIL, 2001a). Já a Resolução RDC nº 13, de 2 de janeiro de 2001, informa que a carne de aves e seus miúdos crus, resfriados ou congelados apresentam níveis críticos de *Salmonella* spp. e não existem medidas efetivas de controle que possam eliminá-la, visto que o processo tecnológico utilizado pelas indústrias produtoras ainda não assegura a eliminação completa do micro-organismo. Portanto foi estipulada a inclusão, na rotulagem destes produtos, das instruções de uso, preparo e conservação para auxílio do consumidor para o controle do risco associado ao seu consumo (BRASIL, 2001b).

Não existem critérios na legislação brasileira para pesquisa de outros micro-organismos que podem ser encontrados em carne de frango. O risco de

contaminação não pode ser negligenciado devido aos fatores de influência da cadeia produtiva, capazes de tornar este alimento um veículo de transmissão pelo aumento de sua carga microbiana e pela possibilidade de colonização de patógenos humanos como *Salmonella* spp., *L. monocytogenes* e *E. coli* O157:H7 (JAY, 2005a). Apesar desse tipo de alimento ser consumido após o cozimento, o que deve eliminar a presença desses patógenos, existe o risco da ocorrência de contaminação cruzada durante o preparo, comprometendo alimentos prontos para o consumo.

1.4 *Salmonella* spp.

As bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família Enterobacteriaceae. São bastonetes Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não esporulados e em sua maioria móveis, por flagelos peritríquios. O gênero é quimio-organotrófico, metabolizando nutrientes por ambos os caminhos de fermentação e oxidação, e cataboliza D-glicose e outros carboidratos produzindo ácido e gás, porém não fermentam lactose e sacarose. Possuem crescimento ótimo em temperaturas aproximadas a 37°C, e são capazes de crescer em meio citrato como única fonte de carbono, geralmente produzindo sulfeto de hidrogênio. São oxidase negativa, catalase positiva e não produzem a enzima urease (D'AOUST; MAURER, 2007).

O gênero *Salmonella* possui apenas duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A *Salmonella enterica* possui seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* e possuem 2.610 sorovares distribuídos entre as subespécies de *S. enterica* e *S. bongori*, sendo que a subespécie *enterica* concentra 1.547 sorovares (GUIBOURDENCHE et al, 2010, LPSN, 2016a).

A identificação dos sorovares de *Salmonella* é realizada através de testes sorológicos de aglutinação de anticorpos *Salmonella*-específicos com antígenos de superfície, que incluem o somático O (termoestável), lipopolissacarídeos (LPS), presentes na superfície da membrana externa da bactéria; flagelina H (termolábel), associada com os flagelos peritríquios; e o antígeno capsular (Vi), que ocorre somente nos sorovares Typhi, Paratyphi C e Dublin. Além disso, podem ser

classificados em sorogrupos, de acordo com os fatores somáticos (D'AOUST; MAURER, 2007).

As salmonelas possuem ampla distribuição na natureza, podendo ser encontradas na água e no solo, porém, seu habitat primário é o trato gastrointestinal de animais e em algumas vezes do homem, o que pode ocasionar contaminação de alimentos. Em sua epidemiologia, podem ser distribuídas em três grupos: as que infectam somente seres-humanos como *S. Typhi*, *S. Paratyphi A*, *S. Paratyphi C*; sorovares adaptados ao hospedeiro, podendo alguns serem patógenos humanos como *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* (frango), *S. Dublin* (bovinos), *S. Abortus-equi* (Equinos), *S. Abortus-ovis* (ovinos) e *S. Choleraesuis* (suínos); e sorovares não-adaptados, sem preferência por hospedeiro (JAY, 2005b).

Os sorovares de *Salmonella*, mais especificamente da subespécie *enterica*, estão entre os mais importantes patógenos alimentares conhecidos, conduzindo a milhões de casos de doenças entéricas no mundo. Dentre os dez sorotipos mais comuns a causarem infecções em humanos, oito também se incluem entre os normalmente identificados em pelo menos uma fonte de alimento de origem animal (HUR; JAWALE; LEE, 2012).

Um dos mais importantes sorovares de *Salmonella* é o Enteritidis, considerada uma importante causa de doenças humanas com sintomas de febre, vômito, diarreia e dores abdominais. Os grupos de risco a estas infecções incluem, gestantes (abaixo de 3 meses), idosos e imunocomprometidos (MEZAL et al, 2014)

1.4.1 Salmonelose

Existem três quadros de infecção humana causados por *Salmonella* spp.: a febre tifoide, causada por *S. Typhi* – patógeno exclusivo de seres humanos, não possuindo reservatórios animais. Essa infecção possui sintomas graves que incluem septicemia, febre alta, diarreia e vômitos, com chances de cronificação, tornando o hospedeiro um portador crônico e disseminador da bactéria. A febre entérica, causada por *S. Paratyphi* (A, B e C) – possui sintomas clínicos mais brandos em relação à febre tifoide, podendo evoluir para septicemia e frequentemente gastroenterite, febre e vômitos. As infecções entéricas, decorrentes de outras

salmonelas – as chamadas salmoneloses desenvolvem quadros de infecção gastrointestinal, tendo como sintomas dores abdominais, diarreia, febre baixa e vômitos. A salmonelose é uma gastroenterite que pode evoluir para quadros de infecções sistêmicas, em indivíduos imunocomprometidos (SHINOHARA et al, 2008).

As salmoneloses são antropozoonoses, isto é, possuem reservatórios animais (selvagens ou domésticos) em seu ciclo de transmissão. O contágio aos seres-humanos ocorre principalmente pela ingestão de alimentos ou água, contaminados direta ou indiretamente por fezes contendo esta bactéria. Pode ocorrer também a transmissão entre humanos (cerca de 10%) em crianças menores de um ano e idosos, causada por portadores assintomáticos (TERRIER; MARTINEZ, 2006).

A patogenicidade das salmonelas varia de acordo com seu tipo sorológico, a idade e as condições de saúde do hospedeiro. Normalmente nas salmoneloses, as bactérias ingeridas atravessam o estômago e conseguem se multiplicar e aderir às células epiteliais da região ileocecal. Posteriormente, interiorizam as células da mucosa, danificando-as e migrando para a lâmina própria, induzindo uma resposta inflamatória do hospedeiro com hipertrofia e hiperplasia dos folículos linfoides, pela produção de prostaglandinas, que estimulam a adenosina monofosfato cíclico (AMPc), produzindo secreção ativa de fluidos, resultando em diarreia. Porém há a chance de ocorrerem manifestações sistêmicas, onde a bactéria alcança os linfonodos mesentéricos, conseguindo em seguida se disseminar para outros tecidos como fígado e baço, continuando sua multiplicação e atingindo a corrente sanguínea (CARDOSO; CARVALHO, 2006).

Na maioria dos casos de salmonelose, a infecção é auto-limitante. Contudo, cerca de 8% de pacientes desenvolvem o quadro de bacteremia, e destes, 5-10% desenvolvem infecções localizadas. A bacteremia por salmonelas não-tifóides é normalmente secundária à gastroenterite em crianças, mas é presente como manifestação primária em adultos imunocomprometidos (HUANG et al, 2012).

O potencial infectivo das salmonelas depende de seus fatores de virulência, essenciais à patogenicidade. Dentre estes fatores podemos citar as fímbrias, que possuem papel de adesão a superfícies, persistência ambiental, formação de biofilmes e são capazes de mediar a fixação à célula hospedeira. Quatro tipos de fímbrias ou *pilli* têm sido descritos geneticamente: fímbria do tipo I (Fim), codificadas

por plasmídeos; fímbria polar longa; fímbrias agregativas e a fímbria específica de *Salmonella* Enteritidis (DARWIN; MILLER, 1999).

1.4.2 Epidemiologia

Baseado em resultados de levantamentos epidemiológicos realizados em diversos países desenvolvidos e em desenvolvimento, *Salmonella* spp. é considerada a segunda principal causa de doenças de origem alimentar (CAVALCANTI; ARAÚJO; SILVA, 2010).

O CDC, nos EUA, costuma notificar casos de doenças transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* spp., anualmente. No período de junho de 2012 a abril de 2013, foram notificados 134 casos de infecções por *Salmonella* Heildeberg em 13 estados americanos, e o consumo de frango foi um fator em comum entre os doentes. Outro surto, onde 158 pessoas adoeceram em 30 estados diferentes, foi notificado pelo CDC e relacionado aos sorovares *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Lille, *Salmonella* Newport e *Salmonella* Mbandaka (CDC, 2013a, 2013b).

Em um estudo sobre a prevalência de *Salmonella* em carne de frango entre os anos de 1993 e 2006, foi constatada diminuição da prevalência de 55%, em 1993, para 12,4% de amostras positivas em 2006. Dados epidemiológicos da União Europeia informam que a incidência de infecções por *Salmonella* spp. em 2009 foi de 23,7 casos por 100.000 pessoas, com um total de 108.614 casos confirmados. Neste mesmo ano foram constatados 1.772 surtos relacionados ao consumo de alimentos contaminados, correspondendo a 31% de todos os surtos de DTA registrados (ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ et al, 2012).

1.5 *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* é composto por cocobacilos Gram-positivos, não esporulados, catalase positiva, e capazes de produzir ácido láctico a partir da glicose e de outros açúcares. Possui 17 espécies: *Listeria denitrificans*, *Listeria*

fleischmannii, *Listeria grayi*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria murrayi*, *Listeria rocourtiae*, *Listeria seeligeri*, *Listeria weihenstephanensis*, *Listeria welshimeri*, *Listeria Ivanovii*, *Listeria aquática*, *Listeria cornellensis*, *Listeria floridensis*, *Listeria grandensis* e *Listeria marthii*. Dentre estas, duas são consideradas patogênicas: *L. monocytogenes* para humanos e *L. ivanovii* para outros mamíferos (JAY, 2005c, LPSN, 2016b, VASCONCELOS, 2008).

A espécie *L. monocytogenes* se encontra amplamente espalhada pelo meio-ambiente, em vegetais em decomposição, solo, ambientes úmidos e também em fezes de animais. É o agente etiológico da listeriose humana, doença que pode ser manifestada de diversas maneiras dependendo do estado imunológico do hospedeiro. Porém, as maiores causas de listeriose ainda são por contaminação de alimentos (TODD; NOTERMANS, 2011, VASCONCELOS, 2008).

A espécie possui 13 sorovares identificados que podem causar doenças: 1/2a; 1/2b; 1/2c; 3a; 3b; 3c; 4a; 4b; 4c; 4d; 4e; 4ab e 7, classificados em três diferentes linhagens: I (1/2a; 3a; 1/2c; 3c); II (1/2b; 3b; 7; 4b; 4d; 4e); III (4a, 4c). Dentre estes sorovares, três se destacam por maior prevalência em alimentos: 1/2a; 1/2b e 4b, com mais de 90% dos casos de listeriose registrados (DOUMITH et al, 2004).

A maioria dos casos relatados de listeriose se concentra na Europa e EUA. Em países nórdicos, por exemplo, a listeriose obteve incidência de 4 a 8 casos por milhão de habitantes, em 2001. Entretanto, a possibilidade de surtos ocorrerem no Brasil não pode ser descartada (GUDBJORNSDÓTTI et al, 2004, JAY, 2005c).

1.5.1 Listeriose Humana

A bactéria *L. monocytogenes* tem sido isolada em humanos desde o início da década de 1920. Entretanto, não foi considerada importante causa de infecções neonatais até a segunda guerra mundial. A partir da segunda metade do século 20, quadros de imunocomprometimento foram identificados como os principais fatores de risco para listeriose em adultos. O desenvolvimento de altos regimes imunossupressores para transplantes de órgãos ou de medula óssea, e a emergência da epidemia do vírus da imunodeficiência humana (HIV), elevaram o

risco relativo do desenvolvimento de listeriose em 500 vezes, comparados à população geral (LECUIT, 2007).

A listeriose possui uma característica contrária à maioria das demais doenças transmitidas por alimentos. Normalmente, os quadros de DTA apresentam alta incidência contrabalanceada com uma baixa morbidade e mortalidade. Isto se inverte na listeriose, que apesar de mais rara, possui taxa de mortalidade superior a 30% mesmo com tratamento antimicrobiano administrado adequadamente (LECUIT, 2007).

A rota natural de infecção é pelo trato gastrointestinal e por ser uma bactéria intracelular facultativa, pode atravessar a barreira intestinal e se disseminar através dos linfonodos mesentéricos até o baço e o fígado. Caso a infecção não seja controlada neste ponto, pode desenvolver bacteremia (prolongada e assintomática), rompendo outras barreiras como a hematoencefálica e a placenta, causando quadros de encefalite e meningite em pacientes imunocomprometidos, e infecções neonatais e abortos, em pacientes grávidas. Uma rota alternativa de infecção é a das superfícies das mucosas até o sistema nervoso central pela bainha do nervo periférico e terminando no nervo trigêmeo, podendo levar ao desenvolvimento do quadro neurológico da doença em neonatos e adultos imunocomprometidos (DISSO; LECUIT, 2013, PERES, 2007).

