



Agência Nacional de Vigilância Sanitária

RELATÓRIO DE PESQUISA EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA DE ALIMENTOS

Monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil

PROGRAMA NACIONAL DE
MONITORAMENTO DA
PREVALÊNCIA E DA RESISTÊNCIA
BACTERIANA EM FRANGO -
PREBAF

Gerência Geral de Alimentos
Gerência Geral de Laboratórios
de Saúde Pública

www.anvisa.gov

Brasília, 2012



AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA

Diretor-Presidente

Dirceu Brás Aparecido Barbano

Diretores

Jaime Cesar de Moura Oliveira

José Agenor Álvares da Silva

Maria Cecília Martins Brito

Agenor Álvares

Coordenação Geral do PREBAF:

Gerente-Geral de Alimentos

Denise de Oliveira Resende

Gerente de Ações de Ciência e Tecnologia de Alimentos
(Até 2009)

Lucas Medeiros Dantas

Coordenação Técnica do PREBAF:

1. Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
– INCQS/FIOCRUZ (Até abril/2005)
2. Gerência Geral de Laboratórios de Saúde
Pública/Anvisa
(A partir de maio/2005)

APRESENTAÇÃO

O presente relatório foi elaborado pela Gerência Geral de Alimentos – GGALI/ANVISA que contou com a colaboração de especialistas da Gerência Geral de Laboratórios de Saúde Pública – GGLAS/ANVISA, do Instituto Oswaldo Cruz da Fundação Oswaldo Cruz - IOC/FIOCRUZ, do Instituto Adolfo Lutz - IAL/SP e da Universidade de Brasília em sua redação. O documento aborda diversos aspectos de análise de risco no contexto do Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango – PREBAF, implementado entre 2004 e 2006 numa exitosa parceria com as Vigilâncias Sanitárias Estaduais e Laboratórios Centrais de Saúde Pública de vários estados, como parte do conjunto de estratégias de ação definidas pela Anvisa para a área de alimentos.

Incumbe à Anvisa, por Lei, regulamentar, controlar e fiscalizar os produtos e serviços que envolvam risco à saúde pública, tais como alimentos, inclusive bebidas, águas envasadas, seus insumos, suas embalagens, aditivos alimentares, limites de contaminantes orgânicos, resíduos de agrotóxicos e de medicamentos veterinários. Estes últimos, em especial os antimicrobianos, quando usados em animais de produção de alimentos com fins terapêuticos, profiláticos ou como aditivos nas rações, passam a ser alvo de avaliação de risco em todo o mundo, tanto pelos resíduos dessas substâncias que podem ficar nos produtos de consumo, como pela possibilidade do seu uso vir contribuir para a disseminação da resistência microbiana.

O Codex Alimentarius, organismo formado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), principal referência internacional em normas sobre segurança de alimentos, tem encorajado os países membros, a exemplo do Brasil, a desenvolverem programas de vigilância e controle sobre o tema acima, num esforço mundial para reduzir a resistência microbiana aos antimicrobianos, tanto na medicina veterinária quanto humana. Dada a relevância do assunto, em 2005 foi aprovado pela Comissão do Codex Alimentarius um “Código de Práticas para Minimizar e Conter a Resistência Antimicrobiana”, alertando-se para as responsabilidades específicas que têm a indústria farmacêutica, produtores, distribuidores, autoridades regulatórias e profissionais que atuam como responsáveis técnicos.

Nesse contexto um passo importante foi dado com a implementação do Prebaf a partir de amostras de carcaças congeladas de frango colhidas no comércio, com uma cobertura significativa em relação as áreas de produção e consumo do alimento em questão. Nele foram gerados dados de pesquisa em vigilância sanitária até então inexistentes e suas conclusões e recomendações apontam para a necessidade de mais aporte de recursos da Agência, visando replicar o monitoramento de Salmonellas com um novo enfoque e estender a pesquisa para outras bactérias com forte envolvimento em contaminações microbiológicas de alimentos, como Campylobacter e Listerias.

Maria Cecília Martins Brito
Diretora da Anvisa

RESUMO

Este é um documento técnico-científico que traz não só o resultado de uma ação planejada de monitoramento em vigilância sanitária relacionada com o risco microbiológico atribuído ao consumo de frango, como também uma abordagem sobre o problema da resistência microbiana traduzida em uma pesquisa sobre o perfil de resistência de *Salmonella* spp. e *Enterococcus* spp. a vários antimicrobianos utilizados na atividade avícola, sendo essas duas bactérias, dentre outras, consideradas como de eleição para programas de vigilância e monitoramento sobre o tema.

Esse trabalho é uma apresentação do Prebaf em toda a sua dimensão, cuja implementação se deu em etapas, ou seja: Etapa 1: Definição das metodologias ou dos Procedimentos Operacionais Padrão (POPs); Etapa 2: Elaboração do Manual de Procedimentos; Etapa 3: Treinamento de VISA e LACEN; Etapa 4: Colheita de amostras e análises laboratoriais; e; Etapa 4: Relatório final. Durante o período de execução ocorreram várias avaliações parciais com a participação da equipe envolvida em todos os níveis.

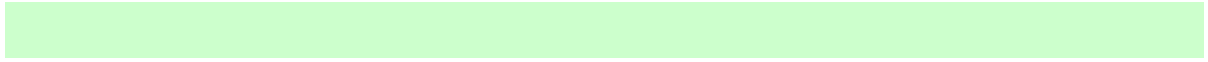
Antes de se entrar nas informações detalhadas sobre o Prebaf e seus resultados, o relatório traz uma contextualização técnica das características gerais e epidemiológicas de salmonela e enterococos ou *Salmonella* spp. e *Enterococcus* spp., seus mecanismos de resistência antimicrobiana e as consequências para a saúde humana.

Foi definida como matriz de análise, carcaças de frango congeladas colhidas no comércio. Outro aspecto abordado pelo trabalho foi a verificação da adequação da rotulagem de frango em relação à RDC n° 13, de 02/01/01. Os resultados apresentados indicam uma baixa prevalência de salmonela, alta prevalência de enterococos, ocorrência de resistência dessas bactérias a vários antimicrobianos e que a maioria dos estabelecimentos produtores já se adequaram a rotulagem.

O estudo foi conduzido em 14 Estados, num total de 2.710 unidades amostrais de frango analisadas no período de 2004 a 2006, e traça um perfil preliminar da resistência bacteriana aos antimicrobianos utilizados na produção de frango. Em relação a *Salmonella* spp., foi encontrada uma prevalência média de 3,03%, um total 250 cepas foram submetidas a análise de caracterização antigênica, chegando-se a 18 sorovales isolados, destacando-se maior frequência para *S. Enteritidis* em 48,8% das cepas, 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.

Quanto aos enterococos, 98,7% amostras foram positivas para esta bactéria e um total de 8.188 colônias foram submetidas a análise de identificação de espécie e do perfil de resistência. Entre as diferentes espécies já descritas no gênero

Enterococcus, doze delas puderam ser identificadas entre colônias caracterizadas, contudo, pode-se observar que houve uma predominância de quatro espécies, uniformemente distribuídas entre as cinco regiões: *E. faecalis* (61,4%), *E. gallinarum* (28,7%), *E. casseliflavus* (5,06%) e *E. faecium* (2,2). Foram avaliadas 262 (42%) amostras quanto ao perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, encontrando-se vários níveis de resistência à alguns antibióticos de importância na medicina humana.



ÍNDICE

	página
Introdução	13
PARTE I - Características gerais e epidemiologia de <i>Salmonella</i> spp. e <i>Enterococcus</i> spp.---	15
I - Gênero <i>Salmonella</i> spp.	15
1. Características gerais, nomenclatura e classificação	15
2. Habitat natural	17
3. Características clínicas e patogenia	18
4. <i>Salmonella</i> spp. em alimentos	18
II - Gênero <i>Enterococcus</i> spp.	21
1. Características gerais, nomenclatura e classificação	21
2. Habitat natural	24
3. Características clínicas e patogenia	25
4. <i>Enterococcus</i> spp. nos alimentos	26
III. Resistência microbiana	27
1. Características gerais e conceitos	27
2. Mecanismos de resistência	28
3. Consequências para a saúde humana	29
4. <i>Salmonella</i> spp. e resistência aos antimicrobianos	30
5. Caracterização dos genes de resistência	33
6. Uso de técnicas fenotípicas e genotípicas para rastreamento de <i>Salmonella</i> spp.	34
7. <i>Enterococcus</i> spp. e resistência aos antimicrobianos	35
PARTE II: Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango – Prebaf	42
1. Histórico	42
2. Informações técnicas	43
3. Objetivos	44
3.1. Geral	44
3.2. Específicos	44

4 - Material e Métodos -----	44
4.1. Plano amostral -----	44
4.1.1. Cobertura e período de execução -----	44
4.1.2. Número e tipo de amostras -----	45
4.2. Procedimentos de amostragem e de análise -----	46
4.3. Plano de análise de salmonelas -----	48
4.3.1. Recebimento das amostras -----	48
4.3.2. Reisolamento e identificação bioquímica -----	48
4.3.3. Caracterização antigênica -----	48
4.3.4. Fagotipagem -----	49
4.3.5. Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos -----	49
4.3.6. Detecção de genes de resistência em Salmonela -----	50
4.4. Plano de análise de Enterococos -----	52
4.4.1. Recebimento das amostras -----	52
4.4.2. Identificação -----	52
4.4.3. Ensaio de determinação -----	52
4.4.4. Caracterização genética -----	52
5 – Resultados e discussão -----	53
5.1 Resultado consolidado dos estados (Visa e Lacen) -----	53
5.2. Análises específicas realizadas pelos laboratórios de referência – IOC e IAL/SP -----	56
5.2.1 Salmonela -----	56
5.2.2 Enterococos -----	86
6 – Conclusões -----	97
7 – Recomendações -----	98
8 – Bibliografia -----	99

ANEXOS

Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango – Prebaf – Equipe Técnica -----	165
Lista dos participantes do Prebaf – por Estado -----	166

QUADROS, TABELAS E FIGURAS

	Página
Quadro 1. Distribuição do número de sorovares por espécie	15
Quadro 2. Características diferenciais de espécies e subespécies de <i>Salmonella</i> spp.	16
Quadro 3. Características fenotípicas utilizadas para a identificação presuntiva de <i>Enterococcus</i> spp. e gêneros relacionados	23
Quadro 4. Características fenotípicas utilizadas para a identificação das espécies de <i>Enterococcus</i> e gêneros relacionados	24
Quadro 5. Número de amostras em função da prevalência de resistência esperada na população	46
Quadro 6. Antimicrobianos utilizados na determinação da Concentração Inibitória Mínima	50
Quadro 7. <i>Primers</i> empregados para a caracterização dos genes de resistência	51
Tabela 1. Emissão de laudos e análise de rotulagem das 542 amostras de carcaças de frango analisadas pelos LACEN participantes	62
Tabela 2. Estados produtores que foram notificados para adequação da rotulagem conforme RDC nº 13/2001	63
Tabela 3. Avaliação da presença de <i>Salmonella</i> spp. de um total de 2.710 unidades amostrais de carcaças de frango congeladas analisadas pelos LACEN participantes	64
Tabela 4. Avaliação da presença de <i>Enterococcus</i> spp. a partir do meio de cultura Agar Enterococcosel sem vacomicina e com 6µg/ml de vancomicina de um total de 2.707 unidades amostrais de carcaças de frango congeladas analisadas pelos LACEN participantes	65
Tabela 5. Frequência e distribuição das cepas de <i>Salmonella</i> spp. confirmadas bioquimicamente e antigenicamente de acordo com o laboratório	
Tabela 6. Distribuição de <i>Salmonella</i> spp. de acordo com o ano de isolamento	68
Tabela 7. Distribuição de <i>Salmonella</i> spp. de acordo com os estados produtores e consumidores	69
Tabela 8. Distribuição dos fagotipos das <i>S. Enteritidis</i> identificados	71
Tabela 9. Distribuição dos fagotipos identificados em <i>S. Typhimurium</i>	71
Tabela 10. Frequência e distribuição dos marcos de resistência nos isolados de <i>Salmonella</i> spp.	75
Tabela 11. Distribuição dos sorovares de <i>Salmonella</i> spp. de acordo com a resistência a diferentes classes de antimicrobianos	78
Tabela 12. Perfis de multirresistência mais frequentes de 131 (52,4%) cepas de <i>Salmonella</i> spp.	80
Tabela 13. Compatibilidade dos perfis de multirresistência entre diferentes sorovares de <i>Salmonella</i> spp.	82
Tabela 14. Resistência aos antimicrobianos detectada entre 175 cepas pertencentes aos sorovares mais frequentes	83
Tabela 15. Perfis de multirresistência em <i>S. Enteritidis</i> detectados nos diferentes estados produtores	86
Tabela 16. Perfis de resistência a genes detectados de <i>S. Heidelberg</i>	101
Tabela 17. Perfis de resistência, fagotipos e genes detectados em <i>S. Enteritidis</i>	102

Tabela 18. Perfis de resistência, fagotipos e genes detectados em <i>S. Typhimurium</i>	103
Tabela 19. Perfis de resistência e genes detectados em <i>S. Infantis</i>	103
Tabela 20. Número de colônias do gênero <i>Enterococcus</i> encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz, no período 2004 a 2006, pelos LACEN para caracterização fenotípica	105
Tabela 21. Distribuição das espécies de <i>Enterococcus</i> identificadas no Instituto Adolfo Lutz, no período de 2004 a 2006 (continua)	106
Tabela 21a. Distribuição das espécies de <i>Enterococcus</i> identificadas no Instituto Adolfo Lutz, no período de 2004 a 2006 (continuação).	106
Tabela 22. Distribuição por região geográfica das espécies identificadas do Gênero <i>Enterococcus</i> identificadas pelo Instituto Adolfo Lutz no período de 2004 a 2006 (continua)	107
Tabela 22a: Distribuição por região geográfica das espécies identificadas do Gênero <i>Enterococcus</i> identificadas pelo Instituto Adolfo Lutz no período de 2004 a 2006 (continuação)	107
Tabela 23. Distribuição do perfil de susceptibilidade antimicrobiana das 2.135 colônias de <i>Enterococcus spp.</i> , considerando os estados produtores de carne de frango congelada para consumo humano (continua)	111
Tabela 23a. Distribuição do perfil de susceptibilidade antimicrobiana das 2.135 colônias de <i>Enterococcus spp.</i> considerando os estados produtores de carne de frango congelada para consumo humano (continuação)	112
Tabela 13b. Distribuição do perfil de susceptibilidade antimicrobiana das 2.135 colônias de <i>Enterococcus spp.</i> considerando os estados produtores de carne de frango congelada para consumo humano (continuação)	113
Figura 1. Órgãos de vigilância sanitária que coletaram amostras para execução do Prebaf. 2004-2006.	45
Figura 2. Frequência de marcas comercializadas em cada estado e que foram analisadas pelos respectivos Lacen	55
Figura 3. Distribuição numérica de <i>Salmonella spp.</i> de acordo com o estado produtor	61
Figura 4. Frequência dos marcadores de resistência nas 250 cepas de <i>Salmonella spp.</i> no período de 2004 a 2006	67
Figura 5. Distribuição numérica de <i>Salmonella spp.</i> de acordo com a resistência a diferentes classes de drogas	69
Figura 6. Distribuição numérica de <i>Salmonella spp.</i> multirresistente a diferentes classes de antimicrobianos	69
Figura 7. Distribuição dos marcadores de resistência nos sorovares mais frequentes de <i>Salmonella spp.</i>	74
Figura 8. Distribuição dos marcadores de resistência antimicrobiana nos sorovares prevalentes de <i>Salmonella spp.</i>	75
Figura 9. Amplificação por PCR de gene <i>cmv</i>	85
Figura 10. Amplificação por PCR de gene <i>ctx</i>	85
Figura 11. Distribuição do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de 2.136 colônias de <i>Enterococcus spp.</i> recebido pelo IAL, no período de 2004 a 2006 (VC, vancomicina; TC, teicoplanina; GN, gentamicina; ST, estreptomicina; AM, ampicilina; TT, tetraciclina; EI, eritromicina; CL, clindamicina; C, cloranfenicol; LZ, linezolida; QDA, quinupristina-dalfopristina)	89
Figura 12. Distribuição do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das 1.501 colônias de <i>E. faecalis</i> avaliadas pela técnica da determinação da concentração inibitória	90

mínima (CIM) para 11 antimicrobianos (VC, vancomicina; TC, teicoplanina; GN, gentamicina; ST, estreptomicina; AM, ampicilina; TT, tetraciclina; EI, eritromicina; CI, clindamicina; CL, cloranfenicol; LZ, linezolida; QDA, quinupristina-dalfopristina)