A infecção de células do epitélio intestinal ocorre, de um modo geral, por um processo que requer a interação da proteína internalina A (InIA), presente na superfície da célula bacteriana, com a caderina epitelial (E-caderina) expressa na superfície das células epiteliais. Há também a produção da internalina B (InIB), que interage com os receptores de superfície dos fatores de crescimento das células hepáticas, atuando na internalização da bactéria (PAMER, 2004).

Outra proteína importante na patogênese de *L. monocytogenes* é a listeriolisina O (codificada pelo gene *hly*), responsável pelo escape do fagossomo, através da destruição da membrana fagossomal, permitindo a invasão do citoplasma da célula hospedeira. A mobilidade intracelular é ativada pela expressão da proteína de montagem e indução da actina (ActA), responsável por criar polímeros de actina que impulsionarão as bactérias, possibilitando a translocação para as células vizinhas, através do citoplasma. A invasão do citoplasma, contudo, possui desafios nutricionais e uma das formas de ultrapassar esta barreira é a expressão de uma hexose-fosfato translocase (Hpt), que permite a absorção de glicose-6-fosfato

disponível no citoplasma celular (estirpes que não possuem Hpt são menos virulentas) (PAMER, 2004).

Os quadros clínicos descritos para infecções de *L. monocytogenes*, em adultos, estão listados no quadro 2.

Quadro 2 – Manifestações clínicas descritas em infecções em adultos por *L. monocytogenes*

<u>Doença do Sistema Nervoso Central:</u>
Meningite
Meningoencefalite
Abcesso
<u>Infecções Focalizadas:</u>
Celulite
Linfadenite
Hepatite e abcesso hepático
Miocardite
Arterite
Endoftalmite
Colecistite
Peritonite
Abcesso Esplênico
Pneumonia
Artrite
Osteomielite
Pericardite
<u>Sepse</u>
<u>Endocardite</u>
<u>Gastreenterite</u>

Fonte: DOGANAY, 2003

Outra proteína importante na patogênese de *L. monocytogenes* é a listeriolisina O (codificada pelo gene *hly*), responsável pelo escape do fagossomo, através da destruição da membrana fagossomal, permitindo a invasão do citoplasma da célula hospedeira. A mobilidade intracelular é ativada pela expressão da proteína de montagem e indução da actina (ActA), responsável por criar polímeros de actina que impulsionarão as bactérias, possibilitando a translocação para as células vizinhas, através do citoplasma. A invasão do citoplasma, contudo, possui desafios nutricionais e uma das formas de ultrapassar esta barreira é a expressão de uma hexose-fosfato translocase (Hpt), que permite a absorção de glicose-6-fosfato disponível no citoplasma celular (estirpes que não possuem Hpt são menos virulentas) (PAMER, 2004).

Existem outros diferentes fatores de virulência importantes nas etapas da infecção de *L. monocytogenes*. Entre eles encontram-se proteínas de superfície como as autolisinas, responsáveis pela liberação ativa de compostos imunogênicos (por exemplo, a proteína P60, aparentemente envolvida no processo de invasão celular); as desacetilases, capazes de desacetilar a peptidoglicana bacteriana, sendo uma etapa essencial para a resistência contra a imunidade inata do hospedeiro; proteínas ligadoras de fibronectina (FbpA), necessárias para a colonização do intestino e fígado (FbpA interage imobilizando a fibronectina humana, aumentando a aderência bacteriana); domínios Ig-like, que possuem papel essencial na resposta imune em vertebrados, na adesão celular e em muitos outros processos; proteínas transportadoras como a OppA (transporta oligopeptídeos necessários para o crescimento em baixas temperaturas e participa na sobrevivência intracelular em macrófagos) (BIERNE; COSSAT, 2007).

1.5.2 Epidemiologia

Apesar de ser menos documentado como um patógeno causador de DTA, quando comparado a *Campylobacter* e *Salmonella*, o quadro de listeriose tem recebido destaque nos últimos anos. Registros do CDC indicam que cerca de 1.600 pessoas adoecem por ano, nos EUA, e 90% das pessoas infectadas são mulheres grávidas, recém-nascidos, idosos, e indivíduos imunocomprometidos. Atualmente, *L.*

monocytogenes ocupa o terceiro lugar como maior causador de mortes por ingestão de alimentos contaminados (CDC, 2013c, VASCONCELOS, 2008).

Segundo Swaminathan e colaboradores (2007), a emergência da listeriose é resultado de complexas interações entre vários fatores, que incluem: melhoramento, nos últimos 50 anos, da medicina, saúde pública e nutrição, que resultam no aumento da expectativa de vida; a grande expansão do imunocomprometimento devido ao uso de medicamentos imunossupressores para o tratamento de doenças, como em indivíduos transplantados; mudanças nas práticas de produção de alimentos, como o aumento do uso de refrigeração como método primário de preservação e mudanças nos hábitos alimentares, incluindo aumento no consumo de alimentos prontos para o consumo que necessitam de pouco cozimento antes da ingestão.

Em um estudo de casos realizado em um hospital no Rio de Janeiro, Martins e colaboradores (2010) registraram seis casos confirmados de pacientes infectados por *L. monocytogenes*, cinco durante a internação e um já na consulta clínica, no período de agosto de 2006 a junho de 2007. Todos os pacientes eram idosos com média de idade de 80 anos e apresentavam quadros de imunocomprometimento. Dentre as infecções registradas, uma foi causada pelo sorotipo 3b e cinco pelo sorotipo 1/2b onde três apresentaram bacteremia.

O risco de resistência aos antimicrobianos também é presente ao se tratar de *Listeria*. Em um estudo em Ankara realizado por Yücel, Citake e Önder (2005) foi registrada a ocorrência de *L. monocytogenes* em 11,5% das amostras de carne de frango analisadas. Do total de 79 cepas de *Listeria* spp. encontradas no estudo, foi confirmada a resistência a um ou mais agentes antimicrobianos testados (ampicilina, cloranfenicol, cefalotina, ciprofloxacina, canamicina, trimetoprim-sulfametoxazol, ácido nalidíxico, tetraciclina e tobramicina) em cepas de *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri* e *L. murrayi*.

1.6 JUSTIFICATIVA

A resistência aos antimicrobianos tornou-se um tema relevante a ser encarado pelos órgãos de saúde pública mundiais. Estudos apontam que diversos tipos de alimentos são potenciais veículos de transmissão de resistência e possivelmente estão associados a surtos por bactérias resistentes. Dentre os motivos para a ocorrência de bactérias resistentes em alimentos encontra-se a larga utilização de agentes antimicrobianos na criação de animais de produção.

O uso de antibióticos na avicultura ocorre para fins terapêuticos ou por suplementação na alimentação. Diferentes pesquisadores relataram a presença de bactérias resistentes em amostras de carne de frango comercializadas e as bactérias *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* são exemplos de patógenos que já apresentaram resistência a um ou mais agentes antimicrobianos, apresentando elevada prevalência nestes produtos. De acordo com o CDC, *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* estão entre as três primeiras posições no *ranking* de classificação de agentes causadores de morte por contaminação, nos EUA, e seus quadros infecciosos se agravam em pessoas com imunodeficiência, idosos, gestantes e recém-nascidos.

A vigilância sanitária em alimentos é importante no que diz respeito à qualidade e segurança alimentar dos produtos e para a redução de riscos à saúde do consumidor. Baseado nas disposições do artigo sexto da Lei 8080/1990, estão incluídas no campo de atuação do Sistema Único de Saúde (SUS) as ações de vigilância sanitária e a fiscalização de alimentos, águas e bebidas para o consumo humano, segundo os itens I e VIII do presente artigo, respectivamente (BRASIL, 1990).

No Brasil, a Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001, não estipula critérios para estas duas bactérias. Levando em conta os vários estudos apontando a prevalência dessas bactérias em carne de frango e o perigo da presença de bactérias resistentes aos antimicrobianos, o estudo voltado para a pesquisa de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em carne de frango no município do Rio de Janeiro e a caracterização do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, poderá gerar dados importantes para Vigilância Sanitária e para outros estudos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Pesquisar a ocorrência e o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em amostras de cortes de frango de diferentes marcas comercializadas na cidade do Rio de Janeiro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Pesquisar e realizar o isolamento de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* a partir de cortes de frango vendidos no varejo;
Determinar a presença dos diferentes sorotipos de *Listeria monocytogenes* através da sorologia e tipagem molecular pela técnica da Multiplex-PCR;
- ✓ Realizar a sorologia polivalente para confirmação da presença de *Salmonella* spp. e identificar os sorovares presentes;
- ✓ Determinar o perfil de susceptibilidade destes micro-organismos aos antimicrobianos clinicamente relevantes para o tratamento de infecções por eles causadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAGEM

No período de fevereiro a maio de 2014, foram adquiridas 40 amostras de cortes de frango (35 congeladas e 5 resfriadas), de 24 diferentes marcas, comercializadas em embalagens contendo 1,0 Kg dos tipos: coxa, sobrecoxa, coxinhas das asas, peito e frango à passarinho (que consiste em vários cortes pequenos de frango, geralmente da asa, cortada em três partes), de forma individual ou em combinação, comercializadas em supermercados do município do Rio de Janeiro. As amostras foram transportadas em bolsas plásticas ao Setor de Alimentos do Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, onde foram imediatamente analisadas ou, no caso da impossibilidade de análise imediata, armazenadas sob refrigeração entre 2 a 8 °C por, no máximo, 24 horas.

3.2 PREPARO DA AMOSTRA

Na etapa inicial da análise foi utilizada a técnica da enxaguadura, segundo o *Microbiology Laboratory Guidebook - USDA/ FSIS*, que consiste na remoção física dos micro-organismos presentes na superfície das amostras. Para cada 500 g da amostra, foram adicionados 100 mL de Água Peptonada Tamponada (APT) 1% (Difco). O caldo da enxaguadura obtido foi utilizado para a realização das técnicas de pesquisa de *L. monocytogenes* e de *Salmonella* spp.

3.3 PESQUISA DE *Listeria monocytogenes*

A pesquisa foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Hitchins e Jinneman (2011), descrito no *Bacteriological Analytical Manual* (BAM/FDA).

3.3.1 Pré-enriquecimento

Uma alíquota de 25 mL do caldo da enxaguadura foi transferida para um recipiente estéril contendo 225 mL de Caldo Tampão para Enriquecimento de *Listeria* (BLEB) (Oxoid) e então incubado a 30°C. Após quatro horas de incubação, foram adicionados os suplementos seletivos acriflavina, cicloheximida e ácido nalidíxico e reincubado por mais 44 horas a 30°C.

3.3.2 Plaqueamento seletivo

Após 48 horas de incubação do meio BLEB, uma alíquota foi semeada pela técnica de esgotamento em ágar cromogênico para *Listeria* (Oxoid) e a placa incubada a 35 °C por 48 horas. Este meio é utilizado para a diferenciação das espécies *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* de outras espécies, a partir da observação da coloração esverdeada das colônias e formação de um halo opaco, característico do crescimento. Para os controles positivo e negativo, foram utilizadas as cepas de referência *L. monocytogenes* INCQS 266 (ATCC 7644) e *Enterococcus faecalis* INCQS 017 (ATCC 4083), respectivamente.

Foi realizada a transferência de três a cinco colônias suspeitas para placas de Petri contendo ágar tripticaseína de soja contendo 0,6% de extrato de levedura (TSAYE) (Difco) pela técnica de esgotamento, para a observação da pureza. As placas foram incubadas a 30 °C por 24 horas e após o crescimento, as colônias suspeitas foram transferidas para tubos contendo caldo tripticaseína de soja

contendo 0,6% de extrato de levedura (TSBYE) (Difco) e incubadas a 30 °C por 24 horas. Após incubação, foram realizados os ensaios presuntivos.

3.3.3 Ensaio presuntivos

3.3.3.1 Prova da catalase

Este ensaio visa verificar se o micro-organismo produz a enzima catalase através da produção de bolhas de gás ao reagir com peróxido de hidrogênio a 3%. *L. monocytogenes* produz esta enzima, portanto apresenta resultado positivo.

Uma porção do crescimento da cultura de 24 horas em TSAYE foi transferida para a superfície de uma placa de Petri estéril onde foi adicionada uma gota de peróxido de hidrogênio a 3%. Foram utilizados como controles positivo e negativo as cepas de *L. monocytogenes* INCQS 266 (ATCC 7644) e *E. faecalis* INCQS 017 (ATCC 4083), respectivamente.

3.3.3.2 Características morfotintoriais

Foi realizado o método de coloração de Gram, a partir dos cultivos de 24 horas em TSAYE, para confirmação das características morfotintoriais das culturas que apresentaram resultado positivo no teste da catalase.

3.3.4 Ensaios Confirmatórios para Identificação de *L. monocytogenes*

3.3.4.1 Utilização de carboidratos

Foi transferida uma alçada de cada cultura de 24 horas suspeita de *L. monocytogenes* em TSBYE para tubos contendo caldo púrpura de bromocresol adicionados dos carboidratos glicose, esculina, maltose, ramnose, manitol e xilose, em concentração de 5% cada um. Os tubos foram incubados a 35 °C por 7 dias. *L. monocytogenes* possui o perfil positivo para glicose, esculina, maltose e ramnose e negativo para manitol e xilose. Foram utilizadas como controle as cepas de referência *L. monocytogenes* INCQS 266 (ATCC 7644), *L. ivanovii* INCQS 355 (ATCC 19119) e *L. innocua* INCQS 354 (ATCC 33090).

3.3.4.2 Prova da mobilidade

Simultaneamente ao teste dos carboidratos, as culturas suspeitas em TSBYE, foram semeadas em tubos contendo o meio para mobilidade (SIM) (Merck) com o auxílio de uma agulha bacteriológica. Os tubos foram incubados a 25 °C por 7 dias. A semeadura não deve ultrapassar 1 cm de profundidade da superfície do meio.

Foram utilizadas como controle as cepas de referência *L. monocytogenes* INCQS 266 (ATCC 7644) e *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae* INCQS 147 (ATCC 13883). *L. monocytogenes* cresce em forma de “guarda-chuva” na superfície do meio enquanto *K. pneumoniae* se apresenta imóvel, com crescimento apenas no local da semeadura.

3.3.4.3 Atividade hemolítica

Foi semeada uma alçada de cada crescimento de 24 horas de TSAYE, das culturas que apresentaram resultado positivo nas etapas anteriores, em placas de Petri contendo ágar sangue que foram incubadas a 35°C por 48 horas, para a comprovação da atividade hemolítica das culturas suspeitas de *L. monocytogenes*, que são alfa-hemolíticas. As cepas de referência *L. monocytogenes* INCQS 266 (ATCC 7644), *L. ivanovii* INCQS 355 (ATCC 19119) e *L. innocua* INCQS 354 (ATCC 33090) foram utilizadas como controle.

3.3.5 Identificação sorológica

Foi realizada a seleção das amostras que se apresentaram suspeitas de serem *L. monocytogenes*, após as provas fenotípicas, para envio ao Laboratório de Zoonoses Bacterianas, do Instituto Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ para realização da caracterização antigênica pela técnica de soro aglutinação rápida em lâmina, com antissoros somáticos e flagelares de acordo com o protocolo de Donker-Voet (1959).

3.3.6 Tipagem molecular

As cepas confirmadas como *L. monocytogenes* pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas, foram submetidas à tipagem molecular por Multiplex-PCR segundo Doumith e colaboradores (2004). Foi selecionado um exemplar de cada sorotipo identificado como *L. monocytogenes* em cada amostra de frango.

3.3.6.1 Extração de DNA

A extração do DNA das cepas selecionadas foi realizada utilizando o kit comercial DNeasy® Blood & Tissue Kit (250) (QIAGEN), segundo instruções do fabricante. A partir de cada cultura das cepas selecionadas em TSBYE (24 h/35°C), 1000 µL da suspensão bacteriana foram transferidos para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e então centrifugado a 4842 x g por 10 minutos. Após isto, foi feita a ressuspensão do sedimento em 180 µL de tampão de lise enzimática (formulação sugerida pelo Kit). Os tubos foram incubados a 37°C por 30 minutos e em seguida, foram adicionados 25 µL de proteinase K e 200 µL de tampão AL sem etanol e homogeneizados em aparelho tipo vortex. O manual não recomenda a adição de proteinase K diretamente no tampão AL. Após homogeneização em vortex, os tubos foram incubados a 56°C por 30 minutos, seguidos da adição de 200 µL de etanol (96%-100%) em cada tubo e submetidos à homogeneização, novamente.

A mistura foi transferida (incluindo qualquer precipitado) para os tubos de 2 mL contendo *Dneasy mini spin column* e centrifugados a 5510 x g por 1 minuto. Após o descarte do sobrenadante, as *Dneasy mini spin column* foram transferidas para novos tubos de 2 mL e foram adicionados 500 µL de tampão AW1 e centrifugados a 5510 x g por 1 minuto. Novamente a solução excedente foi descartada e as *Dneasy mini spin column* foram transferidas para novos tubos de 2 mL, onde foram adicionados 500 µL de tampão AW2 e então centrifugados a 16873 x g por 3 minutos, para secar a membrana das colunas.

Após o descarte da solução excedente, as *Dneasy mini spin column* foram transferidas para tubos de microcentrífuga estéreis, de 2 mL, onde foram adicionados 200 µL do Tampão AE diretamente em cada membrana. Os tubos foram deixados em temperatura ambiente por 1 minuto e em seguida centrifugados a 5510 x g por 1 minuto. Esta última etapa foi repetida para melhor resultado da extração.

3.3.6.2 Multiplex-PCR

Foram utilizadas as cepas de referência INCQS n° 00266 (*L. monocytogenes* ATCC 7644) e INCQS n° 00327 (*L. monocytogenes* ATCC 19117), para controle positivo da técnica. Para a reação final, foi utilizada uma solução contendo 100 µL, composto por: 2 U de Platinum® TaqDNA polimerase (Invitrogen); 0,2 mM de deoxinucleotídeos trifosfatados (Invitrogen); 50 mM de Tris-HCl, 10 mM KCl, 50 mM de (NH₄)₂SO₄, 2 mM MgCl₂ pH 8,0 (Invitrogen). A reação foi realizada na cabine *PCR Chambers (Plas Labs intermatic)*.

Os iniciadores utilizados foram os indicados por Doumith e colaboradores (2004) e estão listados no quadro 3. A concentração final de cada iniciador foi de: 1 µM para Imo0737, ORF2819 e ORF2110; 1,5 µM para Imo1118 e 0,2 µM para *prs*. A PCR ocorreu em termociclador *Peltier Thermal Cyclers PTC-200 (MJ Research)* com o seguinte ciclo: 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de 94°C por 0,4 minutos, 53°C por 1,15 minutos e 72°C por 1,15 minutos e um ciclo final de 72°C por 7 minutos. A partir desta reação, alíquotas de 5 µL foram misturadas a 3 µL de tampão TBE e então submetidas a eletroforese em gel de agarose 2,0%, em tampão TBE 0,5X, para a análise dos perfis de DNA. Posteriormente, o gel foi corado em solução de brometo de etídio e a visualização realizada em equipamento de fotodocumentação *Imagemaster VDS (Pharmacia Biotech)*.

Quadro 3 - Sequência de iniciadores utilizados para amplificação, tamanho (pb) e especificidade dos sorovares de *Listeria monocytogenes*

Genes	Sequência de iniciadores (5'-3')	Tamanho (pb)	Especificidade dos Sorovares
Imo0737	For: AGGGCTTCAAGGACTTACCC	691	<i>L. monocytogenes</i> 1/2a, 1/2c, 3a, e 3c
	Rev: ACGATTTCTGCTTGCCATTC		
Imo1118	For: AGGGGTCTTAAATCCTGGAA	906	<i>L. monocytogenes</i> 1/2c e 3c
	Rev: CGGCTTGTTTCGGCATACTTA		
ORF2819	For: AGCAAAATGCCAAAACCTCGT	471	<i>L. monocytogenes</i> 1/2b, 3b, 4b, 4d, e 4e
	Rev: CATCACTAAAGCCTCCCATTG		
ORF2110	For: AGTGGACAATTGATTGGTGAA	597	<i>L. monocytogenes</i> 4b, 4d, 4e
	Rev: CATCCATCCCTTACTTTGGAC		
Prs	For: GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG	370	<i>Listeria</i> spp.
	Rev: CAAAGAAACCTTGGATTGCGG		

Fonte: (DOUMITH et al, 2004)

3.4 PESQUISA DE *Salmonella* spp.

A pesquisa foi realizada de acordo com o protocolo proposto por Andrews, Jacobson e Hammack (2014), no BAM/FDA.

3.4.1 Pré- enriquecimento

Foram transferidos 25 mL do caldo de enxaguadura para um recipiente estéril contendo 225 mL de APT 1%, para proporção final de 1:10 (V/V). O recipiente foi agitado com movimentos circulares para homogeneização do caldo e incubado a 35°C por 24 horas.

3.4.2 Enriquecimento seletivo

Após a incubação do caldo de enriquecimento, foram transferidos 0,1 mL e 1,0 mL para os caldos de enriquecimento seletivo Rappaport-Vassiliadis (Difco) e Tetratonato (Himedia), respectivamente. Ao meio tetratonato foram adicionados 0,1 mL de solução verde brilhante 0,1% e 0,2 mL de solução iodo-iodeto de potássio. Os tubos foram incubados a 42°C por 24 horas.

3.4.3 Plaqueamento seletivo

Para a seleção de colônias suspeitas de *Salmonella* spp. foram utilizados os meios seletivos ágar Xilose, Lisina, Desoxicolato (XLD) (Merck) e o ágar Hektoen (HK) (Difco). Com o uso de alça bacteriológica, uma alíquota de cada caldo de enriquecimento seletivo foi semeada, pela técnica de esgotamento, nos meios XLD e HK e as placas foram incubadas a 35°C por 24 horas. Foram utilizadas as cepas de

referência *Salmonella* Typhimurium INCQS 150 (ATCC 14028) e *E. coli* INCQS 033 (ATCC 25922) para controle de verificação das características típicas de crescimento. As características do crescimento de *Salmonella* spp. em ágar HK se dá pela observação de colônias negras ou verde azuladas com centro negro e em ágar XLD, pela observação de colônias negras ou transparentes, da cor do meio, com centro negro.

3.4.4 Triagem bioquímica das colônias suspeitas

Foram selecionadas três a cinco colônias suspeitas nos meios XLD e HK e semeadas com a utilização de uma agulha bacteriológica, em ágar tríplice açúcar ferro (TSI) (EMD), ágar lisina ferro (LIA) (Difco) e ágar ureia (prova da uréase) (Merck) e incubados a 35°C por 24 horas, para observação do comportamento bioquímico característico em cada meio. Foram utilizadas as cepas de referência *Salmonella* Typhimurium INCQS 150 (ATCC 14028) e *E. coli* INCQS 033 (ATCC 2592). O crescimento característico de *Salmonella* observado no ágar TSI é superfície alcalina (vermelha) e base ácida (amarela) com produção de H₂S; no ágar LIA é superfície alcalina e base alcalina (violeta) com produção de H₂S; e no ágar ureia não é observada alteração de coloração do meio pela ausência da enzima uréase.

3.4.5 Sorologia polivalente

Após a triagem bioquímica, as culturas suspeitas foram semeadas em ágar nutriente e incubadas a 35°C por 24 horas. Após a incubação foi realizada a sorologia polivalente para confirmação de *Salmonella* spp. Foram adicionados aproximadamente 0,5 mL de solução salina a 0,85% no tubo com o crescimento em ágar nutriente que foi homogeneizado em aparelho tipo vortex. Foi colocada uma gota da suspensão obtida na superfície de uma placa de Petri estéril e verificada a presença de auto-aglutinação. Após isto, foi acrescentada uma gota de soro

polivalente para *Salmonella* (FIOCRUZ/IOC/LABENT), para a verificação de aglutinação pela reação antígeno-anticorpo.

3.4.6 Identificação sorológica

A identificação dos sorovares de *Salmonella* foi realizada no Laboratório de Referência Nacional de *Salmonella* do Instituto Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ. A caracterização antigênica foi realizada pela técnica de soro aglutinação rápida em lâmina, com antissoros poli e monovalentes, somáticos e flagelares (FIOCRUZ/IOC/LABENT) segundo as recomendações de Costa e Hofer (1972). A identificação do sorovar específico foi realizada com base no esquema sorológico de Kauffmann-White e representada de acordo com os critérios de Grimont e Weill (2007).

3.5 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

3.5.1 *Salmonella* spp.

A avaliação da suscetibilidade dos isolados de *Salmonella* spp. frente aos antimicrobianos foi realizada pelo teste de disco-difusão em ágar (BAUER et al, 1966) baseada nos critérios do CLSI (2012).

Inicialmente foram preparadas suspensões bacterianas a partir das cepas isoladas, em solução salina 0,85% até atingir turvação equivalente ao grau 0,5 da escala Mc - Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Essas suspensões foram semeadas em ágar Müeller Hinton (Oxoid), com ajuda de *swab*, de maneira confluyente. Após a secagem da superfície das placas, foram adicionados os discos impregnados com os

antibióticos e então as placas foram incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. A cepa controle utilizada nestas análises foi a *E. coli* ATCC 25922.

Os antimicrobianos utilizados nos testes de suscetibilidade de *Salmonella* spp. foram ampicilina (10 µg), amoxicilina + ácido clavulânico (20/10 µg), ceftriaxona (30 µg), aztreonam (30 µg), gentamicina (10 µg), tetraciclina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), ácido nalidíxico (30 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (1,25/23,75 µg) e nitrofurantoína (300 µg) que estão inclusos nos grupos recomendados para testes em membros da família *Enterobacteriaceae*, pelo *Performance Standards of Antimicrobial Susceptibility Testing: twenty-second informational supplement*, do CLSI (CLSI, 2015b).

Os resultados foram avaliados pela observação da formação, ou não, de halos de inibição de crescimento em torno dos discos de antimicrobianos. Para isto, foi utilizado um instrumento de medição, régua ou paquímetro, para a medição dos diâmetros dos halos formados. A partir desta análise os resultados foram comparados em tabelas estipuladas pelo CLSI para a classificação em sensível, intermediário ou resistente (CLSI, 2015b).