Figura 13. Distribuição do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das 82 colônias de *E. faecium* avaliadas pela técnica da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para 11 antibióticos (VC, vancomicina; TC, teicoplanina; GN, gentamicina; ST, estreptomicina; AM, ampicilina; TT, tetraciclina; EI, Eritromicina; CI, clindamicina; CL, cloranfenicol; LZ, linezolida; QDA, quinupristina-dalfopristina) 90

Figura 14 Distribuição do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das 400 colônias de *E. gallinarum* avaliadas pela técnica da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para 11 antibióticos (VC, vancomicina; TC, teicoplamina; GN, gentamicina; ST, estreptomicina; AM, ampicilina; TT, tetraciclina; EI, eritromicina; CI, clindamicina; CL, cloranfenicol; LZ, linezolida; QDA, quinupristina-dalfopristina) 91

Figura 15. Distribuição do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das 106 colônias de *E. casseliflavus* avaliadas pela técnica da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para 11 antibióticos (VC, vancomicina; TC, teicoplamina; GN, gentamicina; ST, estreptomicina; AM, ampicilina; TT, tetraciclina; EI, eritromicina; CI, clindamicina; CL, cloranfenicol; LZ, linezolida; QDA, quinupristina-dalfopristina) 91

LISTA DE ABREVIATURAS

Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DTA – Doenças Transmitidas por Alimentos

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations

g/t – gramas / tonelada

IAL – Instituto Adolfo Lutz

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

Lacen – Laboratórios Centrais de Saúde Pública

Mapa – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MIC ou CIM – Concentração Inibitória Mínima

OIE – Organização Mundial para Saúde Animal

PBP – Proteínas Ligadoras de Penicilina

POF – Pesquisa de Orçamentos Familiares

RDC – Resolução de Diretoria Colegiada

TGI – Trato gastrointestinal

UF – Unidades Federadas

UFC/g – Unidade Formadora de Colônia/ grama

Visa – Vigilâncias Sanitárias Estaduais

VRE – Vancomycin-resistant Enterococci

PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS PADRÃO (POP)

	Página
POP-001 GICRA/GGALI – Colheita de carcaças congeladas de frango -----	109
POP-65.3210.043 – Recepção e processamento inicial de amostras de carcaças congeladas de frango e emissão de laudo -----	111
POP-65.3210.044 – Pesquisa e contagem de <i>Salmonella</i> spp em carcaças congeladas de frango -----	119
POP s/nº IAL/SP – Detecção de Enterococos em carcaças de frango congeladas-----	136
POP-ASMI 5-01 IAL/SP – Manutenção de cepa de Enterococos para ser enviada ao laboratório de referência -----	147
POP-PSMIB 2-01 IAL/SP – Transporte de substâncias infecciosas para o laboratório de referência (território nacional) -----	153
POP s/nº LABENT/IOC – Encaminhamento das cepas de <i>Salmonella</i> spp, para caracterização antigênica e avaliação da suscetibilidade antimicrobiana -----	158

INTRODUÇÃO

Entre os patógenos que são reconhecidos pela OMS como os mais significativos em termos de impacto a saúde das populações e que podem ser utilizados como indicadores da qualidade dos alimentos estão incluídas as salmonelas, os enterococos, e os coliformes. Corroborando isso, organismos internacionais como a FAO, OMS, OIE e Codex Alimentarius, vêm discutindo amplamente o impacto à saúde pública resultante do uso de agentes antimicrobianos em animais de produção. Um exemplo foi a aprovação pela Comissão do Codex Alimentarius de um código internacional de práticas para minimizar e conter a resistência antimicrobiana¹. Esse documento traz diretrizes sobre o uso responsável e prudente dessa classe de medicamentos, bem como recomendações aos governos, encorajando-os a implantar seus próprios programas de monitoramento e vigilância ante à relevância do problema.

No Brasil são observadas flutuações na qualidade dos alimentos devido às dimensões continentais do país, que dificultam o amplo conhecimento sobre a circulação e o seu real impacto na disseminação de microrganismos patogênicos. Acrescenta-se ainda sua configuração geoclimática, a qual permite um amplo espectro de produção de alimentos de origem animal e vegetal, dificultando o conhecimento a respeito da veiculação de patógenos. Nessas circunstâncias, podem ocorrer situações de risco em virtude das complexas operações de transporte, armazenamento, comercialização e heterogeneidade das condições observadas em todas as regiões do país.

Entre os alimentos de origem animal, a produção de aves no Brasil ocupa o primeiro lugar no mundo (UBA, 2008). De acordo com dados da FAO, no período de 1993 a 2003, a produção de frango cresceu 146%, enquanto a de suínos, apenas 22% e a de bovinos, 56,5%. Esse maior crescimento na produção de frango em relação a carne de outras espécies deu-se em decorrência da queda dos preços no mercado. Atualmente o Brasil ainda continua sendo o terceiro maior produtor de carne de frango, onde, em 2006, produziu 10.035 mil toneladas, perdendo para China e Estados Unidos onde os mesmos produzem 10.350 e 16.233 mil toneladas respectivamente. Entretanto, nas exportações o Brasil assumiu o primeiro lugar em 2006 com 2.900 mil toneladas de carne de frango exportadas (ANUALPEC, 2006)

Com a tarefa de avaliar o impacto à saúde pública associado ao uso de medicamentos veterinários em animais de produção, foi criado um Grupo de Trabalho (RDC Anvisa Nº 05/2000), que contou com a participação do MAPA e de setores organizados da sociedade civil, incluindo a indústria farmacêutica veterinária, universidades e institutos de pesquisa, órgãos estaduais de vigilância sanitária e laboratórios oficiais de saúde pública.

¹ CAC/RCP 61-2005, <http://www.codexalimentarius.net/search/advancedsearch.doc>

Um dos eixos das recomendações deste grupo esteve voltado à questão da resistência aos antimicrobianos e a necessidade de implementação de um projeto para o monitoramento e vigilância de bactérias isoladas a partir de alimentos de origem animal. Nesse particular, a Anvisa houve por bem implantar o “Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango – Prebaf”, cujos resultados constam deste relatório.

Posteriormente, os padrões microbiológicos de alimentos no Brasil foram estabelecidos pela Resolução – RDC Anvisa Nº 12/2001. No entanto, esse regulamento técnico não fixou o parâmetro de *Salmonella* spp em carnes *in natura* de aves (ausência em 25 gramas), até que fosse implementado um programa de monitoramento e vigilância capaz de determinar a prevalência de *Salmonella* spp. no alimento em questão. Através da Resolução – RDC Anvisa Nº 13/2001 foi exigida, na rotulagem de carnes de aves embaladas, instruções para o consumidor sobre o adequado preparo, conservação e uso desses produtos, visando prevenir surtos de salmonelose.

Com o propósito de buscar subsídios para a definição de medidas de intervenção, o Prebaf foi iniciado em agosto de 2004 numa parceria entre Anvisa, VISA e LACEN de 14 UF. O Programa realizou um diagnóstico, com metodologias padronizadas, sobre a prevalência e o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de *Enterococcus* spp e *Salmonella* spp, bem como a quantificação desta última, isolados a partir de carcaças congeladas de frango comercializadas no Brasil. Essa análise verificou ainda a adequação dos dizeres de rotulagem às exigências da Resolução – RDC Anvisa Nº 13/2001.

Na sua implementação o Prebaf contou com o envolvimento de uma equipe multidisciplinar composta pela Anvisa, o IOC/FIOCRUZ e o IAL/SP, e as VISA e os LACEN de Alagoas, Amapá, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Minas Gérias, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo (capital e Ribeirão Preto).

Com vistas a facilitar a exposição do tema, bem como sua compreensão, este relatório foi subdividido em: características gerais e epidemiologia de *Salmonella* e *Enterococcus*; descrição de todas as etapas do Prebaf, que vão desde os objetivos do programa aos seus resultados; discussão, conclusões e recomendações.

PARTE I
CARACTERÍSTICAS GERAIS E EPIDEMIOLOGIA DE
Salmonella spp. E *Enterococcus* spp.

I - GÊNERO *SALMONELLA*

1. CARACTERÍSTICAS GERAIS, NOMENCLATURA E CLASSIFICAÇÃO:

O gênero *Salmonella* foi inicialmente caracterizado em 1885, tendo sua denominação em homenagem ao patologista Daniel Salmon. Pertencente à família Enterobacteriaceae, são bastonetes Gram negativos, geralmente móveis, formam ácido e gás à partir da glicose, excetuando-se os sorovares *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* (imóveis e $\leq 5\%$ produzem gás). Apresentam ainda como características metabólicas bem definidas a capacidade de descarboxilação da lisina, produção de gás sulfídrico e utilização do citrato como fonte única de carbono.

Sua nomenclatura, baseada na homologia do DNA, efetivou a inclusão do gênero *Arizona* e atualmente, com base em características fenotípicas, o gênero é dividido em três espécies e seis subespécies ou subgêneros, *S. entérica* (subespécies *entérica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*), *S. bongori* e *S. subterranea*.

Em cada subespécie é reconhecido diferente número de sorovares tendo por base a caracterização de seus antígenos somáticos (O) e flagelares (H), perfazendo atualmente ≥ 2.500 sorovares. Entre as espécies, a subespécie *S. enterica* apresenta maior número de sorovares, sendo responsável por 99% dos isolamentos do gênero, usualmente de animais de sangue quente (**Quadro 1**).

Quadro 1. Distribuição do número de sorovares por espécie (Popoff & Lê Minor, 2001).

Espécies	<i>S. enterica</i>						<i>S. bongori</i>	<i>S. subterranea</i>
Subespécies	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	<i>indica</i>		
Sorovares	1490	500	94	329	72	12	22	?

Em 2002 foram incluídos 18 novos sorovares reconhecidos pelo WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, sendo doze pertencentes a *S. enterica* subespécie *entérica*, dois as subespécies *salamae* e *diarizonae*; um as subespécies *houtenae* e a *S. bongori*. Mais recentemente uma nova espécie, ***S. subterranea***, foi isolada a partir de sedimento subterrâneo e validada em 2005.

As características bioquímicas que permitem diferenciar as distintas subespécies dentro da espécie *enterica* e as espécies *S. bongori* e *S. subterranea* são

apresentadas no **Quadro 2**. entretanto os sorovares *S. Typhi* e *S. Paratyphi A*, pertencentes a subespécie enterica, apresentam algumas características diferenciais aqui não apontadas.

Quadro 2. Características diferenciais de espécies e subespécies de *Salmonella* (Le Minor et al. 1986).

Características	<i>S.enterica</i>						<i>S.bongori</i>	<i>S.subterranea</i>
	<i>enterica</i>	<i>salamae</i>	<i>arizonae</i>	<i>diarizonae</i>	<i>houtenae</i>	<i>Indica</i>		
Dulcitol	+	+	-	-	-	d	+	+
ONPG(2h)	-	-	+	+	-	d	+	+
Malonato	-	+	+	+	-	-	-	-
Gelatinase	-	+	+	+	+	-	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+	-
Crescimento KCN	-	-	-	-	+	-	+	+
L(+)Tartarato ^(a)	+	-	-	-	-	-	-	+ ^c
Galacturonato	-	+	-	+	+	+	+	ND
γ-glutamyl transferase	+ ^(b)	-	+	+	+	+	+	ND
β-glucuronidase	D	D	-	+	-	d	-	ND
Mucato	+	+	+	- (70%)	-	+	+	ND
Salicina	-	-	-	-	+	-	-	ND
Lactose	-	-	- (75%)	+ (75%)	-	d	-	-
Lise-fago O ₁	+	+	-	+	-	+	D	ND
Habitat normal	Animais de sangue quente		Animais de sangue frio e meio ambiente					?

a: d-tartarato

b: *S.Typhimurium* (d), *S.Dublin* (-)

c: cresce sem produção de ácido

D: diferentes reações (sorovares)

ND: Não determinado

+: ≥90% positivas

-: ≥90% negativas

2. HABITAT NATURAL

Podem ser divididas em três categorias, com base na especificidade do hospedeiro e padrão clínico por eles determinado: **salmonelas altamente adaptadas ao homem**, incluindo *S. Typhi* e *S. Paratyphi* A, B e C, agentes da febre entérica (febre tifóide e paratifóide); **salmonelas altamente adaptadas aos animais**, representadas por *S. Dublin* (bovinos), *S. Choleraesuis* e *S. Typhisuis* (suínos), *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* (aves), responsáveis pelo paratifo dos animais. Contudo, em particular os sorovares *S. Dublin* e *S. Choleraesuis*, podem provocar no homem em determinadas situações (idade jovem, idosos, pacientes com doenças crônicas e imunocomprometidos), um quadro septicêmico, i.é., mais grave do que o causado por *S. Typhi* (Lax *et al.*, 1995).

A terceira categoria inclui a maioria dos sorovares que atingem indiferentemente o homem e animais, designadas **salmonelas zoonóticas**, as quais são responsáveis por quadro de gastroenterite (enterocolites) ou Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA). Sua distribuição é mundial, sendo os alimentos os principais veículos de sua transmissão. São responsáveis por significantes índices de morbidade e mortalidade, tanto nos países emergentes como desenvolvidos, determinando pequenos e grandes surtos envolvendo, principalmente, o consumo de alimentos de origem animal como ovos, aves, carnes e produtos lácteos.

Na epidemiologia da doença humana há predomínio de somente poucos sorovares, alguns se mantendo disseminados em estágio contínuo (*S. Typhimurium*), ou se apresentando como emergentes como *S. Hadar*, *S. Heidelberg*, *S. Infantis* e *S. Enteritidis* (Khakhria *et al.*, 1997; Caffer *et al.*, 1997; Mansuy & Schlegel, 1997; Velge *et al.*, 2005).

Duas maiores mudanças na epidemiologia das salmoneloses não tifóides na Europa e Estados Unidos ocorreram na segunda metade do século XX: a emergência de infecções humanas de origem alimentar, determinadas por *S. Enteritidis* e a multirresistência a antimicrobianos em cepas de *S. Typhimurium* (Rabsch *et al.*, 2001; O'Brien, 2002).

No Brasil, também se constatou a prevalência no número de *S. Enteritidis* isolados durante 1991-1995 em fontes humanas e não-humanas, particularmente em ovos, aves (matrizes), amostras ambientais e matérias-primas de ração comercial (Reis, 1994; Tavechio *et al.*, 1996, Hofer *et al.* 1997 e 1998, Seki, 2000). Esta condição vem sendo apontada por Rodrigues (2000 a 2006) através de relatórios encaminhados anualmente à Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB/DEVEP/SVS/MS), bem como a Organização Panamericana de Saúde de 1999 a 2003, apontando o aumento na incidência de diferentes sorovares de *Salmonella* spp em nosso meio.

3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E PATOGENIA

A dose infectante varia de 10^5 a 10^8 células, porém em pacientes imunocomprometidos têm sido observadas doses $\leq 10^3$ células para alguns sorovares, envolvidos em surtos de DTA. A manifestação clínica inclui quadros entéricos agudos ou crônicos, além de localização extra intestinal, como infecções septicêmicas, osteomielite, artrite, hepatite, etc. Alguns sorovares são reconhecidos por seu potencial patogênico como *S. Typhimurium*, o qual além do quadro gastrintérico pode determinar infecção septicêmica nos animais jovens e no homem, enquanto *S. Infantis* e *S. Agona* estão altamente envolvidas em infecções graves em crianças (Fonseca *et al.*, 2006).

Os microrganismos penetram por via oral invadindo a mucosa intestinal, com disseminação para a submucosa, resultando em enterocolite aguda. Normalmente o quadro diarréico é moderado, sem a presença de sangue, entretanto, em alguns quadros clínicos, pode ocorrer perda de pequeno volume de fezes associado a tenesmo e sangue.

Seu transporte, através do sistema retículo-endotelial e a capacidade de multiplicação no interior dos macrófagos, possibilitam sua manutenção e disseminação no organismo. Indivíduos subnutridos ou com deficiências do sistema imune podem apresentar infecções de extrema gravidade, como por exemplo, a incidência de bacteremia em pacientes aidéticos, dos quais 20 a 60% relatam infecção gastrintestinal prévia (Lax *et al.* 1995).

Sua virulência é multifatorial, incluindo mobilidade, habilidade de penetrar e replicar nas células epiteliais, resistência à ação do complemento, produção de entero, cito e endotoxina, sendo desconhecido o exato papel de cada um, para a manifestação da doença. Em alguns sorovares a virulência é mediada por um plasmídeo, em uma região do operon de 8Kb que contém os genes *spvR ABCD*, cuja origem ainda encontra-se desconhecida (Libby *et al.* 2000, Oliveira *et al.* 2003). A relação entre a presença deste plasmídeo de virulência e sorovar já se encontra bem estabelecida em *S. Dublin*, *S. Gallinarum* e *S. Choleraesuis* (Rotger & Casadesús, 1999).