3.5.2 *Listeria monocytogenes*

O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *Listeria monocytogenes* foi realizado baseado nas metodologias de microdiluição em caldo, para o cálculo da concentração inibitória mínima (CIM) e disco-difusão em ágar. A análise por microdiluição em caldo foi realizada segundo o manual *Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria* (M45-A2) do CLSI (CLSI, 2010). Já a análise por disco-difusão em ágar foi realizada segundo os critérios estabelecidos pelo EUCAST (EUCAST, 2015).

O cálculo da CIM por microdiluição em caldo recomenda a inoculação das suspensões dos isolados em turvação equivalente ao grau 0,5 da escala Mc Farland. Para isto, foram feitas suspensões bacterianas a partir das cepas isoladas, em solução salina 0,85% até atingir turvação recomendada e posteriormente foram

adicionadas ao Caldo Müller Hinton Cátion Ajustado (CAMHB) com Sangue Lisado de Cavalo (LHB) (2,5% a 5% v/v) na proporção 1:10.

O CAMHB com LHB (2,5% a 5%) foi distribuído em alíquotas de 50 µL nas placas de 96 poços, onde foram realizadas diluições seriadas dos antibióticos utilizados (16, 8, 4, 2, 1, 0,5 e 0,25 µg/mL). Os antibióticos recomendados foram penicilina G e ampicilina.

Alíquotas de 50 µL da suspensão foram transferidas para os poços e as placas foram incubadas a 35 °C por um período de 20 a 24 horas. As leituras dos crescimentos seguiram os critérios interpretativos para sensibilidade estipulados na tabela 11 do manual M45-A2, do CLSI. A cepa de referência utilizada para esta análise foi *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 (CLSI, 2010).

A avaliação da sensibilidade aos antimicrobianos por disco-difusão foi realizada seguindo as recomendações do EUCAST, utilizando o ágar Müller Hinton (Oxoid) suplementado com 5% de sangue desfibrinado de cavalo (estéril) e 20 mg/L de β-NAD, para micro-organismos fastidiosos (MH-F).

Foram usadas suspensões dos isolados equivalentes ao grau 0,5 da escala McFarland e semeadas em MH-F de forma confluenta, com uso de *swabs*. Após a secagem da superfície das placas, foram adicionados os discos impregnados com os antibióticos meropenem (10 µg), eritromicina (15 µg) e trimetoprim-sulfametoxazol (1,25/23,75 µg) e as placas foram incubadas em estufa a 35°C, capaz de gerar 5% CO₂, por 24 horas, para avaliação da formação de halos de inibição de crescimento.

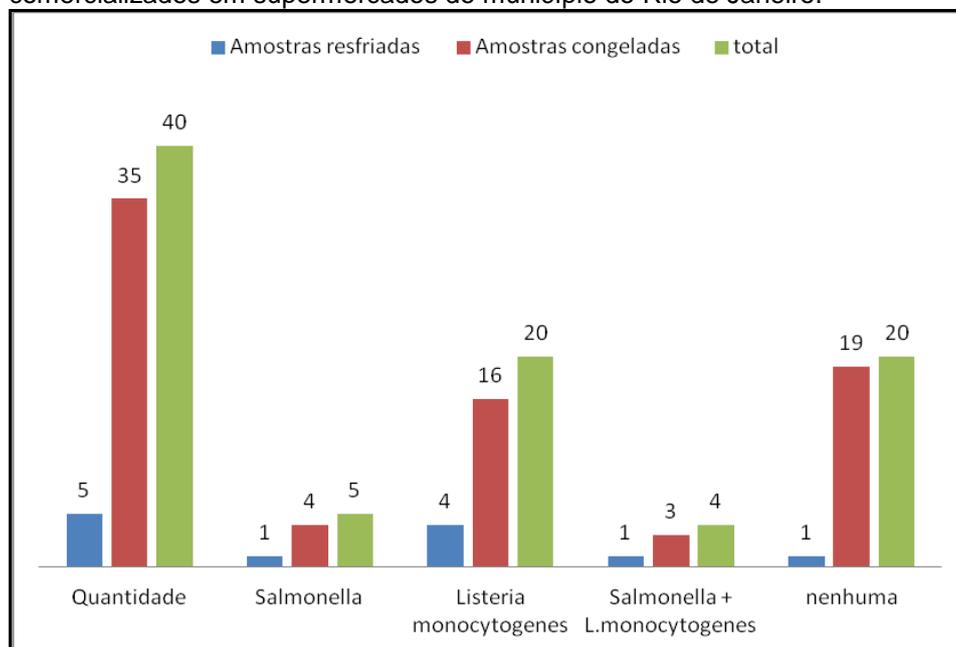
A medição dos halos foi feita utilizando régua ou paquímetro e os resultados foram estipulados obedecendo aos pontos de corte propostos pelo EUCAST, classificando em resistente ou sensível. A cepa de referência utilizada nestas análises foi *S. pneumoniae* ATCC 49619 (EUCAST, 2015).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Isolamento e identificação

Após as análises, foi constatada a presença de 21 isolados de *Salmonella* spp. em cinco amostras, e 57 isolados de *L. monocytogenes* em 20 amostras. Foi verificada a presença dos dois patógenos, simultaneamente, em quatro amostras. Dentre as amostras congeladas, quatro foram positivas unicamente para *Salmonella*, 16 para *L. monocytogenes* e três apresentaram ambas as bactérias. Das amostras resfriadas, três apresentaram unicamente *L. monocytogenes* e uma foi positiva para as duas bactérias estudadas (Figura 1).

Figura 1 - Relação de contaminação por *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* entre amostras resfriadas e congeladas de cortes de frango comercializados em supermercados do município do Rio de Janeiro.



Fonte: Próprio autor

O armazenamento é um dos fatores influentes quanto ao aumento da carga microbiana dos alimentos. O uso do resfriamento e do congelamento é eficaz na redução ou inibição do crescimento microbiano (FORSYTHE, 2013). Entretanto,

muitos patógenos conseguem sobreviver e até se multiplicar em baixas temperaturas, como no caso da *L. monocytogenes*, por ser uma bactéria psicotrófica, o que gera um maior risco no consumo de carnes mal preparadas. A carne de frango encontra-se comercializada nos estados congelada e resfriada. Neste estudo, foram obtidas majoritariamente amostras congeladas, por terem sido as mais encontradas no varejo.

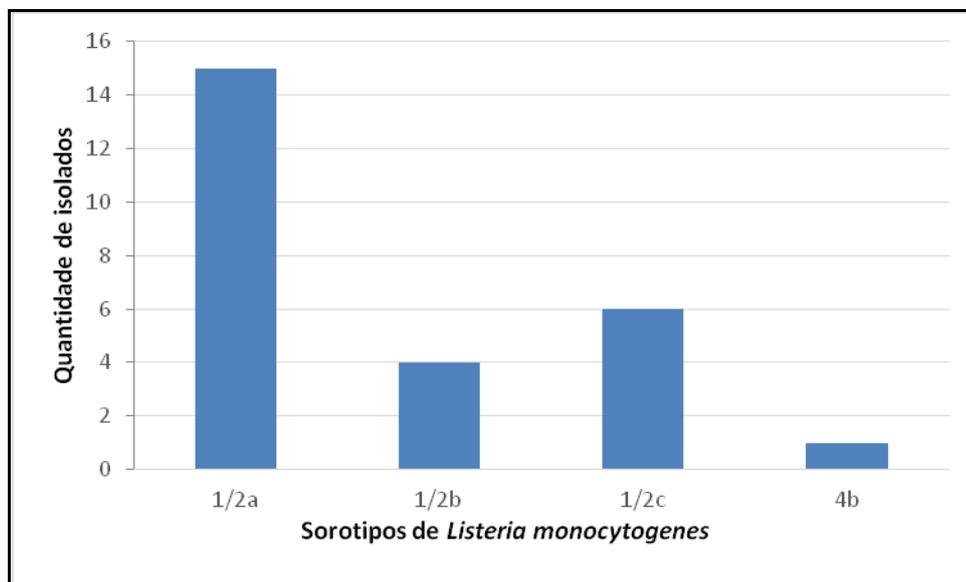
Observou-se que, de maneira geral, 80% das amostras resfriadas e 54,3% das amostras congeladas apresentaram contaminação por *Salmonella* e *L. monocytogenes*. Ao analisar de maneira individual, a contaminação por *Salmonella* ocorreu em 20% das amostras resfriadas e 11% das amostras congeladas, e a contaminação por *L. monocytogenes* ocorreu em 80% das amostras resfriadas e em 45,7% das amostras congeladas. A contaminação pelos dois patógenos ocorreu em 20% das amostras resfriadas e 8% das amostras congeladas.

Uma comparação estatística dos dados obtidos não se torna possível pelo número reduzido de amostras resfriadas em comparação com as congeladas. Contudo, ao observar os resultados confirma-se que o congelamento se apresenta como uma melhor forma de armazenamento de carne de frango, auxiliando na manutenção da qualidade microbiológica e da segurança destes alimentos.

4.1.1. *Listeria monocytogenes*

Foram registrados 57 isolados de *L. monocytogenes* em 50% das amostras de frango analisadas. Os resultados da sorologia dos isolados identificaram os sorotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b. Houve o predomínio do sorotipo 1/2a, compreendendo 40 dos 57 isolados, seguido pelos sorotipos 1/2b e 1/2c, cada um contendo oito isolados identificados. Constatou-se, também, a presença do sorotipo 4b com um isolado (Figura 2). Três dos sorotipos mais prevalentes em casos de listeriose humana foram detectados nestas amostras, o que aumenta o risco de contaminação pelo consumo da carne, se preparada indevidamente.

Figura 2 – Sorotipos de *Listeria monocytogenes* identificados nas amostras resfriadas e congeladas de cortes de frango comercializados em supermercados do município do Rio de Janeiro



Fonte: Próprio autor

A presença de *L. monocytogenes* em carne de frango já foi relatada por outros pesquisadores, como Reiter e colaboradores (2011), que relataram a presença de *L. monocytogenes* em 78,21% das amostras de cortes de frango analisadas em Blumenau, Santa Catarina. Dentre as amostras refrigeradas e congeladas analisadas em seu trabalho, 85% e 100% das amostras foram positivas para *L. monocytogenes*, respectivamente.

Ristori e colaboradores (2014), por sua vez, realizaram um estudo sobre prevalência de *Listeria* spp. em diferentes tipos de carnes, incluindo a carne de frango, em São Paulo. Seus resultados apontaram a positividade em 58% das amostras de carne de frango analisadas.

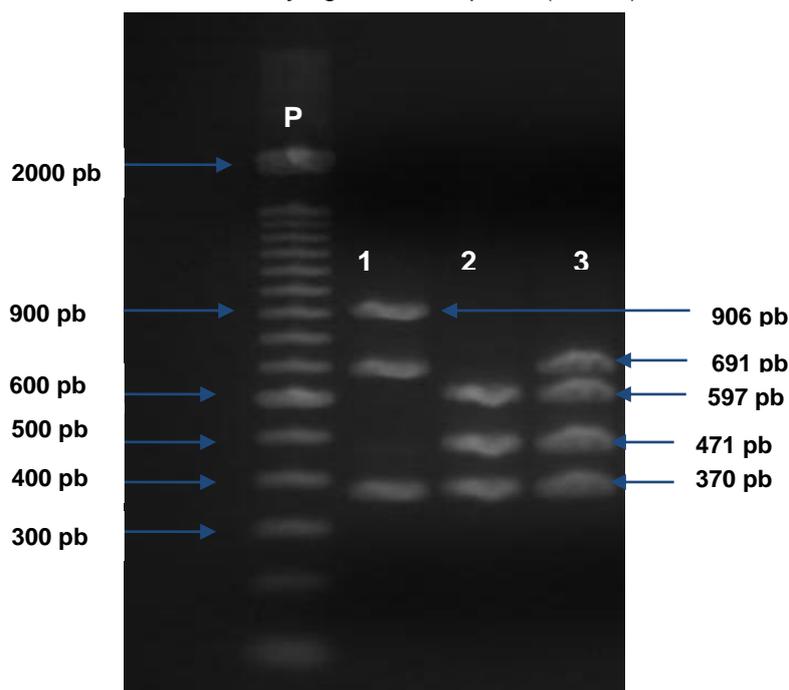
O trabalho de Mendonça e colaboradores (2016) também registrou a presença de *L. monocytogenes* em carne de frango no Brasil, no estado do Rio Grande do Sul. Em suas análises, 33,3% das amostras foram positivas para a presença do patógeno, obtendo-se 15 isolados, os quais apresentaram os sorotipos 1/2a (5), 1/2b (3), 1/2c (1) e 4e.

Para auxiliar o entendimento e monitoramento da contaminação de alimentos por patógenos alimentares, a elaboração de métodos de detecção rápida é importante para a vigilância sanitária e epidemiológica. Métodos moleculares têm

sido apontados como excelentes ferramentas, devido a sua especificidade e rapidez. Muitos métodos desenvolvidos são utilizados na identificação de *L. monocytogenes*, dentre eles a Multiplex-PCR.

No presente estudo, os resultados obtidos pela Multiplex-PCR estão de acordo com os demonstrados por Doumith e colaboradores (2004). Observou-se a amplificação dos fragmentos dos genes-alvo utilizados seguindo padrões característicos indicativos para cada sorotipo. Estes resultados estão em concordância com os obtidos pela sorologia convencional. Dentre os padrões observados, foi constatada a amplificação atípica do fragmento de 691 pb (*Imo0737*) na amostra identificada sorologicamente como *L. monocytogenes* 4b (Figura 3).

Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose dos resultados da Multiplex-PCR e do perfil atípico de amplificação do gene *Imo0737* da cepa identificada *L. monocytogenes* sorotipo 4b (IVb-v1).



Fonte: Próprio autor. P – Peso molecular (2000 pb)
1- Cepa de referência *L. monocytogenes* ATCC 7644 (1/2a); 2 – Cepa de referência *L. monocytogenes* ATCC 19117 (4d); 3 – Cepa identificada: *L. monocytogenes* 4b.

Este perfil foi primeiramente observado por Graves e colaboradores (2007), em um trabalho divulgado no *XVI International Symposium on Problems of Listeriosis* (ISOPOL). Desde então, houve mais detecções por parte de outros pesquisadores. Em seu trabalho, Leclerq e colaboradores (2011) caracterizaram isolados que apresentaram este padrão de Multiplex-PCR e os nomearam como “perfil IVb variante 1” (IVb-v1). Os autores relataram a presença de cinco perfis de PFGE com uso das enzimas de restrição *Ascl* e *Apal* combinadas, de amostras isoladas da França, Brasil e Algeria.

A origem deste fragmento é desconhecida. Os estudos de Lee e colaboradores (2012) demonstraram através da hibridização de 210 isolados 4b com o gene *lmo 0737*, a positividade deste fragmento de 691 pb em 11% dos isolados e sua homologia com o cassete de genes normalmente encontrado em cepas pertencentes à linhagem II (que incluem sorotipos 1/2a, 3a, 1/2c e 3c). Segundo os autores, existe uma teoria evolutiva, baseada em análises filogenéticas, de que durante a evolução de *L. monocytogenes*, um ancestral de linhagem comum diversificou nos sorotipos 1/2a e 1/2b (com os sorotipos 1/2c e 4b subsequentemente emergindo destes sorotipos), respectivamente. Contudo, a presença do cassete de genes conservado, observado nestas cepas IVb-v1 deveria ser observada dentro de algumas amostras do sorotipo 1/2b, o que não foi evidenciado. Portanto, os resultados da alta conservação entre amostras IVb-v1 e cepas da linhagem II, apresentados em seu estudo, arguem contra a teoria evolutiva de um ancestral comum e fortalece a teoria de transferência horizontal entre cepas da linhagem II a certos grupos clonais do sorotipo 4b, que segundo os autores é defendida por outros estudos como o de Leclerq e colaboradores (2011).

No Brasil, Vasconcelos e colaboradores (2008) relataram a amplificação de um fragmento de mesmo tamanho, oriundo de uma amostra de fluido cérebro espinhal de um recém-nascido. O resultado da biotipagem o identificou como sendo do sorotipo 4b, sendo também confirmada a amplificação deste fragmento atípico após a realização da multiplex-PCR. No trabalho de Ristori e colaboradores (2014), 134 isolados de *L. monocytogenes* foram submetidos à sorotipagem molecular pela multiplex-PCR, e os autores observaram a presença do perfil atípico IVb-v1 em 18,8% destas cepas.

A presença de *L. monocytogenes* em alimentos constitui um alto risco, visto o alto potencial patogênico desta bactéria. No Brasil, a notificação de surtos de

listeriose humana sofre dificuldades e não existem fortes evidências de transmissão por alimentos. Entretanto, resultados de alguns estudos auxiliam na elucidação deste panorama. Martins e colaboradores (2010), em seu estudo de casos, informaram que este foi o primeiro surto de *L. monocytogenes* em pacientes hospitalizados caracterizado no país. O mesmo estudo sugere que a origem do surto foi a cozinha do hospital.

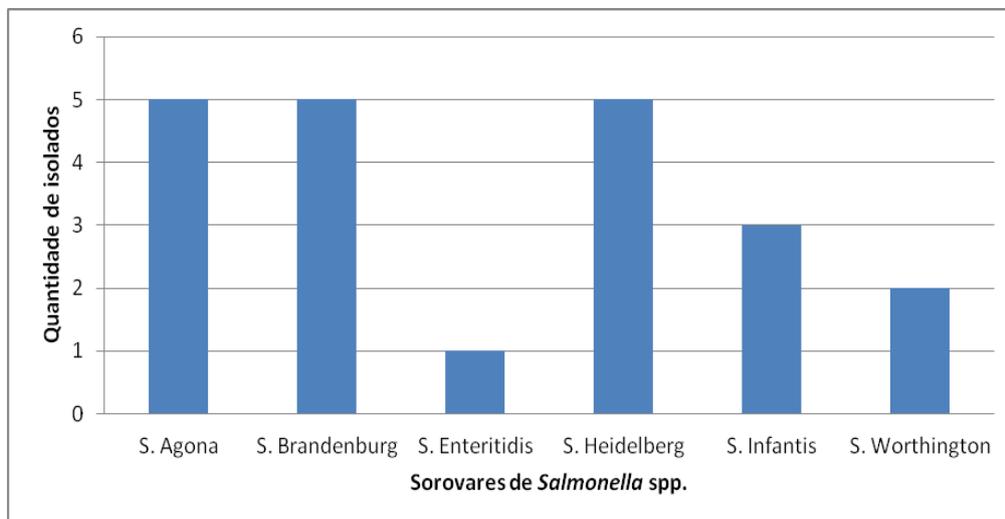
Na Europa, a listeriose invasiva é uma infecção de grande conceito em saúde pública devido a sua severidade clínica, com taxas de hospitalização superiores a 90%. Em alguns países como Áustria, Dinamarca, Hungria, Itália, Espanha e Suécia, houve um aumento significativo nas tendências de notificação de listeriose entre 2005 e 2009. Foi estimado que em 2009 houve aproximadamente 270 mortes devido a esta infecção, número superior às mortes causadas por salmonelose e campilobacteriose, no mesmo ano na União Europeia (PONTELLO et al, 2012).

4.1.2. *Salmonella* spp.

A identificação sorológica de *Salmonella* spp. atestou a presença de seis sorovares: S. Agona, S. Heidelberg, S. Brandenburg, S. Infantis, S. Worthington e S. Enteritidis. Cada sorovar foi isolado de uma amostra diferente, com exceção dos sorovares Brandenburg e Agona. Os isolados S. Agona, S. Heidelberg e S. Brandenburg foram os que se apresentaram em maior quantidade, seguido dos sorovares S. Infantis, S. Worthington e S. Enteritidis (Figura 4).

Atualmente, há o predomínio de poucos sorovares de *Salmonella* spp., alguns considerados emergentes, incluindo Heidelberg, Infantis e Enteritidis. Segundo o relatório do PREBAF publicado em 2008, *Salmonella* obteve prevalência média de 3,03% em amostras de carne congelada de frango, com 18 sorovares isolados. Dentre estes isolados, houve a maior prevalência se S. Enteritidis (em 48,8%), seguido de S. Infantis (7,6%), S. Typhimurium (7,2%), S. Heidelberg (6,4%), S. Mbandaka (4,8%) e 15 (5,2%) cepas caracterizadas como *Salmonella* spp. (BRASIL, 2008). Os resultados de nosso estudo relataram a presença de *Salmonella* spp. em 11, 43% das amostras congeladas de carne de frango.

Figura 4 - Sorovares de *Salmonella* spp. identificados nas amostras resfriadas e congeladas de cortes de frango comercializados em supermercados do município do Rio de Janeiro



Fonte: Próprio autor

O sorovar Enteritidis é considerado o segundo sorovar mais isolado no mundo, tornando-se alvo de estudos devido a sua capacidade de infectar um amplo espectro de animais e de apresentar linhagens multirresistentes a desinfetantes e antimicrobianos comuns. Os dados do presente estudo demonstram a presença de uma única cepa dentre os isolados identificados. Este sorovar é frequentemente associado à avicultura e seus respectivos produtos (HOOTON; ATTERBURY; CONNERTON, 2011).

O sorovar Agona já foi um dos dez sorovares mais isolados em pacientes com salmonelose no Brasil, sendo muito associado a suínos (TAVECHIO et al, 2002). Durante o ano de 2008 foi responsável por surtos ocorridos em 15 estados norte-americanos e na Irlanda, Reino Unido e Finlândia (CDC, 2008, O' FLANAGAN et al, 2008). O presente estudo revela também sua presença em carne de frango, o que demonstra que esta matriz também se torna propícia para sua instalação e multiplicação, tornando-se mais um risco ao consumidor.

O sorovar Heidelberg é o terceiro mais frequente na avicultura do Canadá, sendo destaque em saúde pública alternando com *S. Enteritidis* a segunda ou terceira posição como o mais isolado em humanos. Dados sobre o isolamento de *S. Heidelberg* no Brasil são escassos, porém este sorovar é identificado em aves e

produtos derivados desde 1962 (COLLA et al, 2012). Fato este confirmado pela presença do referido sorovar em uma amostra (2,5%), no presente estudo.

Salmonella Brandenburg é um sorovar muito isolado na Nova Zelândia, em fazendas de criação de ovelhas, e se tornou um problema para os criadores por ser causa de abortos. Infecções em humanos não eram comumente documentadas até 1996, porém houve um aumento destes casos a partir de um surto epidêmico em 2000. A maioria dos casos em humanos tem sido atribuída ao contato de trabalhadores com animais doentes (COOK, 2015). Não existem muitos dados de isolamento deste sorovar em carnes de frango, no Brasil. O trabalho de Nunes e colaboradores (1995) detectou sua presença em cortes de coxa/sobrecoxa comercializados em Goiânia/GO. O presente estudo revelou a presença deste sorovar em 2,5% das amostras de carne de frango analisadas.

O sorovar Infantis ocupa o primeiro lugar no ranking de isolados de *Salmonella enterica* em humanos, na Alemanha desde 2001. Seu reservatório são animais, mais especificamente populações de frangos. A pesquisa feita pela EFSA, em 2007, indicou que *S. Infantis* foi um dos principais achados em fazendas de frangos de corte, com frequência de 87% na Hungria, 19% na Polônia e 13% na República Tcheca. Já em 2009, a EFSA constatou que *S. Infantis* foi o mais frequente sorovar isolado de frangos de corte na União Europeia, atingindo 55% dos isolados (MILLER et al, 2010). O presente estudo detectou sua presença em 14,28% das amostras, demonstrando que este sorovar também está inserido na avicultura brasileira, podendo estar disseminado em diferentes regiões do país.

O sorovar Worthington já foi muito relacionado com surtos de infecções neonatais, no início do século XXI. Segundo Ghadage e Bal (2002b), *S. Worthington* era considerado um patógeno emergente causador de surtos de meningite em neonatos. Já em adultos, foi relacionado a quadros de endocardite infecciosa. Sua presença nas amostras de carne de frango analisadas neste estudo aponta para uma possível relação de disseminação por alimentos contaminados, corroborando o risco do consumo de carnes mal preparadas.

A presença de *Salmonella* spp. em carne de frango torna-se possível pelas limitações dos procedimentos de higienização e processamento da cadeia produtiva, como relatado pela Resolução RDC nº 13, de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001b). A contaminação da avicultura ocorre em diferentes etapas e por diferentes fontes.

A alimentação é considerada uma das principais vias de transmissão de *Salmonella* para frangos e suínos. Sorovares de *Salmonella* têm sido frequentemente identificados em ingredientes utilizados nas rações, bem como em diferentes pontos na produção. Pellegrini e colaboradores (2015) detectaram a presença de *Salmonella* spp. em moinhos de alimentação brasileiros estudados. Foram identificados 23 sorovares incluindo Agona e Worthington. Além disso, diversos fatores contribuem para a contaminação dos frangos, como higiene precária e presença de animais vetores, durante o processo de criação.

Diversos países encaram o desafio do controle de contaminação deste patógeno. Um dos líderes em produção de carne de frango, a China, por exemplo, possui alto índice de salmonelose causada por sorovares não-tifoides. Anualmente são registradas 9.874 milhões de casos de gastroenterite, sendo 91,5% relacionados à transmissão por alimentos. Já se relata que mais da metade das carcaças de frango estão contaminadas com *Salmonella* spp. Em sua pesquisa, Zhu e colaboradores (2014), analisaram 1.595 carcaças de frango e constataram que 41,6% foram positivas para *Salmonella*, pelo método do número mais provável. O estudo também indicou maior prevalência de *Salmonella* em amostras sem embalagem (45,1%) em relação às amostras embaladas (37,4%). A embalagem é efetiva na redução relativa (comparado ao valor basal, sem intervenções) da quantidade e prevalência do patógeno, o que pode contribuir para a redução da contaminação cruzada durante o transporte. As condições de armazenamento também podem contribuir para o aumento da concentração celular de *Salmonella*. O estudo indicou que carcaças fracionadas congeladas apresentaram menores contagens que as recém-abatidas.