4. SALMONELLA EM ALIMENTOS:

A salmonelose é uma das zoonoses mais complexas em sua epidemiologia e controle, cujos padrões diferem de uma região para outra. Isto se deve a diferenças nos hábitos alimentares, práticas de elaboração de alimentos, criação de animais e padrões de higiene e saneamento. Seu controle é um trabalho árduo, tendo em vista a emergência de novos sorovares e a reemergência de outros em determinadas áreas, tanto nos países emergentes quanto naqueles industrializados (OMS, 1988).

Qualquer alimento que contém *Salmonella* é um risco potencial para o consumidor, cuja veiculação é facilitada, na atualidade, pela mudança nos hábitos alimentares da população. A necessidade cada vez mais intensa de produção/oferta de alimentos tem como fatores de risco, falhas quanto ao manuseio, transporte muitas vezes em condições inadequadas, aliados à ausência de critérios básicos de higiene e saneamento, os quais favorecem a disseminação (OMS, 1988).

Considerando que sua principal via de transmissão está na cadeia alimentar, sua presença em animais, criados com objetivo comercial, aponta este microrganismo como o mais incidente e relevante agente etiológico de enteroinfecções. Isto resulta em milhões de dólares em perdas para a indústria, particularmente de bovinos, suínos e aves, tanto para o mercado interno quanto para exportação, onde em alguns países, a rigidez na inspeção representa uma necessidade constante de qualidade (Jay, 2000; Humphrey, 2000).

Particularmente nas aves, a transmissão de *Salmonella* pode ser do tipo vertical ou horizontal. Por séculos o consumo de ovos sem cocção era uma prática comum do homem, porém na atualidade o reconhecimento, a partir de diferentes surtos, determinados pelo sorovar *S. Enteritidis* e mais recentemente outros sorovares (*S. Heidelberg*, *S. Agona* e *S. Virchow*) levaram ao reconhecimento de sua capacidade de transmissão transovariana, levando a disseminação para o homem através de alimentos onde são utilizados sem a devida cocção, como tortas, maioneses, omeletes e etc (White *et al.* 2006).

A transmissão horizontal envolve todos os sorovares, os quais apresentam características ubíquas, pode ocorrer através do meio ambiente, onde roedores assumem o papel de portadores assintomáticos, por longos períodos (>10 meses) disseminando tais microrganismos entre diferentes áreas. Outra via, a qual ainda é objeto de especulação está representada pelas rações. Embora, na literatura nacional, durante o século XX entre as décadas de 80 e 90, seja apontada ausência dos sorovares adaptados às aves em rações ou suas matérias primas de origem animal, algumas medidas têm sido adotadas pelos criadores, no sentido de minimizar possíveis contaminações, tendo em vista a impossibilidade de sua eliminação total (In: Back *et al.* 2006).

Os produtos agrícolas não processados, como hortaliças, frutas e os alimentos de origem animal, como carnes cruas, leite e ovos, são veículos frequentes de salmonelas. A contaminação de origem fecal é geralmente a fonte para os produtos agrícolas, pela exposição à água contaminada; para o leite e ovos, através da exposição direta e para a carne, usualmente durante as operações de abate (OMS, 1988).

A carne de aves tem se convertido em um alimento amplamente consumido mundialmente e em países emergentes, entre eles o Brasil, representa uma fonte relativamente barata de proteína de boa qualidade, cuja produção de aves em grande escala resulta mais fácil que a de outros animais empregados como alimento.

Por outro lado, quase todos os plantéis de aves podem estar contaminados devido às características zoonóticas do microrganismo com a necessidade de extensa atividade de controle por parte dos responsáveis pela sua produção. As infecções determinadas por estes microrganismos são comumente associadas a um sistema de criação intensiva, atingindo aves jovens (até duas semanas de idade), sendo os adultos portadores assintomáticos, por longo período (Hofer *et al.*, 1997). Embora todas as salmonelas possam ser reconhecidas como um patógeno potencial, algumas responsáveis por infecção no homem, estão presentes no intestino de aves saudáveis, sem detrimento para o hospedeiro, sendo, porém, capazes de contaminar o meio ambiente e outras aves, através das fezes (Poppe, 2000). O número de bactérias pode ser baixo em princípio, porém a contaminação dos produtos pode ocorrer além da cadeia produtiva, durante o transporte, processamento, embalagem, estocagem, distribuição e preparo para o consumo, aumentando substancialmente o risco de infecção (OMS, 1988 e 2002; Logue *et al.*, 2003).

A contaminação cruzada é o fator principal no caso de alimentos elaborados como cereais, chocolate, doces, produtos a base de soja, produtos a base de ovos pasteurizados, leite em pó, ingredientes de rações para animais (farinha de peixe, de penas e de ossos) e condimentos. A contaminação durante a elaboração ou preparo pode resultar do contato direto com alimentos antes de sua cocção ou proveniente do meio ambiente, como no caso de superfícies contaminadas em cozinhas ou indústrias (OMS, 1988; DANMAP, 2003).

Comparando com outros bastonetes Gram negativos, as salmonelas são relativamente resistentes a vários fatores ambientais. A adaptabilidade da *Salmonella* spp. é demonstrada por sua habilidade de crescer na presença ou ausência de oxigênio. Do mesmo modo em atmosfera modificada como, por exemplo, em nitrogênio embora apresentem crescimento reduzido, do mesmo modo que em presença de 80% de CO₂. Entretanto multiplica-se facilmente 8 - 11 °C em presença de 20-50% CO₂. Prolifera em valores de pH entre 7.0 e 7.5 (extremos 3.8 – 9.5), temperatura de 35 – 43 °C (extremos 5 a 46 °C) e atividade hídrica de $\geq 0,94$, ocorrendo variações entre sorovares e/ou cepas. Nos produtos secos como o chocolate, o cacau em pó, as especiarias ou o leite em pó e em produtos congelados como os sorvetes, o normal é a sobrevivência por períodos de tempo prolongados. A bactéria é sensível ao calor, não sobrevivendo à temperatura superior a 70 °C, no entanto a termorresistência pode incrementar-se com menor coeficiente de atividade de água, como por ex. inativação que ocorre rapidamente em temperatura de pasteurização em alimentos com atividade de água $\geq 0,95$ (OMS, 1988, Franco & Landgraf, 1996, Forsythe, 2002).

A associação entre tolerância ao sal e ácido resistência são interdependentes. Certos processos como salmoura ($\geq 9,0\%$) e defumação têm efeito limitado na sobrevivência das salmonelas, podendo sobreviver por vários meses na salmoura com cerca de 20% de sal em produtos de elevados teores protéicos ou de gordura. Como exemplos, podem ser citados a carne seca defumada e o pescado, onde as salmonelas apresentam capacidade de sobrevivência de várias semanas a meses.

A relativa resistência que estes microrganismos apresentam à dessecação, congelamento, salmoura e defumação, explica porque sobrevivem em muitas classes de alimentos. O efeito bactericida das condições ácidas varia de acordo com a natureza do ácido utilizado no processo, onde os ácidos acético e propiônico são mais inibitórios que o láctico e cítrico. Deve ser salientado que, em alimentos com elevado teor lipídico, como ovos e chocolate, as salmonelas ficam dentro dos glóbulos de gordura, protegidas, não sendo afetadas pelas enzimas digestivas ou pela acidez gástrica, fato este que reduz a dose infectante (Forsythe, 2002).

II - GÊNERO *ENTEROCOCCUS*

1. CARACTERÍSTICAS GERAIS, NOMENCLATURA E CLASSIFICAÇÃO

Enterococos são bactérias amplamente distribuídas na natureza sendo encontrados no solo, alimentos, água, animais, pássaros e insetos, fazendo parte, também, da microbiota dos tratos gastrintestinal e geniturinário de humanos e de outros animais. Podem ser encontrados nas fezes de adultos humanos sendo, *E. faecalis* e *E. faecium*, as principais espécies isoladas (Teixeira & Facklam, 2003).

Enterococos tem sido reconhecido como patógeno humano, em potencial, desde a virada do século XX. A partir de 1912, esta bactéria tem sido associada com uma série de doenças como endocardites, infecções do trato urinário, dentária, abdominal, de feridas (principalmente durante a Primeira Guerra Mundial), sepsis puerperale e osteomielite. Infecção do trato urinário é a mais comum patologia enterocócica humana, normalmente ocorrendo em pacientes hospitalizados, seguida pela infecção intra-abdominal e pélvica, neonatal, bacteremia e endocardite. (Moellering Jr *et al.*, 1970; Murray, 1990; Miranda, Singh, Murray, 1991; Hall *et al.*, 1992).

A importância do enterococo como agente etiológico de infecções hospitalares é bem documentada, sendo, portanto, difícil estabelecer a fonte de infecção, já que este organismo pode ter como origem a autoinfecção (Dunne & Wang, 1997; McDonald *et al.*, 1997).

Como causa de infecção hospitalar, os enterococos foram classificados como o terceiro agente mais comum pelo “*National Nosocomial Infection Surveillance System*” (NNISS) em 1984 nos EUA, passando para segundo lugar no período de 1986 a 1989. Os enterococos são responsáveis por cerca de 10% de todas as infecções hospitalares, das quais 17% correspondem ao trato urinário e 7%, às bacteremias (Schaberg, Culver, Gaynes, 1991; Boyle *et al.*, 1993).

Os fatores de risco associados à infecção hospitalar por enterococos podem ser: o uso de antibióticos aos quais a bactéria é resistente (cefalosporinas e aminoglicosídeos); o uso de múltiplas vias de acesso vascular, cateter urinário e outros materiais invasivos; a gravidade da doença e indivíduos debilitados; o uso de antibióticos que não possuem ação efetiva sobre enterococos; os pacientes

transplantados; e a combinação de um ou mais fatores (George & Uttley, 1989; Boyce, 1997; Eliopoulos, 1997).

A resistência à vancomicina, em amostras de *Enterococcus* isoladas na clínica, foi primeiramente descrita em 1988 e, desde então, têm sido reportados em todo o mundo como responsáveis por surtos de infecção hospitalar (Frieden *et al.*, 1993; Kjerulf, Pallesen, Westh, 1996; Melhus & Tjernberg, 1996; Uttley *et al.*, 1988).

A vancomicina tem sido escolhida para o tratamento de infecções desde 1950, e seu uso foi moderado até a década de 1980, quando, a partir de então, passou a ser extensivamente utilizada (Woodford, 1998). Múltiplos genes estão envolvidos na geração da resistência à vancomicina e seis fenótipos estão descritos: VanA, VanB, VanC, VanD, VanE e VanG, sendo estes associados com diferentes ligases e sítios alvos da vancomicina na parede celular dos enterococos (Leclercq *et al.*, 1988; Lai & Kirsch, 1996; Perichon, Reynolds, Couvarlin, 1997; Fines *et al.*, 1999).

A múltipla resistência dos enterococos aos antimicrobianos poderá refletir em dificuldades terapêuticas, devido a sua habilidade de adquirir novas características de resistência a altas concentrações de gentamicina, penicilina e vancomicina (Murray, 1991; Frieden *et al.*, 1993; Leclercq & Couvarlin, 1997; Murray, 1998).

Taxinomicamente o nome “entérococo” foi primeiramente utilizado em uma publicação francesa em 1899, sendo proposto para enfatizar a origem intestinal destas bactérias Gram-positivas (Thiercelin, *apud* Murray, 1990). Em 1906, o nome *Streptococcus faecalis* foi dado a uma bactéria isolada de um caso de endocardite, por Andrewes & Horder (*apud* Murray, 1990). No início da década de 1930, Sherman (1937) propôs um esquema de classificação que dividiu os estreptococos em quatro grupos taxonômicos: piogênicos, viridans, lácticos e enterococos, sendo essa classificação correlacionada com o esquema sorológico criado por Lancefield. A motilidade do enterococo foi notada em 1935 e, como se assemelhava a um *Streptococcus faecium*, ficou conhecido como *S. faecium* subespécie *mobilis* (Langston, Gutierrez e Bouma, 1960). Em 1955, foi descrito um enterococo denominado “*malodoratus*” devido ao seu mau-cheiro (Collins *et al.*, 1984). Em 1957 Gradual observou a produção de um pigmento amarelo por alguns desses enterococos móveis, os quais posteriormente foram chamados de *S. faecium* variação *casseliflavus* (Mundt & Graham, 1968).

Desde o início do século XX, várias espécies de enterococos passaram a ser reconhecidas sendo, em meados de 1960, incorporadas para as nomenclaturas oficiais. Em adição as espécies mais conhecidas como *S. faecalis*, *S. bovis*, *S. durans*, *S. zymogenes* e *S. liquefaciens*, outras espécies passaram a ser isoladas não somente de humanos como também de animais, alimentos e plantas.

Estudos de hibridização DNA-DNA e DNA-rRNA, realizados na década de 1980, mostraram diferenças entre enterococos e estreptococos e, em 1984, essas evidências genotípicas demonstraram claramente que essas bactérias deveriam ser classificadas separadamente, sugerindo a criação do gênero *Enterococcus* (Schleifer & Kilpper-Bälz, 1984). Os trabalhos publicados que deram suporte para a

criação deste novo gênero são citados no Manual de Bergey em 1984, aceitando a incorporação do *Enterococcus* na nomenclatura oficial (Schleifer, 1984).

Atualmente o gênero é formado por 21 espécies: *E. avium*, *E. gilvus*, *E. malodoratus*, *E. pallens*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus*, *E. saccharolyticus*, *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. gallinarum*, *E. mundtii*, *E. dispar*, *E. durans*, *E. hirae*, *E. porcinus*, *E. ratti*, *E. asini*, *E. cecorum*, *E. sulfureus* e *E. columbae*, sendo que a maioria dessas são de ocorrência rara na clínica humana (Teixeira & Facklam, 2003).

O gênero *Enterococcus* consiste de cocos Gram-positivos, anaeróbios facultativos e que podem se apresentar na forma de cadeias curtas, aos pares ou como células únicas. Os enterococos não possuem enzimas citocrômicas e, portanto, são catalase-negativo, salvo algumas cepas que podem produzir uma pseudocatalase (Scheifler, 1984; Facklam & Carey, 1985). Em laboratórios clínicos, o gênero tem sido identificado presuntivamente, por muitos anos, pela sua morfologia através da coloração de Gram, pela capacidade de crescimento na presença da bile, hidrólise da esculina e crescimento em meio líquido contendo 6,5% de NaCl. Atualmente, esta identificação presuntiva precisa ser complementada com outros testes bioquímicos, pois cepas do gênero *Lactococcus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*, que apresentam reação positiva para os testes presuntivos acima citados, já foram isolados de infecções humanas (Facklam, 1972; Facklam, 1980; Facklam, Sham, Teixeira, 1999). O **Quadro 3** mostra os principais testes utilizados na rotina laboratorial para a identificação presuntiva do gênero *Enterococcus* (Facklam, Sham, Teixeira, 1999).

Quadro 3. Características fenotípicas utilizadas para a identificação presuntiva de *Enterococcus* spp. e gêneros relacionados.

Gêneros	Suscetibilidade à vancomicina	Produção da PYR	Teste da Bile-esculina	Crescimento em		
				6,5% NaCl	10°C	45°C
<i>Enterococcus</i>	R ou S	+	+	+	+	+
<i>Leuconostoc</i>	R	-	v	v	+	v
<i>Pediococcus</i>	R	-	v	+	-	v
<i>Vagococcus</i>	S	+	+	+	+	v
<i>Streptococcus</i>	S	-	v	v	-	v
<i>Lactococcus</i>	S	V	v	+	+	v

PYR: pyrrolidonyl-arylamidase

+: >90% positivo

-: <10% positivo

v: variável

R: resistente

S: sensível

Fonte: Facklam, Sham, Teixeira, 2003

A identificação das espécies do gênero *Enterococcus*, através dos testes bioquímicos convencionais foi inicialmente proposta por Facklam & Collins (1989), modificada por Facklam & Sham (1995) e recentemente atualizada por Teixeira & Facklam (2003). As espécies do gênero *Enterococcus* são divididas em cinco grupos (I-V) com base em três provas bioquímicas: fermentação do manitol, da sorbose, e dehidrolação da arginina. Outras características fenotípicas também são

avaliadas para caracterizar as diferentes espécies de enterococos e gêneros relacionados, como mostra a **Quadro 4**.

Quadro 4. Características fenotípicas utilizadas para a identificação das espécies de *Enterococcus* e gêneros relacionados.