Os métodos utilizados durante a produção e embalagem dos alimentos visam diminuir a concentração de contaminantes microbiológicos. Contudo, o consumidor também possui a responsabilidade de manter os cuidados recomendados durante o preparo, para evitar o contágio com patógenos e a contaminação cruzada. O armazenamento e o cozimento dos alimentos são importantes etapas de responsabilidade de cozinheiros, sejam profissionais ou domésticos.

A maioria dos sorotipos não se multiplica em temperaturas abaixo de 7°C, sendo importante, portanto, a devida estocagem da carne de frango em temperaturas compatíveis a esta, como no congelamento. A destruição de *Salmonella* spp. através do calor é muito relacionada ao substrato e ao sorotipo

relacionado ao alimento, mas de maneira geral são destruídas em temperaturas superiores a 55° C e temperaturas de pasteurização. Logo, a correta cocção do alimento é uma medida de segurança eficaz contra a contaminação por este agente etiológico (CARDOSO; CARVALHO, 2006).

4.2. Sensibilidade aos Antimicrobianos

4.2.1. *Listeria monocytogenes*

Os resultados dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos de *L. monocytogenes* encontram-se expressos na Tabela 1. Dos 57 isolados, 21 foram submetidos a estas análises, devido a muitas amostras apresentarem unicamente um sorotipo de *L. monocytogenes*, enquanto outras tiveram a presença de mais de um sorotipo. A cepa controle de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 esteve dentro dos parâmetros recomendados pelas duas metodologias, sendo sensível aos antibióticos testados.

A avaliação da sensibilidade dos isolados de *L. monocytogenes* pelo teste de disco-difusão em ágar MH-F, demonstrou que todos os 21 isolados analisados foram sensíveis ao meropenem e trimetoprim-sulfametoxazol. Quanto à eritromicina, 18 isolados apresentaram sensibilidade e três foram resistentes, sendo um do sorotipo 1/2a, um do sorotipo 1/2b e um do sorotipo 1/2c. Já a avaliação baseada no CIM revelou que todos os sorotipos foram sensíveis aos antimicrobianos penicilina-G e ampicilina.

Tabela 1 - Teste de sensibilidade aos antimicrobianos dos sorotipos de *Listeria monocytogenes*, segundo o EUCAST (2015) e avaliação da concentração mínima inibitória dos antibióticos Ampicilina e Penicilina, segundo o CLSI (2010).

Antibióticos	Meropenem (10 µg)		Eritromicina (15 µg)		Trimetoprim-Sulfametoxazol (1,25-23,75 µg)		Total de Isolados	MIC Ampicilina (µg/mL)	MIC Penicilina (µg/mL)
	R	S	R	S	R	S			
<i>S. pneumoniae</i> ATCC 49619*		1	-	1	-	1	1	0,06-025	0,25-1,0
<i>L. monocytogenes</i> 1/2a		12	1	11	-	12	12	≤ 0,25	≤ 2,0
<i>L. monocytogenes</i> 1/2b		2	1	1	-	2	2	0,25	≤ 2,0
<i>L. monocytogenes</i> 1/2c		6	1	5	-	6	6	< 0,125	< 0,125
<i>L. monocytogenes</i> 4b		1		1		1	1	< 0,125	< 0,125
Total	0	21	3	18	0	21	21	-----	-----

R- Resistente; S- Sensível. *Cepa padrão para o controle de qualidade da técnica.

Baseado nos resultados do teste de sensibilidade aos antimicrobianos, nota-se que houve alguns isolados resistentes à eritromicina. A emergência de cepas de *Listeria* spp. resistentes a antibióticos, isoladas de alimentos, tem aumentado nos últimos anos. Diferentes autores têm investigado os perfis de resistência de *L. monocytogenes*.

Gómez e colaboradores (2014) avaliaram a sensibilidade a 20 antibióticos de cepas de *L. monocytogenes* isoladas de amostras de carnes prontas para o consumo, baseado na metodologia de disco-difusão do EUCAST. Em seu estudo, 34,5% dos isolados apresentaram resistência a um ou dois antibióticos e 2,9% apresentaram multirresistência. A resistência a oxacilina foi a mais comum, sendo presente em 100% dos isolados analisados. Os autores também ressaltaram a proeminente presença de resistência à clindamicina que alcançou prevalência de 35% a 46,2%. Os autores também relataram a resistência à tetraciclina, porém em baixa prevalência (0,5%).

Em um estudo sobre a resistência de isolados de *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *Listeria* spp., obtidos de amostras de suínos na Colômbia, Gamboa-Marín e colaboradores (2013) verificaram que somente 1,2% dos isolados de *L. monocytogenes* apresentaram resistência a ampicilina, penicilina e trimetoprim-sulfametoxazol, considerado um bom resultado, visto que estes são a primeira escolha de antibióticos para o tratamento de listeriose. Contudo, ao analisar o perfil de resistência a outros antibióticos, os autores verificaram que a resistência à eritromicina esteve entre os fenótipos de resistência mais frequentemente detectados. Quanto ao meropenem, houve a detecção de resistência intermediária em 0,04% dos isolados. Estes resultados se assemelham aos do presente estudo, pela detecção de resistência à eritromicina.

A técnica de microdiluição em caldo foi realizada por estudos como os de Yan e colaboradores (2010), onde os isolados de *L. monocytogenes* obtidos de alimentos entre 2005 e 2007 foram submetidos à análise de 18 antimicrobianos. Os resultados apontaram que 77,8% das amostras foram resistentes à cefotaxima, 17,8% à ciprofloxacina, 15,6% à tetraciclina, 12,2% à estreptomicina e que 18,9% apresentaram multirresistência. Entretanto, a inoculação foi realizada em caldo BHI, um meio de cultura diferente do recomendado pelo atual padrão do CLSI, que exige o uso de CAHMB-LHB.

Prieto e colaboradores (2016), por sua vez, realizaram um estudo com a finalidade de avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos de isolados de *L. monocytogenes* de origem clínica e alimentar. Os autores registraram que todas as cepas analisadas foram sensíveis à ampicilina, à penicilina, ao trimetoprim-sulfametoxazol, à gentamicina, à tetraciclina e à rifampicina. Detectaram também resistência intermediária à eritromicina em 30% dos isolados clínicos e 45% dos isolados de alimentos.

Muitos estudos como os de Alonso-Hernando e colaboradores (2012), Adzitey e colaboradores (2013), Jamali e Thong (2014) e Shi e colaboradores (2015) relataram a resistência de *L. monocytogenes*, isolados de alimentos, a diversos antibióticos. Entretanto, estes autores utilizaram o método de disco-difusão referenciando os padrões do CLSI, o que atualmente não condiz com as recomendações do órgão, que indica a realização da microdiluição em caldo para avaliação da resistência a antimicrobianos (CLSI, 2010).

O método de disco-difusão é uma das metodologias adequadas na avaliação de sensibilidade aos antimicrobianos. Atualmente o EUCAST é o único órgão a apresentar parâmetros pré-estabelecidos. Entretanto, ainda é difícil encontrar trabalhos publicados que tenham utilizado esta metodologia, dificultando a comparação com nossos resultados.

Madeo e colaboradores (2015) realizaram um estudo de análise do perfil de susceptibilidade de *L. monocytogenes* a diversos antimicrobianos, isoladas de humanos, e relataram que todas as amostras testadas apresentaram sensibilidade à penicilina G, ao meropenem e à eritromicina, de acordo com os *breakpoints* propostos pelo EUCAST. Os resultados apontaram uma considerável amplitude na faixa de CIM para cefotaxima, atingindo valores entre 0,06 µg/mL a 32 µg/mL, com 82% das cepas apresentando valores ≥ 2 µg/mL. Vale lembrar que não existem *breakpoints* definidos para cefotaxima publicados pelo EUCAST, entretanto, seus resultados podem contribuir para uma melhor elucidação do quadro de resistência de *L. monocytogenes* apontando o possível surgimento de resistência a este antibiótico.

4.2.2. *Salmonella* spp.

Os resultados dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos dos sorovares de *Salmonella* spp. encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 - Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos sorovares de *Salmonella* spp., segundo CLSI (2015b).

Antibióticos/ Sorovares	S. Heidelberg	S. Brandenburg	S. Enteritidis	S. Agona	S. Wortington	S. Infantis
Ampicilina	R	R	S	R	S	S
Amoxicilina + Ác. Clavulânico	R	S	S	S	S	S
Ceftriaxona	I	R	S	R	S	S
Aztreonam	S	R	S	I	S	S
Gentamicina	S	S	S	S	S	S
Tetraciclina	R	S	S	S	S	S
Ciprofloxacina	S	S	S	S	S	I
Trimetoprim – Sulfametoxazol	S	S	S	S	S	S
Nitrofurantoína	S	S	R	I	S	S
Ác. Nalidíxico	R	S	R	I	S	R

Fonte: próprio autor. R- Resistente; S- Sensível.

O sorovar Heidelberg apresentou resistência a quatro antibióticos: ampicilina, amoxicilina + ác. clavulânico, tetraciclina e ác. nalidíxico, e resistência intermediária à ceftriaxona. A resistência superior a três, ou mais, classes de antibióticos caracteriza o perfil de multirresistência (COSTA et al, 2013). Esse mesmo sorovar apresentou resistência intermediária à ceftriaxona. Portanto, pode-se considerar que este isolado de *S. Heidelberg* é um exemplar de salmonela Multi-Droga Resistentes (MDR).

O aumento da prevalência de salmonelas MDR tem sido um emergente problema mundial (CDC, 2014). Cepas de *Salmonella* MDR isoladas têm sido

identificadas em diversos sorovares como Agona, Anatum, Choleraesuis, Derby, Dublin, Heidelberg, Kentucky, Newport, Pullorum, Schwarzengrund, Senftenberg, Typhimurium e Uganda (HUR; JAWALE; LEE, 2012).

A importância de *S. Heidelberg* na saúde pública tem aumentado, devido aos resultados que apontam uma redução da susceptibilidade aos antimicrobianos relacionados à ceftriaxona, podendo limitar as opções de tratamento de gestantes e crianças que desenvolvem salmonelose extraintestinal (COLLA et al, 2012).

O sorovar Worthington apresentou sensibilidade a todos os antibióticos testados no presente trabalho. Contudo, já existe o registro de resistência aos antibióticos de isolados clínicos. Em um estudo de isolamento de *S. Worthington*, a partir de um abscesso esplênico de um paciente com leucemia mieloide crônica, foi detectada resistência aos antibióticos ampicilina, gentamicina, cefotaxima, cloranfenicol e tetraciclina (GHADAGE; BAL, 2002a).

O uso de antibióticos para o tratamento de salmoneloses não é recomendado, pelo fato de ser uma doença autolimitante, de maneira geral. Em alguns casos, a antibioticoterapia agrava o quadro clínico e pode prolongar o estado de portador do paciente. O tratamento de pacientes imunocompetentes se baseia na reidratação oral como suporte para o restabelecimento do organismo. Entretanto, para pacientes imunocomprometidos e recém-nascidos a antibioticoterapia é indispensável (CARDOSO; CARVALHO, 2006).

As tendências mundiais de resistência a antimicrobianos variam entre resultados positivos e negativos. O registro anual do NARMS foca a pesquisa de resistência aos antibióticos que são considerados importantes na medicina humana, bem como nos isolados que já apresentaram multirresistência. Durante os 17 anos de sua história, o NARMS encontrou baixa resistência de *Salmonella* à ciprofloxacina, um dos antibióticos normalmente utilizados no tratamento de infecções em humanos. Em 2011 foi registrado que 85% das salmonelas isoladas de humanos não apresentaram resistência a nenhum dos antibióticos testados. A multirresistência aumentou, de maneira geral, nos isolados de carnes de frango com leves flutuações (FDA, 2014).

A provável causa deste aumento seria o uso de diferentes classes de antibióticos como suplementação nas rações dos frangos. Como no exemplo das cefalosporinas de terceira geração, onde foi detectado aumento da resistência a esta classe de antibióticos, de isolados de carne de frango. O grande problema está no

fato de que esta classe de antibióticos é muito utilizada no tratamento de infecções de *Salmonella*, o que acaba por diminuir sua eficácia e limitando as opções. Por sua vez, o FDA proibiu a administração (FDA, 2014).

Quinolonas e fluoroquinolonas como ciprofloxacina, e cefalosporinas de terceira geração como ceftriaxona são comumente usados em tratamentos de infecções por *Salmonella* em humanos, nos EUA. O aumento de seu uso profilático na medicina veterinária tem conduzido à elevação da resistência de patógenos como *Salmonella*. Em Enterobacteriaceae, a resistência ao ácido nalidíxico se correlaciona com a diminuição da susceptibilidade à ciprofloxacina e possíveis falhas no tratamento com fluoroquinolonas (HUR; JAWALE; LEE, 2012).