Espécies	MAN	SOR	ARG	ARA	SBL	RAF	TEL	MOT	PIG	SUC	PYU	MGP
Grupo I												
<i>E. avium</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	V
<i>E. gilvus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-
<i>E. malodoratus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	V
<i>E. pallens</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+
<i>E. raffinosus</i>	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	V
<i>E. pseudoavium</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+
<i>E. saccharolyticus</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
Grupo II												
<i>E. faecalis</i>	+*	-	+*	-	+	-	+	-	-	+*	+	- ^b
<i>Lactococcus</i> ssp	+	-	+	-	-	-	-	-	-	V	-	-
<i>E. faecium</i>	+*	-	+	+	V	V	-	-	-	+*	-	-
<i>E. casseliflavus</i>	+	-	+*	+	V	+	-*	+*	+*	+	V	+
<i>E. mundtii</i>	+	-	+	+	V	+	-	-	+	+	-	-
<i>E. gallinarum</i>	+*	-	+*	+	-	+	-	+*	-	+	-	+
Grupo III												
<i>E. dispar</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+
<i>E. durans</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. hirae</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>E. porcinus</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. ratti</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Grupo IV												
<i>E. asini</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>E. cecorum</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>E. sulfureus</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
Grupo V												
<i>E. columbae</i>	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-
<i>Vagococcus</i> sp.	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+

MAN: manitol; **SOR:** sorbose; **ARG:** arginina; **ARA:** arabinose; **SBL:** sorbitol; **RAF:** rafinose; **TEL:** telurito a 0:04%; **MOT:** motilidade; **PIG:** pigmento; **SUC:** sucrose; **PYU:** piruvato; **MGP:** metil- α -glicopiranosida; **+**: >90% positivo; **-**: <10% positivo; **v:** variável; *****: exceções ocasionais (<3% das cepas apresentam reações discordantes); **R:** resistente; **S:** sensível.

Fonte: Teixeira & Facklam, 2003.

2. HABITAT NATURAL

Enterococos são habitantes da microbiota intestinal, podendo ser encontrados em quase todos os animais, desde insetos domésticos a humanos. Esta bactéria pode ser isolada da vegetação e de superfícies de águas, que provavelmente foram contaminadas por excrementos de animais ou por água de esgoto não tratado (Moellering Jr, 1992; Jett, Huycke, Gilmore, 1994). Em humanos, a concentração de enterococos nas fezes é de aproximadamente 10^8 UFC/g (Rice *et al.*, 1995). Embora a cavidade oral e o trato vaginal possam estar colonizados por enterococos, esta bactéria é isolada destes sítios com uma menor frequência (Beragie *et al.*, 1975; Kurrie *et al.*, 1981; Smyth *et al.*, 1987; Rice *et al.*, 1995). *E. faecalis* é a principal espécie isolada do trato gastrointestinal humano, sendo que as espécies *E. faecium*, *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*, também podem ser encontradas, porém em proporções variadas (Teixeira & Facklam, 2003).

3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E PATOGENIA

Enterococcus tem sido reconhecido como patógeno humano em potencial desde a virada do século XX. Em 1912 essa bactéria começou a ser associada a uma série de infecções e, a partir de 1920, passaram a ser publicadas várias revisões (Sherman, 1937). A publicação original da presença desse microrganismo em pacientes com enterites, apendicites e meningites foi realizada por Thiercelin em 1899 (*apud* Murray, B.E., 1990).

O papel dos enterococos nas infecções urinárias foi primeiramente reportado em 1906, sendo confirmado, posteriormente, por outros pesquisadores (Sherman, 1937; Evans & Chin, 1947). Durante a Primeira Guerra Mundial, alguns autores relataram a associação dos enterococos com infecções de feridas, embora não tenha sido estabelecido se a bactéria estava colonizando ou causando a infecção. Outras infecções por enterococos foram reportadas no início de 1930 como quadros de osteomielite e infecções dentárias, entre outras (Evans & Chin, 1947). Recentemente, os enterococos têm sido reconhecidos como causa de infecção hospitalar, em pacientes recebendo antibioticoterapia (Murray, 1990).

A presença dos enterococos no trato urinário, por muitas vezes, pode ocorrer como uma colonização assintomática, sendo a urina a principal fonte de isolamento em humanos (Moellering Jr, 1992; Murray & Mederski-Samaroj, 1983). Na maioria das vezes essas infecções são hospitalares e podem levar a casos de prostatite e abscessos perinéfricos (Gross *et al.*, 1976; Morrison & Wenzel, 1986; Eldestein & McCabe, 1988). Essas infecções podem estar associadas com instrumentação ou anormalidades estruturais do trato urinário, com infecções urinárias recorrentes e com antibioticoterapia prévia (Warren, Tenney, Hoopes, 1982; Musher, 1990; Moellering Jr, 1992).

Infecções intraabdominais e pélvicas por enterococos são as mais prevalentes após as infecções urinárias. Quando são isolados a partir desses locais, frequentemente fazem parte de uma infecção polimicrobiana e nem sempre é possível estabelecer o seu papel como causa primária da infecção (Musher, 1990; Moellering Jr, 1992). Entretanto, já é de conhecimento que este microrganismo pode contribuir para a formação de abscessos abdominais e pélvicos levando a um quadro de sepsis (Hoffman & Moellering Jr, 1987; Musher, 1990; Murray, 1990; Moellering Jr, 1992).

A bacteremia é o terceiro tipo mais comum de infecção (Moellering Jr, 1992), sendo nos pacientes com endocardite, decorrente de infecções do trato urinário, intravenosas e intraarteriais, e infecções intraabdominais (Evans & Chin, 1947; Maki, 1981; Shlaes, Levy, Wolinsky, 1981; Malone *et al.*, 1986; Gulberg, Homann, Phair, 1989). A alta taxa de mortalidade associada com bacteremia por enterococos pode estar associada ao comprometimento clínico do hospedeiro (Maki, 1981; Whiteside, Moore, Ratzan, 1983; Hoffman & Moellering Jr, 1987; Maki & Agger, 1988; Gullberg, Homann, Phair, 1989).

Enterococos causam cerca de 10 a 20% das endocardites bacterianas, principalmente em idosos. Diferente da bacteremia, a endocardite é frequentemente adquirida na comunidade (Kaye, 1982; Musher, 1990; Moellering Jr, 1992), e suas principais portas de entrada são o trato geniturinário e a via biliar (Mandell *et al.*, 1970; Wilson *et al.*, 1984). Um outro grupo de risco importante que pode adquirir endocardite é o usuário de drogas (Reiner, Gopalakrishna e Lerner, 1976).

Outras infecções, como meningite, são raras, sendo principalmente encontradas em recém-nascidos em estado grave. Em adultos, infecção do sistema nervoso central ocorre em pacientes com história de cirurgia e ou quimioterapia, assim como osteomielite e infecções pulmonares (Murray, 1990); Moellering Jr, 1992; Scharberg, Culver, Gayness, 1991; Emori & Gayness, 1993, Teixeira & Facklam, 2003).

4. ENTEROCOCOS NOS ALIMENTOS

Os enterococos estão amplamente distribuídos no ambiente e principalmente no trato gastrointestinal dos homens e animais. *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) é a espécie predominante no homem, embora alguns indivíduos em alguns países apresentem a espécie predominante *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) (Devriese & Pot, 1995). Entretanto, Mundt (1986) demonstrou que é comum a presença de *E. faecalis* em diversos alimentos e que nem sempre a presença do mesmo está associada com a contaminação fecal do alimento. Em 1992, a União Européia estabeleceu um nível máximo para a presença de Coliformes e *Escherichia coli*, ambos considerados indicadores de higiene, quando não havia limites estabelecidos para a presença dos enterococos. Verificou-se que a detecção desta bactéria, no processamento dos alimentos de uma forma em geral, apresentou pouca importância como parâmetro de indicação de higiene (Birollo *et al.*, 2001). Isto se deu devido os *E. faecalis*, *E. faecium* e *Enterococcus durans* estarem presentes na maioria dos animais de produção tais como, suínos, ovinos, bovinos e também encontrarem-se distribuídos no solo, água, plantas, vegetais e insetos (Mundt, 1986). Ainda segundo o mesmo autor, a resistência dos enterococos às temperaturas de pasteurização, e sua adaptabilidade à diferentes substratos e condições de crescimento (baixa e altas temperaturas, pHs extremos e salinidade) implica que os mesmos podem ser encontrados em qualquer alimento de origem animal (carne ou leite) ou não, alimentos processados crus ou que tenham sido submetidos à tratamento térmico. Isto significa que estas bactérias podem ser encontradas em qualquer ponto do fluxograma de produção de diversos tipos de alimentos.

Segundo Vancanneyt *et al.* (2002) e Franz *et al.* (2003) os enterococos têm apresentado significativa importância na tecnologia do processamento dos alimentos, devido à capacidade que os mesmos têm de promover a fermentação devido à produção do ácido lático (por exemplo: em salames, salsichas e queijos) e produzir bacteriocinas (enterocinas). Recentemente, há a publicação de pesquisas com a utilização de enterococos como culturas iniciadoras “starters” ou “co-starters”

sendo neste último adjuvantes de processos fermentativos. A maior parte deste tipo de pesquisa foi focada na análise bioquímica e tecnológica de cepas de enterococos para serem utilizados no processamento tecnológico de queijos e em produtos cárneos fermentados. Entretanto, a seleção de cepas de enterococos para serem utilizados no processamento de alimentos tem sido uma difícil tarefa devido ao potencial risco que esses microrganismos oferecem à saúde humana.

Os enterococos resistentes à antibióticos encontram-se amplamente distribuídos nos alimentos. Eles têm sido detectados em carnes e produtos derivados, leites e produtos lácteos derivados, dentre outros tipos de alimentos destinados ao consumo humano (Foulquié Moreno *et al.*, 2006). Franz *et al.*, (2001) encontraram traços de resistência adquirida em alimentos oriundos da Europa, entretanto estes mesmos autores verificaram que em geral as cepas não apresentaram resistência à antibióticos relevantes em clínica. Giraffa (2002) enfatiza ainda o possível papel desempenhado pelos enterococos resistentes aos antibióticos, principalmente os resistentes à vancomicina, como sendo os alimentos um reservatório natural na disseminação de traços de resistência à antibióticos no ambiente. Este mesmo autor verificou ainda a existência de ligação entre antibióticos utilizados em animais de produção e a presença em humanos de enterococos resistentes a antibióticos, sendo esta transmissão ocorrida via cadeia alimentar. Logo, a presença destes microrganismos nos alimentos podem carrear ao homem potenciais fatores de virulência que podem comprometer a saúde humana.

III. RESISTÊNCIA MICROBIANA

1. CARACTERÍSTICAS GERAIS E CONCEITOS

A resistência microbiana pode ser classificada como natural ou intrínseca, e adquirida. A resistência natural decorre de uma propriedade comum aos microrganismos da espécie, tal qual ocorre com os bacilos Gram-negativos (*Escherichia coli*, *Proteus*) resistentes à penicilina G. Essas bactérias sintetizam enzimas que clivam esse antibiótico, denominadas beta-lactamases, e possuem, além disso, envoltórios que dificultam o acesso da penicilina ao seu alvo molecular. A resistência adquirida é resultante da aquisição de mecanismos normalmente ausentes nas bactérias da espécie em questão. A maioria dos isolados de *Staphylococcus aureus* não apresentava resistência à penicilina G a princípio. Porém, já nos primeiros anos de uso desse antimicrobiano, foram detectadas linhagens resistentes. Outro exemplo de resistência adquirida foi observado nos enterococos resistentes à vancomicina, objeto de grande preocupação na área da saúde (Monroe & Polk, 2000; Palermo-Neto & Titze-de-Almeida, 2002; Alekshun & Levy, 2007).

Antimicrobianos são medicamentos que atuam causando a morte ou a inibição do crescimento de microrganismos. Podem ser administrados a animais para tratar ou prevenir a ocorrência de doenças infecciosas e, também, como aditivos, neste caso visando melhorar o desempenho zootécnico de animais de produção. O uso dessas substâncias é objeto de grande preocupação na área da saúde,

considerando-se os riscos de resíduos nos produtos derivados dos animais e de desenvolvimento de resistência bacteriana, conforme será abordado a seguir.

A resistência microbiana pode ser conceituada como a habilidade de um microrganismo continuar a multiplicar-se ou persistir na presença de níveis terapêuticos de determinado agente antimicrobiano.

As consequências desse fenômeno biológico natural, de valor evolutivo, podem ser interpretadas a partir das visões de diferentes áreas do conhecimento (Titze-de-Almeida & Palermo-Neto, 2005), a saber:

- Visão microbiológica: linhagens de bactérias resistentes apresentam uma concentração inibitória mínima (MIC) superior àquela normalmente encontrada em sua espécie. Entenda-se MIC como a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de prevenir o crescimento visível de um microrganismo em meios de cultura para testes de sensibilidade;
- Visão clínica: a infecção não será mais controlada, pois a bactéria sobreviverá à antibioticoterapia;
- Visão farmacológica: o antimicrobiano, mesmo atingindo níveis adequados nos diversos compartimentos orgânicos, não será efetivo, pois seu mecanismo de ação está prejudicado;
- Visão molecular: a bactéria resistente apresenta genes que codificam proteínas envolvidas em mecanismos moleculares que interferem na ação dos antimicrobianos;
- Visão evolutiva: a bactéria resistente apresenta material genético que lhe confere vantagem competitiva e que garante sua sobrevivência e proliferação de linhagem na presença do antimicrobiano, condição esta normalmente limitante para os indivíduos sensíveis desta população.

2. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

As bactérias podem apresentar resistência microbiana em função de três mecanismos principais: inativação enzimática da molécula do antimicrobiano, alteração do alvo celular deste agente e redução do nível intracelular do antimicrobiano (Alekhshun & Levy, 2007).

A *inativação enzimática* decorre da ação de enzimas bacterianas sobre o princípio ativo do antimicrobiano, como ocorre em *S. aureus* produtores de enzimas beta-lactamases (penicilinase e cefaloporinase) que hidrolisam o anel beta-lactâmico de penicilinas e cefalosporinas. O segundo mecanismo de resistência consiste em alterar (“camuflar”) a estrutura da molécula-alvo do antimicrobiano. Como exemplo, citam-se os enterococos resistentes à vancomicina que substituem o resíduo de alanina por lactato, reduzindo a afinidade da vancomicina pelo seu alvo bacteriano. Finalmente, bactérias podem apresentar resistência quando possuem mecanismos para reduzir a concentração intracelular do antimicrobiano, como as bombas de efluxo. Este mecanismo é utilizado por estafilococos resistentes a antibióticos macrolídios, como a eritromicina (Walsh, 2000; Wright, 2003).

3. CONSEQUÊNCIAS PARA A SAÚDE HUMANA

A possível transferência da resistência microbiana dos animais para o homem é um tema de grande importância e que tem mobilizado esforços de controle por parte de várias instituições internacionais, incluindo OMS, OIE e *Codex Alimentarius*. Nesse sentido, as duas principais preocupações são a transferência do(s) microrganismo(s) resistente(s) que pode(m), assim, causar uma infecção de difícil controle, e a transferência do(s) gene(s) de resistência do(s) microrganismo(s) de origem animal para o(s) microrganismo(s) de origem humana.

Quanto ao primeiro aspecto, sabe-se que doenças infecciosas de origem alimentar ocorrem quando bactérias patogênicas do hospedeiro ou oportunistas são ingeridas e, posteriormente, superam barreiras orgânicas como, por exemplo, o pH e as enzimas gástricas, o muco, a microbiota normal do TGI e a ação de leucócitos do sistema imune, podendo, assim, causar intoxicação ou infecção. As infecções são a primeira preocupação no que se refere à ingestão de alimentos contaminados com bactérias resistentes, uma vez que a terapia antimicrobiana pode ser ineficaz. Porém, a instalação de um processo infeccioso causado por bactérias resistentes é um processo que depende de várias etapas sucessivas. Assim, uma vez selecionada, uma bactéria resistente deverá contaminar a carcaça durante o processamento, ultrapassar as barreiras que surgem durante a preparação dos alimentos (calor, condimentos, etc.), ser consumida pelo ser humano, vencer as barreiras naturais do TGI humano, multiplicar-se e produzir a infecção e, finalmente, resistir aos tratamentos convencionais, comprometendo o sucesso da terapêutica. Deve-se considerar que infecções alimentares podem de fato ocorrer, trazendo, assim, consequências para a saúde do ser humano. A segunda preocupação, conforme citado, seria a transferência de genes de resistência das bactérias de origem animal para aqueles presentes na microbiota humana que, posteriormente, poderiam causar a infecção. A transferência de genes entre bactérias já foi demonstrada experimentalmente, mas a magnitude deste fenômeno, em termos de saúde pública, ainda não foi estabelecida (Appley *et al.*, 2001; Barton, 1998).

Cabe finalmente destacar que o risco de ocorrência de uma infecção a partir da ingestão de alimentos varia de acordo com o microrganismo em questão. Assim, a OMS dividiu os agentes microbianos considerados prioritários para monitoramento de resistência em duas categorias, aqueles zoonóticos, incluindo *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. e aqueles indicadores de contaminação, que compreendem *Enterococcus* e *Escherichia coli*. Apesar destes quatro gêneros possuírem potencial de causar infecções a partir de alimentos de origem animal, o risco está melhor caracterizado para os zoonóticos. As infecções alimentares causadas por linhagens de *Salmonella* spp. e de *Campylobacter* spp. com resistência a antimicrobianos já estão devidamente caracterizadas na literatura científica (WHO/FAO, 2000; WHO/FAO, 2001).