Em 2013, o NARMS testou a sensibilidade a antimicrobianos em mais de 5.000 isolados clínicos, e relatou mudanças nos padrões registrados nos anos anteriores, 36% das infecções por *S. Enteritidis* apresentaram resistência ao ácido nalidíxico. Os sorovares Dublin, Heidelberg, Newport e Typhimurium apresentaram mais de 2/3 de infecções resistentes à ceftriaxona. A resistência do sorovar Heidelberg à ceftriaxona aumentou para 15%. A multirresistência permaneceu constante, mantendo-se em 10% das infecções (CDC, 2015b).

Segundo o CDC, de um modo geral, comparando os resultados registrados entre 2004 e 2008 com os de 2013, notou-se que entre salmonelas não-tifoides a resistência à ceftriaxona diminuiu 0,7%; a resistência ao ácido nalidíxico aumentou 0,6%; a resistência a uma ou mais classes foi maior em 2013, com 19,2% e a resistência a três ou mais classes manteve em 9,8% em 2013 (CDC, 2015b).

A partir dos resultados deste trabalho e comparado aos de outros autores, nota-se que a carne de frango é suscetível a conter a presença dos patógenos *Salmonella* e *L. monocytogenes*. Como já mencionado, sabe-se que as atuais tecnologias de processamento aplicadas à avicultura não são totalmente eficazes na eliminação de *Salmonella* spp. do produto final, sendo um dos fatores que impedem o estabelecimento de um padrão microbiológico para determinação da qualidade do produto, na legislação brasileira. A pesquisa de *L. monocytogenes*, por sua vez, não é contemplada na avaliação da qualidade de carnes de frango sendo exclusiva para alguns tipos de queijo (BRASIL, 2001b).

Em outros países, porém, a pesquisa de *Salmonella* spp. é considerada um padrão microbiológico vigente na avaliação de carne de frango. A União Europeia em seu Regulamento (CE) nº 2073/2005, relativo aos critérios microbiológicos

aplicáveis aos gêneros alimentícios, estabelece a ausência de *Salmonella* em 25 g, como critério de segurança para carne picada e preparados de carne, obtidos de carne de aves destinados a serem consumidos cozidos. Além disso, quando relativo aos critérios de higiene de processos, também estabelece ausência em 25g de carcaças de frango e de carne de perus (EU, 2005).

Apesar de não ser aplicada diretamente como critério de qualidade da carne de frango, o mesmo documento também considera (de modo geral) como um objetivo à manutenção da segurança alimentar, que a concentração de *L. monocytogenes* nos gêneros alimentícios deve se encontrar inferior a 100 UFC/g. Também recomendam, quando necessários, estudos de conformidade durante o processo de fabricação, para verificar o cumprimento dos critérios estipulados durante a vida útil dos produtos. É um requisito em especial para os produtos prontos para consumo, a fim de evitar a contaminação com este patógeno (EU, 2005).

Os EUA intensificaram os esforços para a manutenção da qualidade de alimentos. O *Food Safety and Inspection Service* (FSIS) diz possuir tolerância zero para certos patógenos, incluindo *Salmonella* e *L. monocytogenes*. A agência controla a disseminação dos patógenos através da inspeção dos estabelecimentos avícolas para verificar a conformidade com os padrões estabelecidos e pela elaboração de manuais e guias sobre métodos de controle destinados aos produtores (USDA, 2012, USDA, 2014a).

Os consumidores também se tornaram alvo para transmissão deste tipo de informação. Através de portais como "*FoodSafety.gov*" e até mesmo o *site* do FDA, os consumidores possuem acesso às informações claras sobre DTA, métodos de conservação de alimentos e também sobre os patógenos mais relacionados com os tipos de alimentos, assim como quais medidas devem ser tomadas em caso de evolução de quadros de DTA (USDA, 2014b, FDA, 2015). Estas são estratégias de vigilância importantes para o efetivo controle sanitário de alimentos, abrangendo desde a produção até o consumo.

O risco biológico de patógenos alimentares é evidente e deve ser suprimido por medidas adequadas de vigilância sanitária que abrangem não somente a correta e constante inspeção da cadeia produtiva, como também o desenvolvimento de programas educativos para a correta elucidação dos problemas vigentes e orientação dos consumidores.

Diante dos dados sobre a presença de *Salmonella* e *L. monocytogenes* em carne de frango obtidas neste estudo, evidencia-se a necessidade de intensificar os esforços para a manutenção da segurança alimentar, com a devida fiscalização sanitária dos processos de produção; desenvolvimento de técnicas adequadas para a garantia de inocuidade dos produtos; a devida orientação dos consumidores quanto aos riscos inerentes à presença destes micro-organismos e o devido preparo da carne a ser consumida.

5 CONCLUSÕES

- ✓ O presente estudo confirmou a presença de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes* em 11,9% e 50% respectivamente, das amostras de cortes de frango vendidos no varejo, na cidade do Rio de Janeiro;
- ✓ A identificação sorológica de *Salmonella* aplicada aos isolados detectou a presença dos sorovares S. Agona, S. Heidelberg, S. Brandenburg, S. Infantis, S. Worthington e S. Enteritidis, e os sorotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c e 4b, de *L. monocytogenes*;
- ✓ Outro achado importante do estudo foi a identificação de uma variante do sorotipo 4b através da Multiplex-PCR. O chamado IVb-v1, muito associado a amostras clínicas obtidas de casos de listeriose, e que começa a ser também associado a alimentos, incluindo a carne de frango;
- ✓ A avaliação da sensibilidade a alguns antimicrobianos, importantes no tratamento das infecções causadas por estes patógenos, revelou que nos sorovares de *Salmonella* encontrados, foi confirmada resistência ao ác. nalidíxico, nitrofurantoína, tetraciclina, aztreonam, ceftriaxona e amoxicilina + ác. clavulânico. Já para *Listeria monocytogenes*, foi confirmada a resistência a eritromicina de três isolados pertencentes aos sorotipos 1/2a, 1/2b, 1/2c
- ✓ A carne de frango é um potencial veículo de contaminação por *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, sendo imperterível os cuidados no preparo como cozinhar bem e evitar a contaminação cruzada.

REFERÊNCIAS

ABPA. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório Anual – 2015**. São Paulo, 2014. Disponível em: <<http://www.ubabef.com.br/publicacoes>>. Acesso em: 23 de fev. 2016.

ADZITEY, F. et al. Prevalence, antibiotic resistance and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from ducks, their rearing and processing environments in Penang, Malaysia. **Food Control.**, v.32, n.2, p.607-14, 2013.

AKBAR, A.; ANAL, A.K. Prevalence and antibiogram study of *Salmonella* and *Staphylococcus aureus* in poultry meat. **Asian Pac J Trop Biomed.**, v.3, n.2, p.163-8, 2013.

ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, E. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Spain: Comparison between 1993 and 2006. **Int J Food Microbiol.**, v.153, p.281–7, 2012.

ALONSO-HERNANDO, A. et al. Increase over time in the prevalence of multiple antibiotic resistance among isolates of *Listeria monocytogenes* from poultry in Spain. **Food Control.**, v.23, p.37-41, 2012.

ANDREWS, W.H.; JACOBSON, A.; HAMMACK, T. *Salmonella*. In: HAMMACK T. (Chair). **Bacteriological Analytical Manual**. New Hampshire: FDA, 2014. Chapter 5. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm>. Acesso em: 12 mar. 2014.

BAUER, A.W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. **Am J Clin Pathol.**, v.45, p.493-6, 1966.

BIERNE, H.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes* surface proteins: from genome predictions to function. **Microbiol Mol Biol Rev.**, v.71, n.2, p.377-97, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 17, de 18 de junho de 2004. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 21 jun. 2004.

BRASIL. Presidência da República. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Lei Orgânica da Saúde. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 19 set. 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 26, de 9 de julho de 2009. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 jul. 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Mercado Interno. Brasília, 2010. Disponível em: www.agricultura.gov.br/animal/mercado-interno . Acesso em: 09 de out. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Tabela de aditivos antimicrobianos, anticoccidianos e agonistas com uso autorizado na alimentação animal. Brasília, 2008. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/alimentacao>. Acesso em: 23 de fev. 2016.

BRASIL. Presidência da República. Lei nº 11.346, de 15 de setembro de 2006. Lei Orgânica de Segurança Alimentar e Nutricional. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 15 set. 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 10 de jan. 2001a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 13, de 2 de janeiro de 2001. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 2 de jan. 2001b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Relatório do Monitoramento da Prevalência e do Perfil de Susceptibilidade aos Antimicrobianos em Enterococos e Salmonelas Isolados de Carcaças de Frangos Congeladas Comercializadas no Brasil - Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango – PREBAF**. Brasília, 2008. 188 p. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/relatorios/relatorioprebaf.pdf>. Acesso em: 15 mar. 2014.

CARDOSO, T.G.; CARVALHO, V. M. Toxinfecção alimentar por *Salmonella* spp. **Rev Inst Ciências da Saúde.**, v.24, n.2, p. 95-101, 2006.

CAVALCANTI, D.T.B.; ARAÚJO, C.R.; SILVA, C.G.M. **Incidência de *Salmonella* no Brasil: Perigo Eminente a Saúde Humana**. In: X JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX 2010, 2010, Recife.

CDC.CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Multistate outbreak of human *Salmonella* infections linked to live poultry (Final Update). Georgia, 2013a. Disponível em: <http://www.cdc.gov> . Acesso em: 20 mar. 2014.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Outbreak of *Salmonella* Heidelberg infections linked to a single poultry producer — 13 States, 2012–2013. Georgia, 2013b. Disponível em: <http://www.cdc.gov> . Acesso em: 20 mar. 2014.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. CDC Vital Signs – Recipe for Food Safety: protecting people from deadly *Listeria* food poisoning. Georgia, 2013c. Disponível em: <<http://www.cdc.gov>>. Acessado em: 21 de agosto de 2014.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. About antimicrobial resistance: a brief overview. Georgia, 2014. Disponível em: <http://www.cdc.gov> . Acesso em: 26 mai. 2014.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Multistate outbreak of *Salmonella* Agona infections linked to rice and wheat puff cereal (Final Update). Georgia, 2008. Disponível em: < <http://www.cdc.gov>> . Acesso em: 16 set. 2015.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. National antimicrobial resistance monitoring system for enteric bacteria (NARMS). Georgia, 2015a. Disponível em: <www.cdc.gov/narms/> . Acesso em: 29 set. 2015.

CDC. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. National antimicrobial resistance monitoring system for enteric bacteria (NARMS): human isolates (Final Report), 2013. Georgia, 2015b. Disponível em: <www.cdc.gov/narms/reports> . Acesso em: 29 nov. 2015.

CLSI. CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. About CLSI. Pensilvânia, 2015. Disponível em: < <http://clsi.org/about-clsi/> >. Acesso em: 29 set. 2015.

CLSI. CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE . **Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria**. CLSI document M45-A2. Pensilvânia 2010.

CLSI. CLINICAL LABORATORY SATANDARDS INSTITUTE . **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement**. CLSI document M100-S22. Pensilvânia, 2015b.

COLLA, F.L. et al. Isolamento de *Salmonella* Heidelberg em diferentes pontos da tecnologia de abate de frangos de corte. **Arq Inst Biol.**, v.79, n.4, p.603-6, 2012.

CONSOLE, M.P. **Barreiras não tarifárias às exportações agropecuárias Brasileiras para a união europeia**. 2006. 77 f. Monografia (Graduação em Ciências Econômicas) - Deptº de Ciências Econômicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

COOK, R. **Salmonella Brandenburg**. Ministry for Primary Industries – Manatū Ahu Matua. 2015. Disponível em: < www.foodsmart.govt.nz >. Acesso em: 17 set. 2015.

CORRÊA, G.S.S. et al. Utilização de Antibiótico e Probióticos como Promotores de Crescimento na Alimentação de Frangos de Corte. **Rev Universidade Rural.**, v.22, n.2, p.75-81, 2003.

COSTA, R.G. et al. Antimicrobial susceptibility and serovars of *Salmonella* circulating in commercial poultry carcasses and poultry products in Brazil. **J Food Protect**, v.76, n.12, p.2011-17, 2013.

COSTA, G.A.; HOFER, E. **Isolamento e identificação de enterobactérias**. 1972. 120f. (Monografia) Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 1972.

DALKE, V.S. **Análise de resíduos de antibióticos em carne de frango**. 2006. Monografia. Centro Universitário Feevale, Nova Hamburgo, 2006.

D'AOUST, J-Y.; MAURER, J. *Salmonella* Species. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R (Ed.). **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. Washington DC: ASM press, 2007. 3rd Ed. 2007. p. 29-158.

DARWIN, K.H.; MILLER, V.L. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. **Clin Microbiol Rev.**, v.12, n.3, p.405-28, 1999.

DISSO, O.; LECUIT, M. *In vitro* and *in vivo* models to study human listeriosis: mind the gap. **Microb Infect.**, n.15, p.971-80, 2013.

DOGANAY, M. Listeriosis: clinical presentation. **FEMS Immunol Med Microbiol.**, v.35, p.173-5, 2003.

DONKER-VOET, J. A Sorological Study on Some Strains of *Listeria monocytogenes* Isolated in Michigan. **American Journal of Veterinary Research**, v.20, p. 176-179. 1959.

DOUMITH, M. et al. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by Multiplex PCR. **J Clin Microbiol.**, v.42, n.8, p.3819–22, 2004.

EFSA. EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. **Antimicrobial Resistance**. União Europeia, 2015. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/> . Acesso em: 29 set. 2015.

EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. V. 5, valid from 2015-01-01, 2015. Disponível em: <http://www.eucast.org/> . Acesso em: 29 set. 2015.

EUCAST. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST, 2013. Disponível em: <http://www.eucast.org/> . Acesso em: 29 set 2015.

FDA. Food and Drug Administration. FDA finds positive and negative trends in antimicrobial resistance in bacteria isolated from humans, retail meats and food animals. Washington, 2014. Disponível em: <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/CVMUpdates/ucm409035.htm> . Acesso em: 26 nov 2015.

FDA. Food and Drug Administration. Foodborne illness-causing organisms in the U.S. – What you need to know. Disponível em: <http://www.fda.gov> , novembro de 2015. Acesso em: 19 nov. 2015.

FORSYTHE, S. J. Microbiologia da Segurança dos Alimentos – 2ª ed, Artmed, 2013.

GAMBOA-MARÍN, A. et al. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii* and *Listeria* species isolated from swine processing facilities in Colombia. **J Swine Health Prod.**, v.21, n.1, p.10-21, 2013.

GHADAGE, D.P.; BAL, A.M. Isolation of *Salmonella enterica* serotype Worthington from a splenic abscess in a patient with chronic myeloid leukemia. **B J Infect Dis.**, v.6, n.2, p.88-90, 2002a.

GHADAGE, D.P.; BAL, A.M. Isolation of *Salmonella enterica* serotype Worthington from empyema fluid. **Int J Infect Dis.**, v.6, n.4, p.320, 2002b.

GÓMEZ, D. et al. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment. **Food Microbiol.**, v.42, p.61-65, 2014.

GUDBJORNSDÓTTI, B. et al. The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. **Food Microbiol.**, v.21, p.217-225, 2004.

GUIBOURDENCHE, M. et al. Supplement 2003e2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-LeMinor scheme. **Res Microbiol.**, v.161, p.26-9, 2010.

GRAVES, L.M. et al. **Comparison of a multiplex PCR assay and conventional serotyping for sero-classification of *Listeria monocytogenes* isolates in the U.S.A., 2005–2006.** In: PROCEEDINGS OF THE 16TH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON PROBLEMS OF LISTERIOSIS. ISOPOL XVI, 2007, Savannah, GA, poster communication P02.

GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F. **Antigenic formulae of the Salmonella serovars.** 9.ed. Paris: Institut Pasteur, 2007. 166p. Disponível em: http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/salmoms/WKLM_2007.pdf. Acesso em 15 mar. 2016.

HITCHINS, A.D.; JINNEMAN, K. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. In: In: HAMMACK T. (Chair). **Bacteriological Analytical Manual.** New Hampshire: FDA, 2011. Chapter 10. Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm2006949.htm>. Acesso em: 12 mar. 2014.

HOOTON, S.; ATTERBURY, R.J.; CONNERTON, I.F. Application of a bacteriophage cocktail to reduce *Salmonella* Typhimurium U288 contamination on pig skin. **Int J Food Microbiol.**, v.151, p.57-163, 2011.

HUANG, I-F. et al. Clinical manifestations of nontyphoid salmonellosis in children younger than 2 years old – experiences of a tertiary hospital in southern Taiwan. **Pediat Neonatol.**, v.53, p.193-8, 2012.

HUR, J.; JAWALE, C.; LEE, J.H. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. **Food Res Int.**, v.45, p.819-30, 2012.

JAMALI, H.; THONG, K.L. Genotypic characterization and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* from ready-to-eat foods. **Food Control.**, v.44, p.1-6, 2014.

JAY, J. M. Carnes Frescas e Aves. In: JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2005a. p. 75-104.

JAY, J.M. Gastreenterites de Origem Alimentar Causadas por *Salmonella* e *Shigella*. In: JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2005b. p 543-564.

JAY, J. M. Listerioses de Origem Alimentar. In: JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2005c. p. 517-542.

KONEMAN, E.W.; WINN, W. Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (ANTIBIOGRAMA). In: Koneman, E.W. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e atlas colorido**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 940-1014.

LECLERQ, A. et al. Characterization of the novel *Listeria monocytogenes* PCR serogrouping profile IVb-v1. **Int J Food Microbiol.**, v.147, p.74-77, 2011.

LEE, S. et al. Atypical *Listeria monocytogenes* serotype 4b strains harboring a lineage II-specific gene cassette. **Appl Environ Microbiol.**, v.78, n.3, p.661-7, 2012.

LECUIT, M. Human listeriosis and animal models. **Microb Infect.**, v.9, p.1216-25, 2007.

LODDI, M.M. et al. Uso de probiótico e antibiótico sobre o desempenho, o rendimento e a qualidade de carcaça de frangos de corte. **Rev Bras Zootecnia.**, v. 29, n.4, p.1124-31, 2000.

LPSN. LIST OF PROKARIOTIC NAMES WITH STANDING IN NOMENCLATURE. Genus *Salmonella*. Disponível em: <http://www.bacterio.net/salmonella.html> . Acesso em: 20 jan. 2016a.

LPSN. LIST OF PROKARIOTIC NAMES WITH STANDING IN NOMENCLATURE. Genus *Listeria*. Disponível em: <http://www.bacterio.net/listeria.html> . Acesso em: 20 jan. 2016b.

MADEO, M. et al. Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolates from human cases in northern Italy, 2008-2010: MIC determination according to EUCAST broth microdilution method. **J Chemother.**, v.21, n.4, p.201-6, 2015.

MARTINS, I.S. et al. A Cluster of *Listeria monocytogenes* infections in hospitalized adults. **Am J Infect Control.**, v.38, n.9, p. 31-6, 2010.

MATUSCHEK, E.; BROWN, D.F.J.; KAHLMETER, G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. **Clin Microbiol Infect.**, v.20, n.4, p.255-66, 2014.

MENDONÇA, K.S. et al. Genotypic profile of *Listeria monocytogenes* isolated in refrigerated chickens in southern Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciêñ Rural.**, v.46, n.1, p.132-7, 2016.

MEZAL, E. H. et al. Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis from poultry house and clinical samples during 2010. **Food Microbiology.** N. 38, p. 67-74, 2014.

MILLER, T. et al. Epidemiological relationship between *Salmonella* Infantis isolates of human and broiler origin. **Lohmann Information**, v.45, n.2, p.27-31, 2010.

MOR-MUR, M.; YUSTE, J. Emerging bacterial pathogens in meat and poultry: an overview. **Food Bioprocess Tech.**, v.3, n.1, p.24–35, 2010.

NUNES, I.A. et al. Ocorrência de *Salmonella* em carcaças e cortes de frangos comercializados em Goiânia-GO. **Anais da Escola de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade Federal de Goiás**, v.25, p.1-5, 1995.

O' FLANAGAN, D. et al. A multi-country outbreak of *Salmonella* Agona, February-August 2008. **Euro Surveill.**, v. 13, n.33, 2008.

PAMER, E.G. Immune response to *Listeria monocytogenes*. **Nat Rev Immunol.**, v.4, n.10, p.812-23, 2004.

PELLEGRINI, D.C.P. et al. Distribution of *Salmonella* clonal groups in four Brazilian feed mills. **Food Control.**, v.47, p.672-78, 2015.

PERES, N. D. **Detecção de *Listeria monocytogenes* em leite: sensibilidade e especificidade da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).** 2007. 43 f. Dissertação (Mestrado - Escola de Veterinária) – Belo Horizonte: UFMG, 2007.

PONTELLO, M. et al. *Listeria monocytogenes* serotypes in human infections (Italy, 2000-2010). **Ann Ist Super Sanità.** v.48, n.2, p.146-150, 2012.

PRIETO, M. et al. Antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* in Argentina. **Enfer Infecc Microbiol Clin.** v. 34, n. 2, p. 91-95, 2016.

REITER, M.G.R. et al. *Listeria monocytogenes* in refrigerated and frozen chicken parts. **Acta Alimentaria**, v.40, n.1, p.27-31, 2011.

RISTORI, C.A. et al. Prevalence and populations of *Listeria monocytogenes* in meat products retailed in São Paulo, Brazil. **Foodborne Pathog Dis.** v.11, n.12, p.969-73, 2014.

SANTANA, E.S. et al. Uso de antibióticos e quimioterápicos na avicultura. **Rev Enciclopédia Biosfera.** v.7, n.13, p.985-1009, 2011.

SANTOS, E.C. et al. Uso de aditivos promotores de crescimento sobre o desempenho, características de carcaça e bactérias totais do intestino de frangos de corte. **Ciên Agrotec.**, v.29, n.1, p.223-31, 2005.

SARMAH, A.K.; MEYER, M.T.; BOXALL, A.B.A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment. **Chemosphere**, v.65, n.5, p.725-59, 2006.

SHI, W. et al. Prevalence, antibiotic resistance and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from retail ready-to-eat foods in China. **Food Control.**, v.47, p.340-47, 2015.

SHINOHARA, N.K.S. et al. *Salmonella* spp. importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciên Saúde Coletiva.**, v.13, n.5, p.1669-74, 2008.

SWAMINATHAN, B. et al. *Listeria monocytogenes*. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R (Ed.). **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. Washington DC: ASM press, 2007. 3rd Ed. 2007. p. 457–91.

SCHMITZ, V.S.D. **Análise de resíduos de antibióticos em carne de frango**. 2006. 70 f. Monografia (Conclusão do Curso de Nutrição) – Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo, RS, 2006.

TAVECHIO, A.T. et al. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman sources in São Paulo, Brazil, from 1996 through 2000. **J Food Prot.**, v.65, n.6, p.1041–44, 2002.

TERRIER, B.; MARTINEZ, V. Salmonellosis. **EMC-Tratado de Medicina**, v. 10, n. 4, p. 1-6, 2006.

TODD, E.C.D.; NOTERMANS, S. Surveillance of Listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. **Food Control**., v.22, p.1484-90, 2011.

EU. UNIÃO EUROPEIA. Comissão Europeia (CE). Regulamento EC nº. 2073/2005 da comissão de 15 de novembro de 2005, relativo a critérios microbiológicos aplicáveis aos gêneros alimentícios. **Jornal Oficial da União Europeia**, 22 de dezembro de 2005. Disponível em: <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0001:0026:PT:PDF> . Acesso em: 17 nov. 2015.

USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Food Safety and Inspection Service (FSIS). **Food Safety Information – Chicken from farm to table**. 2014b. Disponível em: <<http://www.foodsafety.gov>> . Acesso em: 19 nov. 2015.

USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA). Food Safety and Inspection Service (FSIS). **FSIS Compliance Guideline: Controlling *Listeria monocytogenes* in Post-lethality Exposed Ready-to-Eat Meat and Poultry Products**. 2014a. Disponível em: < <http://www.fsis.usda.gov/>>. Acesso em: 19 nov. 2015.

USDA. UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Food Safety and Inspection Service (FSIS). **FSIS Salmonella Compliance Guidelines for Small and Very Small Meat and Poultry Establishments that Produce Ready-to-Eat (RTE) Products**. 2012. Disponível em: < <http://www.fsis.usda.gov/>> . Acesso em: 19 nov. 2015.

VASCONCELOS, R. M. **Utilização da técnica Multiplex-PCR na diferenciação dos principais grupos de sorovares de *Listeria monocytogenes* isolados de queijo minas frescal**. 2008. 108 f. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária). Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2008.

VASCONCELOS, R.M.et al. Multiplex-PCR Serotyping of *Listeria monocytogenes* isolated from human clinical specimens. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 103, n.8, p. 836-8, 2008.

VOILÀ, M.; TRICHES, D. **A cadeia de carne de frango: uma análise dos mercados brasileiro e mundial de 2002 a 2010**. Publicação do Instituto de Pesquisas Econômicas e Sociais, Universidade de Caxias do Sul, texto n. 44, p. 1-24, janeiro 2013. Disponível em: https://www.uces.br/site/midia/arquivos/TD_44_JAN_2013_1.pdf. Acesso em: 28 abr. 2014.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance – Global Report on Surveillance**. 2014. Disponível em: <http://www.who.int>. Acesso em: 15 set. 2014.

YAN, H. et al. Prevalence and characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes* isolates in Hebei province of Northern China, 2005-2007. **Int J Food Microbiol.**, v.144, p.310-16, 2010.

YÜCEL, N.; CITAK, S.; ÖNDER, M. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey. **Food Microbiol.**, v.22, p.241-45, 2005.
ZHU, J. et al. Prevalence and quantification of *Salmonella* contamination in raw chicken carcasses at the retail in China. **Food Control.**, v.44, p.198-202, 2014.

ZUANON, J.A.S.; FONSECA, J. B.; ROSTAGNO, H. S.; Silva, M. A. Efeito de promotores de crescimento sobre o desempenho de frangos de corte. **Rev Bras Zootecnia.**, v.27, n.5, p.999-1005, 1998.