Apesar dos enterococos apresentarem pouca virulência, é importante ressaltar que essa bactéria está sendo gradativamente reconhecida como causa de sérios problemas à saúde, especialmente em pacientes hospitalizados. Esse fato tem

como explicação, a capacidade desse microrganismo resistir à ação de muitos antimicrobianos. Os enterococos apresentam notável habilidade de adquirir e transferir novos determinantes de resistência (Sapico *et al.*, 1989; Murray, 1990; Moellering Jr, 1992; Arthur & Couvarlin, 1993; Poyart, Celli, Trieu-Cuot, 1995).

A resistência aos antimicrobianos pode ser de dois tipos: intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é baseada em genes presentes no cromossomo, que tipicamente não são transferíveis e incluem resistência às penicilinas semi-sintéticas, cefalosporinas, baixo nível de resistência aos aminoglicosídeos e baixo nível de resistência à clindamicina, lincomicina, fluorquinolonas e sulfametoxazol-trimetoprim. A resistência adquirida normalmente resulta de uma mutação no DNA ou pela aquisição de um novo gene. Esta aquisição pode ocorrer por transformação, transdução ou conjugação. Os enterococos podem apresentar a resistência ao cloranfenicol, à tetraciclina, macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas, o alto nível de resistência aos aminoglicosídeos, aos beta-lactâmicos, aos glicopeptídeos e mais recentemente às quinolonas.(Teixeira & Facklam, 2003; Cetinkaya *et al.*, 2000).

4. SALMONELLA E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Considerando que a principal via de transmissão de *Salmonella* spp. está na cadeia alimentar, a presença em animais, criados com objetivo comercial, mostra que esse microrganismo é considerado como o mais incidente e relevante agente causal de enfermidade entérica. Contudo, a salmonelose é uma zoonose e seu controle é um trabalho árduo, tendo em vista a emergência de novos sorovares e a reemergência de outros em determinadas áreas, tanto nos países emergentes quanto naqueles industrializados.

Soma-se neste contexto, o aumento da resistência de *Salmonella* sp. aos antimicrobianos, com o percentual elevando-se de 17% na década de 70 para 31% ao final dos anos 80 (WHO, 1997; Neto, 2001), incluindo-se drogas de última geração, como por exemplo, as quinolonas (Molbak, 1999, NARMS, 2006).

A incidência de resistência bacteriana a antimicrobianos representa risco à saúde humana e animal. Este tema de extrema importância tem sido objeto de atenção de instituições como a Organização Mundial de Saúde (OMS), Escritório Internacional de Epizootias (OIE) e Codex Alimentarius, que vêm discutindo soluções globais para o problema.

A fiscalização de produtos de uso veterinário está prevista na legislação brasileira desde o final da década de 60 e regulamentada no que diz respeito à utilização, fabricação e comercialização. Entre os produtos veterinários de uso autorizado no Brasil, destaca-se o grupo dos antimicrobianos, fármacos utilizados para prevenção e tratamento de doenças infecciosas, bem como para melhorar o desempenho de animais produtores de alimentos.

Sua introdução às rações, visando benefícios para o crescimento, iniciou-se a partir dos trabalhos de Moore *et al.*, (1946) e Stockstad & Jukes (1950). A utilização destes fármacos, através de aspersão direta (agricultura) ou incorporação às rações animais, além de eficiência na nutrição animal, também apresentou resultados positivos na profilaxia de doenças.

O uso de antimicrobianos tem como base informações científicas e técnicas, e respeitando-se as boas práticas de uso de medicamentos veterinários. Na escolha destes, considera-se a eficácia, a aplicabilidade, a segurança e o custo. De acordo com Bottezini (2003) os antibióticos são também estimulantes do crescimento, atuando no intestino selecionando a microbiota intestinal e eliminando microrganismos produtores de toxinas, além de melhorar o aproveitamento dos alimentos. É reconhecido que alguns fármacos (bacitracina, clortetraciclina, oxitetraciclina, penicilina, estreptomicina, eritromicina, oleandomicina, virginamicina, flavomicina e lincomicina), favorecem em torno de 10% o ganho de peso e de 10% em melhor conversão alimentar. Usualmente as rações avícolas contêm 2, 4, 10 ou 40 gramas por tonelada de algum tipo de antibiótico, para estimular o crescimento e melhorar a conversão alimentar.

O uso na terapêutica também requer o conhecimento ou suspeita quanto ao agente infeccioso e o seu perfil de sensibilidade, assim como a avaliação das condições clínicas do animal. Comtempla um regime posológico, cuja dosagem e duração possibilitam o controle do processo infeccioso, reduzindo-se riscos de desenvolvimento de resistência bacteriana.

Contudo, seu uso é feito de forma descordenada, no setor agrícola e na cadeia de produção de alimentos de origem animal. Tal condição leva a seleção de um pool de genes, transferíveis para bactérias comensais presentes no trato digestivo humano ou enteropatógenos, levando a uma pressão seletiva, que favorece a sobrevivência e disseminação através da cadeia alimentar (Hasman, 2005).

A resistência antimicrobiana usualmente é extracromossômica, cuja disseminação pode ocorrer a nível clonal, associada à replicação cromossômica. Esta pode ocorrer através de diferentes mecanismos como, por exemplo, transferência de plasmídeos, de replicons ou migração de genes com replicação de transposons, os quais coexistem na natureza e se multiplicam de forma exponencial, tendo em vista que estão associados com a duplicação do DNA. Resistência a 12 drogas foi observada em um simples plasmídeo de uma enterobactéria (LeDuc, 1995, In: Rodrigues, 2001). Em alguns Gram negativos, podem estar associados a metais pesados, portanto a presença de mercúrio, cádmio ou outros metais pesados no ambiente, pode encorajar a proliferação de microrganismos que contém genes de resistência antimicrobiana. Se por um lado estas características vêm evoluindo significativamente durante as duas últimas décadas, o impacto econômico na comunidade, somente está começando.

Embora a terapia antimicrobiana não seja recomendada na maioria das infecções diarreicas, este procedimento indicado nas infecções invasivas, se faz na prática muitas vezes de modo indiscriminado, resultando no aumento de cepas resistentes aos antimicrobianos podendo representar um grave problema, especialmente nos países emergentes.

Como resultados, podem ser citadas diferentes situações como, a resistência no sudeste da Ásia de 50% de *S. Typhi* ao cloranfenicol, tetraciclina e ampicilina, com o uso de fluoroquinolonas, excetuando-se crianças onde esta é substituída pela ceftriaxona.

Como abordagem da evolução histórica da resistência aos antimicrobianos (In: Rodrigues, 2001), em nível de Brasil, inúmeras avaliações individuais, relacionadas ao monitoramento da resistência vêm sendo efetuadas desde a década de 50, tendo Cisalpino (1957) analisado a sensibilidade de salmonelas isoladas a partir de 1947 e verificado o aumento progressivo de amostras resistentes. Entre as décadas de 60 e 70 este percentual ascendeu, como apontado por Costa *et al.* (1967) e Hofer *et al.* (1974). Durante os anos 80, estudos realizados em diferentes regiões do país, em cepas de origem humana, alimentar, animal e ambiental, revelam a resistência simples ou múltipla em *Salmonella* spp, bem como capacidade de transferência destes marcadores (Pessoa *et al.*, 1980; Câmara *et al.*, 1982; Queiroz *et al.*, 1985; Rodrigues *et al.*, 1985; Solari *et al.*, 1986;; Farage, 1987). Resultados similares foram obtidos por Solari *et al.* (1984) em *S. Agona*; Campos & Hofer (1989) em 658 salmonelas de diversos sorovares e Reis (1994), em *S. Enteritidis*, nos quais foram analisadas cepas isoladas de várias fontes e regiões do país.

Na atualidade, tal condição vem apontando perspectivas sombrias no tratamento de infecções por diferentes espécies bacterianas, incluindo *Salmonella* spp. às fluoroquinolonas e cefalosporinas de 3ª geração. Particularmente em relação a este patógeno, se considerarmos sua casuística no Brasil, se constatou sua prevalência e aumento de incidência entre 1991 – 1995 em fontes humanas e não-humanas, particularmente em ovos, aves (matrizes), amostras ambientais e matérias-primas de ração comercial (Tavechio *et al.*, 1996; Hofer *et al.*, 1998; Rodrigues, 2000-2006; Peirano *et al.*, 2006). Fonseca (2003) e Fonseca *et al.*, (2006), apontam a capacidade de produção de beta-lactamases em *S. Infantis* isoladas no Rio de Janeiro e, entre 2000 e 2004, Mulvey *et al.* (2004) reportaram aumento de multirresistência em *S. Agona* e em outros sorovares (Peirano *et al.*, 2006, incluindo caracterização de novas beta-lactamases e integrons.

Os níveis e extensão da resistência são influenciados pelas práticas de uso destes fármacos no homem e animais e variam com a região geográfica. Nos países desenvolvidos, estes fenótipos observados em *Salmonella* têm sido associados com o uso de antimicrobianos em animais, onde os perfis de resistência geralmente refletem o tempo que uma droga está em uso e a reversão desta característica associada ao seu desuso (Aarestrup, 2004).

A emergência da resistência antimicrobiana em bactérias associadas com animais produtores de alimentos e a evidência de infecções humanas tendo como fontes

tanto alimentos de origem vegetal quanto animal, tem compelido a comunidade científica e os profissionais de saúde pública a reavaliarem o uso destas drogas em animais de produção.

5. CARACTERIZAÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA

Sob a pressão seletiva imposta pelo uso de antimicrobianos, os microrganismos desenvolvem e/ou adquirem uma variedade de genes ou sofrem mutações que conferem resistência aos antimicrobianos. Vários destes genes conhecidos estão localizados em elementos genéticos móveis, tais como plasmídeos, transposons, sequências de inserção e nas ilhas de patogenicidade. Como consequência os genes são facilmente trocados entre bactérias que vivem no mesmo habitat, por exemplo, as enterobactérias no trato gastrointestinal de seres humanos e animais (Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001). Neste contexto, microrganismos do gênero *Salmonella* podem desempenhar um papel importante como receptores ou doadores de genes de resistência sendo de relevância para a difusão destes elementos.

Os métodos de tipagem genotípica, os quais envolvem a análise direta do DNA, de elementos genéticos cromossômicos ou extracromossômicos, permitem a diferenciação clonal de cepas. Estes têm sido utilizados, principalmente, em combinação com métodos clássicos bem estabelecidos como a sorotipagem e fagotipagem, com a finalidade epidemiológica, permitindo a diferenciação e identificação de cepas epidêmicas. Em *Salmonella*, assumem grande importância, relacionando os agentes etiológicos responsáveis por um surto com suas fontes de origem, em razão da prevalência de determinados fenótipos.

Entre os muitos métodos utilizados para determinar estes marcadores estão aqueles que têm como base a reação em cadeia de polimerase (PCR – “Polymerase Chain Reaction”). Apresenta alta sensibilidade, tendo sido descritas diversas variações, tornando cada vez mais ampla a aplicabilidade da mesma, incluindo-se, particularmente, nesta avaliação a identificação de genes de resistência aos antimicrobianos (Sandvang *et al.*, 1998; Briggs, Fratamico, 1999; Khan *et al.*, 2000; Alvarez *et al.*, 2004).

Na caracterização de genes de resistência antimicrobiana é realizada a amplificação de sequências conhecidas, correspondente aos genes implicados na resistência aos antimicrobianos, assim como genes ou sequências de diferentes tipos de integrons. São utilizados iniciadores específicos de 20 a 30 pb, alguns propostos por outros autores e quando possível/necessário outras que podem ser desenhadas no laboratório, a partir de sequências depositadas na base de dados.

Na metodologia empregada para sua execução como fonte de DNA é necessário o cultivo *overnight* da cepa e empregados como reativos primers que atuam como iniciadores da região de síntese e complementares da sequência a amplificar, os quatro desoxirribonucleotídeos trifosfato (dNTP), a enzima DNA polimerase termorresistente (Taq) e o tampão.

A amplificação é efetivada em um termociclador, onde são programadas as distintas etapas do processo: desnaturação, com a separação das fitas de DNA por ação da temperatura; anelamento, onde atuam os iniciadores com sequências homólogas e finalmente a extensão onde a DNA polimerase (Taq) sintetiza a fita complementar, unindo-se ao iniciador e incorporando dNTPs. Este ciclo se repete diferentes vezes, com as cadeias recém sintetizadas atuando também como molde, levando a um aumento exponencial do número de cópias. Os produtos são analisados mediante eletroforese em gel de agarose, coloração com solução de Brometo de Etídio e visualização sob luz UV.

6. USO DE TÉCNICAS FENO E GENOTÍPICAS PARA RASTREAMENTO DE *SALMONELLA*

A identificação detalhada de uma cepa é essencial para o monitoramento da disseminação de *Salmonella* relacionados a surtos de infecção em diversas regiões do mundo (Threlfall & Frost, 1990).

O reconhecimento das propriedades fenotípicas através da sorotipagem, biotipagem (Le Minor, 1988), tipagem por colicinas (Backer, 1980), fagotipagem e testes de sensibilidade a antimicrobianos (Holmberg *et al.*, 1984a) foram, até o fim dos anos 80, as principais ferramentas para a identificação e rastreamento de uma determinada bactéria em investigações epidemiológicas. Em sequência foram empregados análise do DNA plasmidial, que consiste na extração dos plasmídios e separação eletroforética em gel agarose para determinar seu número e peso molecular, ribotipia e mais recentemente o reconhecimento como “padrão ouro” para rastreamento de *Salmonella* spp da técnica de eletroforese de campo pulsado (PFGE), na qual o gel é submetido a campos elétricos alternados em ângulos distintos, permitindo uma melhor separação dos fragmentos do DNA cromossômico.

A sorotipagem constitui um método simples, rápido e facilmente disponível em laboratórios de bacteriologia (Maslow, Mulligan & Arbit, 1993). É altamente discriminatória, pois, o sorovar parece ser um marcador estável, havendo raros casos de conversão devido a fagos ou plasmídeos (Le Minor, 1988). Apesar do grande número de sorovares existente, a maioria raramente é isolada e, entre aqueles mais frequentes, existe uma distribuição variada de uma região para outra (Threlfall & Frost, 1990). No entanto, o predomínio de alguns sorovares nas regiões endêmicas e epidêmicas dificulta o rastreamento através deste método, tornando-se necessária a investigação de outros marcadores (Gill *et al.*, 1983). Por outro lado, possibilita observar alterações na prevalência de um sorovar particular em função da emergência de outro, sendo um marcador eficiente quando em surtos causados por sorovares raros (Le Minor, 1988).

A fagotipagem foi introduzida em 1950, como uma técnica de escolha pelos laboratórios de referência para diferenciar certos sorovares (Threlfall & Frost, 1990). A especificidade das cepas bacterianas por determinados bacteriófagos faz com

que esta metodologia seja particularmente importante como suporte para o rastreamento de *S. Paratyphi B* (Anderson, 1964), *S. Typhi* (Anderson & Hobbs, 1973), *S. Hadar* (Rowe *et al.*, 1980), *S. Typhimurium* (Mitchell *et al.*, 1989) e *S. Enteritidis* (O'Brien, 1988). O método é reproduzível, altamente discriminatório e os reagentes são estáveis e de baixo custo. Entretanto é necessário manter estoques de fagos ativos biologicamente e possuir amostras controle, levando a utilização da fagotipagem somente nos laboratórios de referência (Maslow *et al.*, 1993). Aliado a isto, é considerada como a principal limitação do teste a inexistência de bacteriófagos para uma boa parte de sorovares (Threlfall & Frost, 1990).

O padrão de resistência a antimicrobianos também tem sido aplicado na tipagem de *Salmonella*, tendo maior valor em clones multirresistentes e sempre em combinação com outros métodos (Helmuth *et al.*, 1985). Tal fato se deve ao crescente isolamento de cepas de *Salmonella* que apresentam resistência a um ou vários antimicrobianos possibilitando o reconhecimento, inclusive, de clones epidêmicos portadores destas características (Tauxe, 1991; Asensi & Hofer, 1994).

A caracterização antigênica e monitoramento da resistência, objeto da presente avaliação, representam valiosas ferramentas na epidemiologia de *Salmonella sp*, permitindo assim, o conhecimento quanto a fonte de disseminação, em sorovares cuja incidência em nosso meio é elevada, ou ainda a possibilidade de surpreender àqueles que possam representar condição de risco.

7. ENTEROCOCCUS E RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Os enterococos apresentam uma moderada resistência aos aminoglicosídeos resultando em uma MIC de 4 a 250 µg/ml (Standiford, deMaine, Kirby, 1970; Zimmerman, Moellering Jr, Weinberg, 1971; Zervos, Mikesell, Scharberg, 1986). Essa classe de antibióticos, quando utilizada em conjunto com os β-lactâmicos produzem um efeito bactericida.

Enterococos podem adquirir elevado nível de resistência aos aminoglicosídeos por três mecanismos distintos: alteração do sítioalvosítioalvo no ribossomo, interferência no transporte do antibiótico e modificação enzimática do antibiótico. Os dois primeiros mecanismos ocorrem por mutação no cromossomo, enquanto o terceiro é geralmente mediado por plasmídeo (Couvarlin, Carlier, Collatz, 1980; Leclercq *et al.*, 1992). Em enterococos isolados de amostras clínicas, o alto nível de resistência é geralmente mediado pela presença de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos. Entretanto, algumas cepas de *E. faecalis* com resistência à estreptomina podem ocorrer, sendo esta também resultante da mutação do gene associado ao ribossomo (Eliopoulos *et al.*, 1984).

Enterococos com elevado nível de resistência à estreptomina e kanamicina foram primeiramente reportados em 1970. O reconhecimento deste perfil para ambos os antimicrobianos favoreceu o uso da gentamicina na terapia combinada com a penicilina, para os casos de infecções graves (Moellering Jr *et al.*, 1970).

Resistência a concentrações elevadas de gentamicina foi reportado primeiramente em *E. faecalis* isolado na França em 1979 (Horodniceanu *et al.*, 1979), sendo agora uma prevalente nesta espécie. A ocorrência de cepas com este perfil têm sido reportadas por centros de pesquisa na Europa, Japão, Estados Unidos, Canadá, Tailândia, Chile, Austrália e Argentina (Murray & Mederski-Samaroj, 1983; Zervos, Mikesell e Schaberg, 1986; Utley *et al.*, 1988; Smyth, Stevens e Holimann, 1989). Em 1988, três cepas de *E. faecium* não relacionadas, apresentando alto nível de resistência a gentamicina, estreptomicina, kanamicina e tobramicina, foram reportadas pela primeira vez (Eliopoulos *et al.*, 1988).

Os enterococos apresentam uma resistência intrínseca moderada para penicilina e ampicilina quando comparados com os estreptococos (Murray, 1991; Gray, Stewart, Peddler, 1991; Moellering Jr, 1992). Amostras de *E. faecalis* apresentam uma MIC para ampicilina e penicilina que variam de 1-8 µg/ml, enquanto *E. faecium* apresentam uma maior resistência, com MIC variando entre 8-64 µg/ml (Moellering Jr *et al.*, 1979; Murray, 1990; Murray, 1992). A resistência intrínseca, principalmente às cefalosporinas, parece ser devido a baixa afinidade das proteínas ligadoras de penicilina (PBP) pelo antimicrobiano. Essa resistência é diretamente proporcional à quantidade ou à afinidade da PBP5 (Fontana, 1985; Herman & Gerding, 1991; Moellering Jr, 1991; Fontana *et al.*, 1994; Leclercq & Couvarlin, 1997).

Os antimicrobianos β-lactâmicos apresentam ação bacteriostática contra os enterococos, necessitando da sua combinação com um aminoglicosídeo para se obter uma ação bactericida (Moellering Jr, Wennersten, Weinberg, 1971). Os primeiros relatos de cepas altamente resistentes à penicilina começaram a surgir no final da década de 1980 (Bush *et al.*, 1989; Sapico *et al.*, 1989).

A resistência adquirida aos β-lactâmicos pode ser devida à alteração das PBPs, atribuindo um nível de resistência mais elevado (MIC ≥128 µg/mL) do que aquele referente à resistência intrínseca entre os enterococos. Esse mecanismo confere resistência a todos os β-lactâmicos, incluindo carbapenems (Murray, 1990; Jones & Sader, 1993).

Um segundo mecanismo de resistência adquirida pode ser resultante da síntese da enzima β-lactamase (Leclercq & Couvarlin, 1997). A primeira cepa de *E. faecalis* produtora de β-lactamase foi isolada em 1981 nos Estados Unidos, sendo, posteriormente, isolada na Argentina e no Líbano (Murray, 1992). A resistência resultante da produção desta enzima é rara, normalmente mediada por plasmídeo e podendo estar associada com o alto nível de resistência à gentamicina (Murray, 1992).

Os antibióticos glicopeptídicos inibem a síntese da parede celular em bactérias Gram-positivas, pela interação com o grupamento terminal D-alanina-D-alanina (D-ala-D-ala), das cadeias laterais do pentapeptídeo precursor do peptídeoglicano (Dutka-Malen *et al.*, 1990; Johnson *et al.*, 1990; Shlaes & Binczewski, 1990). Este grupo de antibiótico é bacteriostático contra os enterococos e sua tolerância tem

sido demonstrada (Mandell *et al.*, 1970; Krogstad & Parquette, 1980). Semelhante aos antimicrobianos ativos em parede celular, sua atividade bactericida é obtida quando este é combinado a um aminoglicosídeo (Mandell *et al.*, 1970; Krogstad & Parquette, 1980; Moellering Jr, 1991). Essa ação faz deste grupo de antibiótico, uma escolha apropriada para o tratamento de infecções graves por enterococos quando o uso de penicilina ou ampicilina é impedido por alergia ou resistência aos antibióticos β -lactâmicos (Mandell *et al.*, 1970; Krogstad & Parquette, 1980; Shlaes & Binczewski, 1990; Couvarlin, 1990; Moellering Jr, 1992).

Enterococos resistentes à vancomicina (VRE) não eram reconhecidos até 1988 quando relatos foram publicados na Inglaterra (Uttley *et al.*, 1988), França (Leclercq *et al.*, 1988) e Estados Unidos (Kaplan, Gilligan, Facklam, 1988). A partir de 1989, VRE passaram a ser identificados nos Estados Unidos através de um estudo realizado pelo “*National Nosocomial Infections Surveillance System*” - NNISS (CDC, 1993), no Reino Unido, França, Alemanha e Espanha (Uttley *et al.*, 1989; Woodford *et al.*, 1995; Woodford, 1998).

Estudos iniciais realizados com VRE classificaram esses microrganismos baseando-se nas características fenotípicas (Leclercq & Couvarlin, 1997). Primeiramente foram descritos os fenótipos VanA e VanB tanto para *E. faecalis* como para *E. faecium*. As características das cepas com fenótipo VanA são: alta resistência à vancomicina (CIM ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$) e resistência à teicoplanina variando de moderada a alta (CIM ≥ 16 $\mu\text{g/ml}$) (Leclercq *et al.*, 1988; Couvarlin, 1990). Este fenótipo é frequentemente mediado por um transposon, que é induzido pela presença de glicopeptídeos (vancomicina, teicoplanina, avoparcina e ristocetin) e por não-glicopeptídeos como bacitracina, polimixina B e robenidina. Estes últimos são antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções em frangos de granja (Lai, 1996). O fenótipo VanA tem sido ocasionalmente detectado em outras espécies, incluindo *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* e *E. durans* (Dutka-Malen *et al.*, 1994; Cercenado *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1995).

No fenótipo VanB as cepas apresentam um padrão de resistência para vancomicina cuja CIM pode variar de 4 a ≥ 1000 $\mu\text{g/ml}$, mas mantendo suscetibilidade à teicoplanina (Quintiliani, Evers, Couvarli, 1993; Boyce *et al.*, 1994). O fenótipo VanB se diferencia do VanA, por sofrer indução de resistência somente na presença da vancomicina e não na presença da teicoplanina.

Posteriormente aos fenótipos VanA e VanB, outros foram identificados como VanC, VanD e VanE. O fenótipo VanC apresenta baixo nível de resistência para vancomicina (CIM 4 a 32 $\mu\text{g/ml}$) e são suscetíveis à teicoplanina, sendo uma propriedade inerente das espécies *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* (Dutka-Malen *et al.*, 1994). Esta propriedade não é transferível e está relacionada com a presença de dois genes *vanC-1* e *vanC-2*, respectiva e diretamente relacionados às espécies. Estas espécies parecem apresentar duas ligases e com isso apresentam duas terminações para a formação do pentapeptídeo precursor da parede celular, D-ala-D-ala e D-ala-D-serina. A presença destes dois precursores poderia explicar

a ocorrência de cepas suscetíveis ou com baixo nível de resistência à vancomicina (Navarro & Couvarlin, 1994).

O fenótipo VanD foi detectado em uma cepa de *E. faecium*, que apresentou resistência moderada e constitutiva à vancomicina (CIM \geq 64 $\mu\text{g/ml}$), sendo baixo o nível de resistência para teicoplanina (CIM = 4 $\mu\text{g/ml}$). Esta resistência não é transferível para outro enterococo. O sequenciamento parcial do gene ligase deste fenótipo mostrou 69% de similaridade com os genes ligase *vanA* e *vanB* (Perichon, Reynolds, Couvarlin, 1997). Recentemente três cepas de *E. faecium* resistentes à vancomicina com fenótipo VanD foram isoladas em Boston (Ostrowsky *et al.*, 1999). O fenótipo VanE, foi descrito por Fines *et al.* (1999) e parece ser induzido e não, transferível, sendo detectado em uma cepa de *E. faecalis* que apresentou baixo nível de resistência à vancomicina (CIM = 16 $\mu\text{g/ml}$) e suscetibilidade à teicoplanina (CIM = 0,5 $\mu\text{g/ml}$). Este novo fenótipo tem similaridade com a resistência intrínseca do fenótipo VanC. O fenótipo VanG, descrito mais recentemente, foi detectado em uma cepa de *E. faecalis*, que apresentou moderado nível de resistência à vancomicina (CIM=16 $\mu\text{g/ml}$) e sensibilidade à teicoplanina, e nenhuma amplificação com a utilização de iniciadores específicos para os demais genótipos de resistência à vancomicina já descritos (Mc Kessar *et al.*, 2000).

Embora muito se tenha estudado sobre a epidemiologia do enterococo resistente à vancomicina (VRE), principalmente nos recentes anos, um consenso sobre qual seria o principal reservatório ainda não foi definido. Tem-se sugerido que a origem dos VRE é hospitalar, sendo posteriormente disseminados para a comunidade (Frieden *et al.*, 1993). Entretanto, uma cepa de *E. avium* resistente à vancomicina foi isolada de uma paciente de um hospital geral, no qual este antibiótico não vinha sendo utilizado há seis meses na rotina hospitalar (Rao *et al.*, 1992). Ademais, uma cepa de *E. faecium* resistente à vancomicina foi isolada de um paciente sem histórico de internação ou exposição a antibióticos (Gradon, 1994). Tais achados sugerem que a pressão seletiva que ocorre nos hospitais não é necessária para o surgimento de VRE. Os enterococos fazem parte da microbiota humana, portanto, tem sido reportado o isolamento de VRE em águas de esgoto (Klare *et al.*, 1993; Torres *et al.*, 1994; Bates, Jordens & Griffiths, 1994).

Bates *et al.* (1993) publicaram o primeiro relato sobre o isolamento de VRE fora do ambiente hospitalar, na área urbana da Inglaterra. Anos depois, os autores relataram o isolamento de VRE a partir de amostras de fezes de gado e de frangos não cozidos, comprados em lojas de varejo. Klare *et al.* (1993) relataram o isolamento de VRE em pequenas cidades da Alemanha, detectando-o em amostras de adubo originário de granjas ou fazendas de suínos. Em 1995, estes pesquisadores isolaram *E. faecium* VanA de carne de frangos e suínos congelados e de fezes humanas, de 12 entre 100 habitantes não hospitalizados, na área rural (Klare, Heier, Claus, Witte, 1995).

Posteriormente, Klare *et al.* (1995) sugeriram a relação do isolamento de VRE com o uso da avoparcina, um antibiótico do grupo dos glicopeptídeos, usado como

promotor de crescimento no interior da Europa. A associação entre o isolamento de VRE a partir de alimentos animais, especialmente aves, e o uso da avoparcina tem sido confirmado por estudos epidemiológicos na Dinamarca (Aarestrup, 1995; Aarestrup *et al.*, 1996), Noruega (Kruse & Rorvik, 1996) e Suíça (Bogaard *et al.*, 1996). A ligação entre colonização de animais, utilizados para produtos alimentícios, e de humanos por VRE foi sugerida por Bates *et al.* (1993), devido ao isolamento de VRE com ribotipos idênticos de amostras humanas e de carcaça de frangos (Klare *et al.*, 1993).

A detecção de VRE em animais, como frangos e suínos utilizados para produção de alimentos, representa um importante achado epidemiológico da colonização e infecção em humanos. Portanto, VRE podem estar presentes em pessoas que não estão associadas com o ambiente hospitalar, como descrito por vários estudos realizados na Europa (Jordens, Bates, Griffiths, 1994; Donnelly *et al.*, 1996).

Por outro lado, nos Estados Unidos o ambiente hospitalar parece ser o maior reservatório de VRE em pacientes portadores no TGI (Boyce, 1997). Por sua vez, em um estudo realizado no Texas não se isolou VRE das fezes e de carcaças de frango (Murray, 1995; Murray, 1997).

Existem poucas evidências que sugerem a transmissão de VRE de adultos sãos para a comunidade (Murray, 1995; Bais, Freundlich, Currie, 1996; Coque *et al.*, 1996). Entretanto, dois casos de aparente infecção urinária por VRE, adquirida na comunidade, na cidade de Nova York, foram reportados (Friden *et al.*, 1993).

Apesar da proibição nos Estados Unidos e em vários países da Europa, o uso da avoparcina como aditivo alimentar foi liberado no Brasil por um período de 10 anos. A partir de 1998, a avoparcina foi retirada da agricultura brasileira (Leme, Ferreira e Pignatari, 1999).

No Brasil há poucos estudos com o objetivo de avaliar a presença do VRE fora do ambiente hospitalar. Recentemente foi publicada a avaliação do perfil de sensibilidade aos glicopeptídeos de enterococos isolados de aves comerciais, realizada no período de 1996 a 1997, em aviários próximos a cidade de São Paulo (Leme *et al.*, 2000). A suscetibilidade à avoparcina, teicoplanina e vancomicina foi determinada em duzentos e dezessete amostras de enterococos, isoladas de fezes de frango. Não foi detectado VRE entre as amostras analisadas, porém observou-se um percentual alto no isolamento de *E. faecium* da microbiota fecal, em 52,8% dos frangos estudados. O isolamento de VRE a partir de fontes de alimento animal sugere que a transmissão para o homem por esta via possa ocorrer, porém provas conclusivas ainda não foram obtidas (Witte & Klare, 1995).

Superfícies de ambiente e equipamentos médicos do quarto aonde os pacientes se encontram frequentemente se tornam contaminados com VRE, podendo servir como um reservatório para o microrganismo hospitalar (Boyce *et al.*, 1994). Em poucas situações essa bactéria pode colonizar o trato gastrointestinal de profissionais da saúde, porém, o significado epidemiológico deste achado ainda não está claro (Handwerger *et al.*, 1993; Jordens, Bates, Griffiths, 1994).

A transmissão de VRE por profissionais da área da saúde, cujas mãos passam a estar temporariamente contaminadas com esta bactéria, para pacientes é possivelmente a forma mais comum de transmissão hospitalar (Huycke, Sham, Gilmore, 1998, Moellering Jr, 1992). Apesar da fonte, a transmissão pessoa a pessoa ou por fômites, tanto intra quanto inter-hospitalar, tem sido descrita na literatura (Murray, 1991; Karanfil *et al.*, 1992; Murray, 1992; Boyle, 1993).

A tetraciclina provavelmente penetra na célula bacteriana por difusão passiva e atua na subunidade ribossômica 30S, impedindo a ligação do tRNA, bloqueando o aporte de aminoácidos e resultando na inibição da síntese protéica. Um crescente número de espécies bacterianas tem adquirido resistência à atividade bacteriostática da tetraciclina (Fluit *et al.*, 2001). Essa resistência pode ser devido a alterações cromossômicas resultantes de mutação, afetando a permeabilidade da membrana externa ou adquirida, pela transferência de plasmídeos e transposons (Konemam, 1997; Quintiliani *et al.*, 1999). Diferentes genes conferindo resistência à tetraciclina têm sido encontrados, incluindo os genes *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO* e *tetS* (Burdett e col., 1982; Brunton, 1984; LeBlanc e col., 1988; Charpentier e col., 1993).

O cloranfenicol tem ação bacteriostática por inibição da síntese protéica. O antibiótico impede a ligação do RNA mensageiro ao ribossomo, por fixar-se na fração 30S do ribossomo, competindo com o ácido nucléico. Porém sua ação mais importante resulta de sua ligação a fração 50S do ribossomo, inibindo a ação da peptidiltransferase, bloqueando a união dos aminoácidos na formação do polipeptídeo (Murray, 1990; Tavares, 1996, Fluit e col., 2001).

O cloranfenicol é um antibiótico ativo contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Sua ampla atividade associada à facilidade de administração por via oral e relativo baixo custo, fizeram com que, juntamente com as tetraciclinas, tornasse um dos antibióticos mais utilizados na clínica (Murray, 1990; Tavares, 1996, Fluit *et al.*, 2001). O principal mecanismo químico da resistência ao cloranfenicol, consiste na sua inativação enzimática, pela enzima cloranfenicol-acetiltransferase, produzida pelo gene *cat*. Detecção de resistência ao cloranfenicol por técnicas de biologia molecular não têm sido estudadas (Fluit *et al.*, 2001). O segundo mecanismo de importância na resistência ao cloranfenicol baseia-se na impermeabilidade do microorganismo à droga (Murray, 1990; Tavares, 1996).

Como os demais antibióticos macrolídeos, a eritromicina é bacteriostática, podendo tornar-se bactericida em concentrações elevadas ou em contato com microorganismos extremamente sensíveis. Atua por inibição da síntese de proteínas quando se ligar à fração 50S do ribossomo. O principal mecanismo de resistência consiste na modificação da unidade 50S do ribossomo bacteriano. Em enterococos, a resistência à eritromicina é frequentemente mediada pelo gene *ermB*, seguido pelo gene *ermA* (Fluit *et al.*, 2001).

A quinupristina-dalfopristina é uma associação de duas estreptograminas, sendo uma do grupo A e uma do grupo B. Os componentes individuais têm ação

bacteriostática, porém quando associados a combinação é frequentemente bactericida. Estes antimicrobianos penetram na célula bacteriana via difusão passiva e ligam-se à subunidade 50S do ribossomo. A resistência às estreptograminas pode ser cromossômica ou mediada por plasmídeos. Uma bomba de efluxo conferindo resistência à dalfopristina aparenta ser uma característica intrínseca de *E. faecalis*. Por isso, esta combinação quinupristina-dalfopristina é frequentemente menos efetiva contra *E. faecalis* (Eliopoulos, 2003).

Os mecanismos de resistência bacteriana à estreptogramina B são difundidos entre os enterococos e mediados via gene *ermB*. Este mecanismo resulta na resistência da bactéria a todos os macrolídeos, lincosaminas e estreptograminas do grupo B, permanecendo sensíveis as estreptograminas do grupo A. (Eliopoulos, 2003).

A linezolida é o primeiro antibiótico da classe da oxazolidinona, e sua ação é bacteriostática. Atua por inibição da síntese de proteínas, ao ligar-se à fração 50S do ribossomo. O principal mecanismo de resistência consiste na modificação da unidade 50S do ribossoma bacteriano (Jones *et al.*, 2002).

PARTE II: PROGRAMA NACIONAL DE MONITORAMENTO DA PREVALÊNCIA E DA RESISTÊNCIA BACTERIANA EM FRANGO – Prebaf:

1 HISTÓRICO

O Prebaf – Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em frango surgiu como resultado das discussões do Grupo de Trabalho sobre Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos, instituído pela Anvisa através da Resolução-RDC nº 5/2000, foram apresentadas propostas e recomendações com foco na avaliação de risco quanto ao uso de medicamentos veterinários em animais produtores de alimentos. Tais proposições constam do documento de base denominado “Medicamentos Veterinários e Saúde Pública: uma Proposta de Ação para a Anvisa, aprovada em 2001 pela Diretoria Colegiada.

Destaca-se como principal recomendação para as ações de vigilância sanitária em relação ao assunto, a implantação de dois programas de monitoramento, sendo um para avaliação de resíduos, iniciado em 2002 como “Programa de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal – PAMVET, e outro para avaliação do perfil de resistência de bactérias isoladas em carne de frango, que foi traduzido no Prebaf relatado no presente documento. Especificamente em relação a este último, deveria ser instituído um programa de abrangência nacional, onde seria pesquisada a resistência de *Salmonella* e *Enterococcus* aos antimicrobianos em amostras colhidas no ponto de exposição ao consumo.

Com aprovação da Resolução-RDC Anvisa nº 12, de 02/01/01, que excluiu a obrigatoriedade da pesquisa de *Salmonella* spp. em carnes in natura de aves, devido as limitações tecnológicas que impossibilitam garantir a ausência desse microrganismo no produto, tornou-se necessário implementar um Programa Nacional capaz de determinar a prevalência e a quantificação das espécies do gênero *Salmonella* nesse tipo de carne, como subsídio para futuras opções de gerenciamento de risco microbiológico em relação ao alimentos em questão. Como contrapartida à exclusão do parâmetro *Salmonella* spp. determinou-se, por meio da Resolução-RDC nº 13, de 02/01/01, a exigência de apor dizeres de rotulagem, instruindo o consumidor sobre o adequado uso, preparo e conservação das carnes de aves.

Nesse contexto, o Prebaf foi desenhado pelas gerências envolvidas com o tema (GACTA e GICRA), tendo por foco a determinação da prevalência e quantificação das espécies do gênero *Salmonella* em carne de frango exposta ao consumo humano, bem como a verificação do cumprimento das disposições constantes da Resolução-RDC Anvisa nº 13/01. Ao mesmo tempo, num esforço para racionalizar recursos e otimizar resultados, definiu-se em um único Programa, por abordar também a pesquisa de prevalência e da resistência bacteriana de *Enterococcus* spp, a partir da mesma matriz de análise.

Nesse sentido, o presente documento fornece um detalhamento sobre o Programa, como parte da estratégia de ação da Anvisa para a área de alimentos, pautada nas parcerias com os Estados por meio das VISAs e LACENs.

2 INFORMAÇÕES TÉCNICAS

A prevenção da contaminação das aves apresenta como fatores limitantes a ampla distribuição da bactéria no ambiente e a existência frequente de portadores assintomáticos. Nenhum outro processo de tratamento, exceto irradiação ionizante, eliminará a salmonela da carcaça mantendo as características originais da carne crua com a manutenção das características das aves cruas. No entanto, a adoção de medidas higiênico-sanitárias no manuseio e processamento de aves, o controle de rações e alimentos desses animais, a rígida adoção de práticas higiênicas na criação, transporte e abate a distinta separação em nível industrial das operações com matérias-primas daquelas com produtos em processo ou terminados, a rigorosa adoção de programas de limpeza e desinfecção das instalações e equipamentos e a prevenção de contaminações cruzadas são medidas importantes que contribuem para a redução dos níveis de contaminação.

É crescente a preocupação mundial quanto ao aumento da resistência adquirida por espécies de bactérias a algumas moléculas com ação antimicrobiana de uso humano na produção de animais, reduzindo a disponibilidade de substâncias eficazes e indispensáveis ao tratamento e prevenção de doenças infecciosas. O aumento do uso dos antimicrobianos associados às inovações na tecnologia de produção, os novos métodos no processamento da carne de frango e sua grande comercialização contribuíram para o aumento da produtividade e a diminuição do tempo de produção e do custo. Por essa razão, esse alimento mais acessível passou a integrar significativamente a dieta brasileira e, conseqüentemente, aumentou a exposição do consumidor a agentes que podem significar um risco à saúde humana.

Os enterococos, por sua vez, são bactérias consideradas agentes comensais comumente isolados do intestino grosso dos seres humanos, animais e meio ambiente. Nos últimos anos, entretanto, as espécies *E. faecalis* e *E. faecium* têm provocado surtos hospitalares de difícil controle, podendo causar infecções com limitadas opções terapêuticas, notadamente no caso de cepas resistentes a antimicrobianos tais como beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e glicopeptídeos. Estudos sobre a cadeia epidemiológica dos enterococos têm mostrado que animais produtores de alimento podem formar reservatórios de enterococos resistentes e contribuir, assim, para a disseminação da bactéria. Nesse sentido, enterococos resistentes têm sido isolados em carne de frango expostas ao consumo humano em diversos países.

Qualquer alimento que contém *Salmonella* é um risco potencial para o consumidor, cuja veiculação é facilitada, na atualidade, pela mudança nos hábitos alimentares da população. A necessidade cada vez mais intensa de produção/oferta de alimentos tem como fatores de risco, falhas quanto ao manuseio, transporte muitas

vezes em condições inadequadas, aliados à ausência de critérios básicos de higiene e saneamento, os quais favorecem a disseminação (OMS,1988).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Elaboração de diagnóstico sobre os níveis de contaminação de *Salmonella spp* e *Enterococcus spp* em carne de frango comercializada no Brasil e a propagação de resistência antimicrobiana, com vistas a definição de medidas de intervenção.

3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a prevalência, o número de organismos e o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de cepas de *Salmonella spp.* isoladas em carcaças de frango congeladas expostas ao consumo.
- Avaliar o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de cepas de *Enterococcus spp.* isoladas em carcaças de frango congeladas expostas ao consumo.
- Verificar a adequação dos dizeres de rotulagem do produto quanto às exigências legais, com destaque à Resolução - RDC Anvisa nº 13/01.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Plano amostral

4.1.1. Cobertura e período de execução

O Prebaf foi executado no período de agosto/2004 a julho/2006 em 13 Estados e no Distrito Federal (Alagoas, Amapá, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo: Capital e Ribeirão Preto), cobrindo, portanto, as cinco grandes regiões do Brasil conforme ilustrado na **Figura 1**. Esses Estados respondem em conjunto por 83% da produção brasileira de frango, que em 2005 foi da ordem de 4,42 bilhões de cabeças (Fonte: MAPA, IBGE). Assim, as amostras foram coletadas pelos órgãos de vigilâncias sanitárias (VISA) de todas as regiões do Brasil, compreendendo, na região Norte, o Amapá (AP); na Nordeste, Alagoas (AL), Ceará (CE) e Rio Grande do Norte (RN); na Centro-Oeste, o Distrito Federal (DF), Goiás (GO) e Mato Grosso do Sul (MS); na Sudeste, o Espírito Santo (ES), Minas Gerais (MG), Rio de Janeiro (RJ) e São Paulo (capital e município de Ribeirão Preto); e na Sul, Paraná (PR), Santa Catarina (SC) e Rio Grande do Sul (RS).

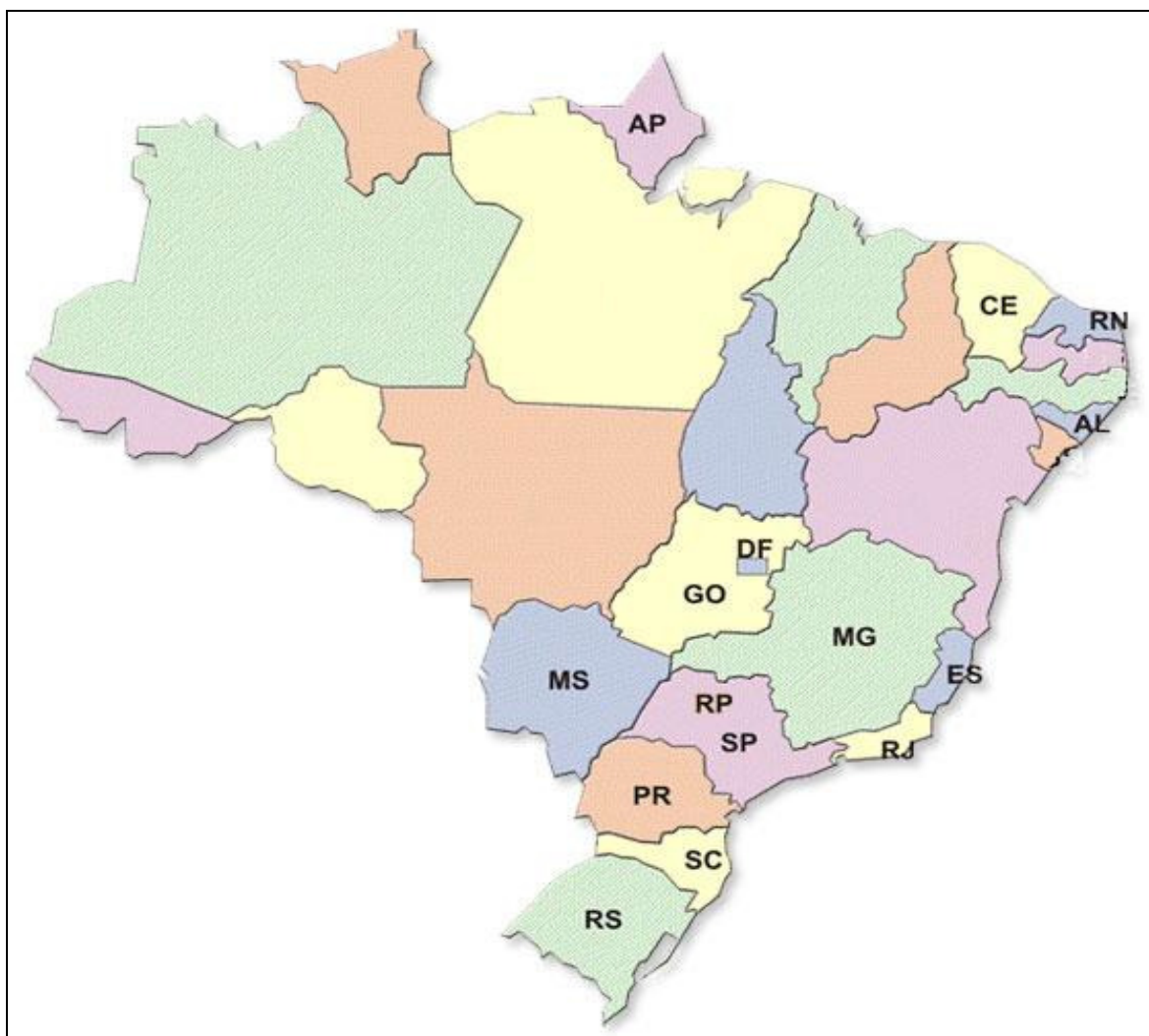


Figura 1. Órgãos de vigilância sanitária que coletaram amostras para execução do Prebaf. 2004-2006.

4.1.2. Número e tipo de amostras

Neste programa de monitoramento, os parâmetros selecionados foram a prevalência esperada de 10%, um nível de confiança de 90% e margem de erro admitido de 1%. Isso significaria processar 2429 unidades amostrais utilizando-se como referência o **Quadro 5**. Foi definida como meta para cada estado a colheita de 10 unidades amostrais de frango por mês, durante um ano e meio (18 meses). Em São Paulo a meta estabelecida foi de 20 unidades amostrais/mês, distribuídas entre a capital e a cidade de Ribeirão Preto. Com isso o número total de unidades amostrais foi de 2710, dando-se assim uma margem maior à representatividade da pesquisa.

Quadro 5. Número de amostras em função da prevalência de resistência esperada na população.

Prevalência Esperada	Nível de confiança					
	90%			95%		
	Margem de erro admitida			Margem de erro admitida		
	10%	5%	1%	10%	5%	1%
10%	24	97	2429	35	138	3445
20%	43	173	4310	61	246	6109
30%	57	227	5650	81	323	8003
40%	65	260	6451	92	369	9135
50%	68	270	6718	96	384	9512
60%	65	260	6451	92	369	9135
70%	57	227	5650	81	323	8003
80%	43	173	4310	61	246	6109
90%	24	97	2429	35	138	3445

Fonte: OIE (2000).

4.2. PROCEDIMENTOS DE AMOSTRAGEM E DE ANÁLISE

Os procedimentos de colheita e amostragem foram realizados pelas VISAs e estavam descritos no POP específico: Colheita de Amostras e Medidas de Intervenção – GICRA/GGALI, onde constavam as seguintes informações:

- Marca;
- Fabricante;
- Endereço;
- Local de coleta;
- Endereço;
- Adequação (ou não) aos dizeres de rotulagem;
- *Salmonella* (ausência ou presença);
- *Enterococcus* em análises com e sem vancomicina (presença ou ausência).

Os dados recebidos foram tabelados utilizando-se o programa Epi-Info (™) - Database and statistics software for public health professionals. Versão 26/04/2004.

As amostras para pesquisa de salmonela foram recebidas e processadas conforme estabelecido no Procedimento Operacional Padrão – POP, do INCQS: Recepção e Processamento Inicial de Amostras de Carcaças Congeladas de Frango. Cada unidade do produto foi analisada individualmente, não sendo possível a mistura das alíquotas retiradas de cada unidade amostral. Uma das 05 unidades de amostra de mesma marca foi analisada utilizando-se metodologia quantitativa conforme descrito no POP do INCQS: Pesquisa e Contagem de *Salmonella* spp. em Carcaças Congeladas de Frango. As demais amostras colhidas foram analisadas seguindo somente a metodologia qualitativa, descrita no POP acima.

As amostras para pesquisa de enterococos foram analisadas utilizando-se metodologia qualitativa conforme descrito no POP do IAL: Pesquisa de *Enterococcus* spp. em Carcaças Congeladas de Frango.

As cepas isoladas de *Salmonella* e *Enterococcus* foram encaminhadas, respectivamente, ao Instituto Oswaldo Cruz – IOC e Instituto Adolfo Lutz – IAL, de acordo com os respectivos POPs (Manutenção de Cepa de Enterococo para ser Enviada ao Laboratório de Referência e Transporte de substâncias infecciosas para o laboratório de referência).

Em relação à rotulagem, o Laboratório encaminhou os laudos sobre a análise de rotulagem para a VISA responsável pela colheita da amostra, seguindo as instruções constantes do POP: Colheita de Amostras e Medidas de Intervenção – GICRA/GGALI.

Para a análise de *Salmonella* spp., cada laboratório enviou mensalmente as planilhas com os resultados das análises quantitativas e qualitativas para a VISA do estado correspondente, que seguiu as instruções constantes do POP: Colheita de Amostras e Medidas de Intervenção – GICRA/GGALI. A VISA, por sua vez, encaminhou as planilhas para GGALI/ANVISA, que consolidou os resultados. Quanto aos resultados referentes à identificação de espécies, caracterização de sorovares, perfil bem como identificação dos genes de resistência, o Laboratório de Enterobactérias do IOC os encaminhou à GGALI/ANVISA e ao LACEN do estado correspondente às cepas recebidas.

Na análise de *Enterococcus* spp. o fluxo foi idêntico ao de *Salmonella* spp., sendo que as análises de identificação das espécies e do perfil e genes de resistência a vancomicina foram realizadas pelo IAL/SP.

A suscetibilidade aos antimicrobianos de *Enterococcus* spp. e *Salmonella* spp. foi avaliada por meio da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por microdiluição em caldo, com base na metodologia recomendada pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI/NCCLS , 2004, 2005 e 2006).

A escolha dos antimicrobianos testados foi baseada nos seguintes critérios:

- importância de seu uso em medicina humana;
- situação de resistência ocorrente e de interesse do país;
- utilização de antimicrobianos em medicina veterinária que possa desenvolver resistência cruzada aqueles de uso em medicina humana.

Para avaliação da suscetibilidade de *Salmonella* spp. e *Enterococcus* spp., originalmente foram selecionados os seguintes antimicrobianos:

Para *Salmonella* spp.: ampicilina, ceftriaxona, ceftazidima, cefepime, tetraciclina, amoxicilina/ác. clavulâmico, gentamicina, estreptomina, cloranfenicol, florfenicol, sulfonamida, trimetoprim, sulfametoxazol/trimetoprim, ác. nalidixico, ciprofloxacina, enrofloxacina, imipenem, nitrofurantoína, cefalotina, cefoxitina, ceftiofur, cefuroxima e aztreonam.

Para *Enterococcus* spp.: ampicilina, vancomicina, teicoplanina, gentamicina, estreptomina, ciprofloxacina, eritromicina, cloranfenicol, tetraciclina, linezolida e quinopristina/dalfopristina.

As cepas de enterococos foram armazenadas após processo de liofilização e as de salmonela em meio de caldo BHI acrescido de 15% de glicerol, a – 70°C.

4.3. PLANO DE ANÁLISE DE SALMONELAS

4.3.1 Recebimento das amostras

As cepas identificadas presuntivamente como *Salmonella* spp., pelos Laboratórios de Saúde Pública estaduais (LACEN) ou municipal (IAL- Ribeirão Preto) participantes do programa, foram encaminhadas para o Laboratório de Enterobacterias/IOC/FIOCRUZ, para caracterização fenotípica e genotípica. Na primeira, identificação do perfil bioquímico e antigênico conclusivos, suscetibilidade antimicrobiana e sensibilidade ao painel de fagos específicos; na avaliação genotípica, caracterização dos genes e integrons de resistência antimicrobiana. Após a recepção, todas as informações recebidas foram inseridas em banco de dados (Excel).

As cepas foram remetidas em meio de conservação, Agar Nutriente Tamponado à temperatura ambiente, dentro das normas internacionais de transporte de amostras para diagnóstico (UN 3373).

4.3.2 Reisolamento e identificação bioquímica

Partindo do meio de conservação, as cepas foram inicialmente reisoladas, a partir do crescimento em Caldo Nutriente e, após incubação 18-24h/37°C, semeadura em Agar Entérico Hektoen. Em etapa subsequente, procedeu-se caracterização de gênero e espécies, através da confirmação bioquímica presuntiva em meio de triagem de Costa & Vernin (Costa & Holfer, 1972) e Agar Lisina-Ferro a partir dos quais foi avaliado seu perfil metabólico. Para tal foram avaliadas as características quanto a fermentação de carboidratos e correlatos tais como: lactose, manitol, dulcitol, salicina e sacarose; descarboxilação da lisina e ornitina; produção de indol, mobilidade e sulfeto de hidrogênio em meio de SIM, produção de ONPG, utilização do citrato, tartarato, malonato, o qual permitiu a identificação conclusiva do gênero e da espécie. Paralelamente as cepas foram transferidas para meio de conservação (caldo BHI/glicerol) e mantidas a temperatura de -70°C.

4.3.3 Caracterização antigênica

Culturas com perfil compatível com *Salmonella* spp. foram submetidas a caracterização antigênica, reconhecendo-se suas frações somáticas e flagelares eventualmente presentes. Esta foi realizada através da técnica de soro-aglutinação rápida, em lâmina, com antissoros poli e monovalentes, somáticos e flagelares,

preparados no Laboratório Referência Nacional de Cólera & outras Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

4.3.4 Fagotipagem

A fagotipagem foi realizada empregando-se os preparados fágicos específicos para cada sorovar, gentilmente cedidos pelo Public Health Laboratory Service, Centro de Referência Internacional de Fagotipagem (Colindale, Inglaterra). De um modo geral, a técnica de fagotipagem consiste na exposição da cultura bacteriana a uma coleção definida de bacteriófagos (preparados fágicos) e sua caracterização de acordo com os padrões de suscetibilidade apresentados (Callow, 1959; Anderson *et al.*, 1977; Ward *et al.*, 1987; De Sá *et al.*, 1980).

Para tal, as cepas foram submetidas ao crescimento em caldo Fago, incubados a 37°C. Ao atingirem turbidez semelhante ao tubo nº 2 da escala de MacFarland foi efetuada a semeadura em Agar Fago e em seguida, gotejados 10µL de cada um dos preparados fágicos. Após absorção, foi efetuada a incubação a 37°C/18h e leitura da lise (confluyente, opaca, semiconfluyente e número de placas de lise).

4.3.5 Perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos

O perfil de resistência aos antimicrobianos foi avaliado através da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por microdiluição em caldo, com base na metodologia descrita pelo CLSI (2004-2006), tendo sido utilizado 23 fármacos representativos das classes de antimicrobianos: beta-lactâmicos (penicilinas, monobactâmicos, cefaloporinas (1^a, 2^a e 3^a gerações); fenicóis; tetraciclinas; quinolonas; aminoglicosídeos; antifolatos e nitrofuranos discriminados no **Quadro 6**. O critério de escolha tomou por base drogas que são utilizadas sob o ponto de vista humano e veterinário e a orientação da OMS (CLSI, 2004-2006), quanto aos antimicrobianos utilizados no monitoramento da resistência bacteriana. Para o controle na qualidade de execução e confiabilidade dos resultados obtidos, cepas padrão (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) foram testadas sob as mesmas condições de cultivo e incubação (CLSI, 2004-2006).

Quadro 6. Antimicrobianos utilizados na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

ANTIMICROBIANOS		SIGLA	
Fenicois	Florfenicol	FFC	
	Cloranfenicol	CHL	
Betalactâmicos	Penicilinas	Ampicilina	AMP
		Amoxicilina + Ác.Clavulânico	AMC
	Cefalosporinas	Cefalotina	CEP
		Cefoxitina	FOX
		Ceftriaxona	CRO
		Ceftiofur	TIO
		Ceftazidima	CAZ
		Cefuroxima	CXM
		Cefepime	FEP
	Monobactâmicos	Aztreonam	ATM
	Carbapenens	Imipenem	IPM
	Aminoglicosídeos	Estreptomicina	STR
		Gentamicina	GEN
Quinolonas	Ácido nalidixico	NAL	
	Ciprofloxacina	CIP	
	Enrofloxacina	ENR	
Tetraciclinas	Tetraciclina	TCY	
Antifolatos	Sulfonamida	SSS	
	Trimetoprim	TMP	
	Sulfametoxazol-trimetoprim	SXT	
Nitrofuranos	Nitrofurantoina	NIT	

4.3.6 Detecção dos genes de resistência em *Salmonella*

O teste da PCR foi empregado para a identificação de genes codificantes de resistência aos betalactâmicos, particularmente cefalosporinas de 3ª geração, de uso humano e veterinário, sulfonamidas, trimetoprim, tetraciclina e estreptomicina, tendo sido analisadas as cepas de *S. Enteritidis*, *S. Mbandaka*, *S. Schwarzengrund*, *S. Minnesota*, *S. Heidelberg* (14), *S. Infantis* (17), *S.*

Thyphimurium (8) e *S. Argona* (9), adotando como critério de seleção o perfil de resistência das cepas aos antimicrobianos correspondentes ao grupo de genes analisados.

O DNA foi extraído como kit QIAGEN após o crescimento das culturas a 35°C em agar Muller-Hintonr. Foram utilizados os primers discriminados no **Quadro 7**. A mistura inclui 1,0 µM dos primers, 1 x *Taq* polymerase buffer, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada nucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP, e dTTP) (Gibco BRL, Burlington, Ontário), 0,025 U/µl *Taq* polymerase (Gibco BRL, Burlington, Ontário), e aproximadamente 1 µg do DNA. As condições de amplificação foram 94°C/10 minutos, 1 ciclo; 94°C/1 minuto, 56°C/1 minuto, 72°C/2 minutos, 35 ciclos. Em sequência foi efetuada a corrida eletroforética em agarose a 1% a 100 V por 1 h. A visualização da migração das bandas foi obtida através da coloração com solução de brometo de etídio (1%) sob UV. O padrão de peso molecular de 100-bp ou 1-kb ladder (GIBCO BRL) foi usado para estimar o tamanho do amplicom.

Quadro 7. *Primers* empregados para caracterização dos genes de resistência.

Gene	Sequências
<i>bla</i> _{CMY-2}	5'- GACAGCCTCTTTCTCCACA-3' 3'- TGGAACGAAGGCTACGTA-5'
<i>bla</i> _{ACC-1}	5' - CACCGAAGCCGTTAGTTGAT-3' 3' - GACACCGTTGATGACCTGAT-5'
<i>bla</i> _{TEM-1}	5'- ATAAAATTCTTGAAGACGAAA-3' 3'- GACAGTTACCAATGCTTAATCA-5'
<i>bla</i> _{SHV}	5'- ATGCGTTATATTCGCCTGTG-3' 3'- TGCTTTGTTATTCGGGCCAA-5'
<i>bla</i> _{CTX-M}	5'- TGCAGYACCAGTAARGTKATGG-3' 3'- AARTARGTSACCAGAAAYCAGCG-3'
<i>suII</i>	CAC CGC GGC GAT CGA AAT GC; GGT TTC CGA GAA GGT GAT
<i>suII</i>	ATC GCT CAT CAT TTT CGG CA; CTC GTG TGT GCG CAT GAA GT
<i>aadA1</i>	GCG CTA AAT GAA ACC TTA AC; TCG CCT TTC ACG TAG TGG AC
<i>Integron</i> <i>5'CS/3'CS</i>	GGC ATC CAA GCA GCA AG; AAG CAG ACT TGA CCT GA
<i>floR</i>	5'-CTG AGG GTG TCG TCA TCT AC-3', 5'-GCT CCG ACA ATG CTG ACT AT-3'

4.4 PLANO DE ANÁLISE DE ENTEROCOCOS

4.4.1 Recebimento das amostras

As amostras com identificação presuntiva para o gênero *Enterococcus* spp. identificadas pelos Lacen foram recebidas pelo IAL, foram numeradas e catalogadas em um banco de dados preparado para o Prebaf no programa EPI-INFO (versão 6.04d). Após a numeração, as cepas foram reisoladas em meio de cultura de ágar sangue com azida distribuído em placa para verificação de pureza e para seleção de uma colônia para prosseguir as etapas de identificação, teste de suscetibilidade antimicrobiana e pesquisa de gene de resistência para vancomicina. Cepas padrão foram utilizadas como controle nos testes fenotípicos e genotípicos: *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecium* 228 (*vanA*), *E. faecalis* ATCC 51299 (*vanB*), *E. gallinarum* NCTC 12359 (*van-C1*) e *E. casseliflavus* NCTC 1261 (*vanC-2*).

4.4.2 Identificação

A identificação das amostras em gênero e espécie segue as provas bioquímicas padronizadas internacionalmente por Facklam & Carey (1985); Facklam & Collins (1989); Facklam & Sahm (1995) e Facklam & Teixeira (2003).

Após confirmação da espécie bacteriana, as amostras de enterococos foram liofilizadas (High Vacuum Freeze Dryer Super Modulyo, Edwards, Sussex, Inglaterra) em leite desnatado a 10% e mantidas também congeladas em freezer a menos 20 °C e devidamente catalogadas.

4.4.3 Ensaios de determinação

Para os ensaios de determinação da CIM, utilizou-se a técnica de microdiluição em caldo, conforme recomendações do CLSI (2006). As cepas foram avaliadas frente a onze antimicrobianos: vancomicina (VAN), teicoplanina (TEC), ampicilina (AMP), ciprofloxacina (CIP), tetraciclina (TCY), eritromicina (ERI), cloranfenicol (CHL), linezolida (LNZ) e quinupristina-dalfopristina (QDA). Todas as cepas foram testadas para a detecção de alto nível de resistência aos aminoglicosídeos, gentamicina (GEH) e estreptomina (STH), conforme técnica descrita pelo manual CLSI (2006).

4.4.4 Caracterização genética

A caracterização genética das espécies *E. faecalis* e *E. faecium*, pela detecção de genes específicos para cada espécie foi realizada pela técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR), utilizada para amplificação dos genes *ddl* que codificam as ligases D-alanina, espécie-específicos (Dutka-Malen e col. 1995). Para a confirmação genética do fenótipo VanA geneticamente foi também utilizada a técnica da PCR. Utilizaram-se sondas dos genes *vanA* (Dutka-Malen *et al.*, 1990) assim como, as sondas para *vanB* (Quintiliani, Evers, Couvarlin, 1993), *vanC-1* e *vanC-2* específicos para *E. gallinarum* (Leclercq *et al.*, 1992), *E. casseliflavus* (Navarro & Couvarlin, 1994) respectivamente.

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. RESULTADO CONSOLIDADO DOS ESTADOS (VISA e LACEN)

A meta global de colheita e análise de carcaças congeladas de frango, segundo as metodologias definidas no Manual de Procedimentos do Prebaf, foi plenamente alcançada. Um total de 2.710 unidades amostrais de carcaças de frango congelados que correspondem a 542 amostras, foram analisadas pelos 14 Lacens.

Conforme o plano de trabalho apresentado no item 4.2 do item Material e Métodos, todas as 542 amostras foram analisadas quanto a rotulagem do produto. Conforme dados apresentados na **Tabela 1** podemos observar que 88% das amostras analisadas apresentaram dizeres do rótulo de maneira satisfatória, indicando um aumento no percentual de adequação à legislação de referência, conforme observado até 2005 que era de 82%. As empresas cujas marcas apresentaram rótulos insatisfatórios (9%) e inconclusivos (3%) foram notificadas. As amostras analisadas pelos Lacen do Amapá, Distrito Federal, Mato Grosso do sul, Paraná, Rio Grande do Norte e São Paulo – capital, apresentaram 100% de satisfação quanto aos dizeres de seus rótulos, enquanto as amostras analisadas pelos outros nove Lacens apresentaram um grau de satisfação de rotulagem que variou de 64 a 92%, sendo respectivamente amostras analisadas no Lacen do espírito santo e Santa Catarina.

Um total de 44 notificações foi enviado às empresas responsáveis, solicitando a adequação dos respectivos rótulos. Apenas 26 (59%) das empresas notificadas atenderam as disposições estabelecidas. Os laudos com os resultados insatisfatórios das 18 empresas (41%) que não responderam às notificações da Anvisa e/ou da VISA estadual, foram encaminhados ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA para as providências cabíveis junto aos estabelecimentos produtores sob inspeção daquele Ministério (**Tabela 2**).

A emissão de notificações origina-se da coleta de dados de programas nacionais coordenados pela Anvisa, como o Prebaf, e do recebimento de denúncias de usuários, de entidades de defesa do consumidor, do setor produtivo, de órgãos de saúde, dentre outros. Definiu-se nesse programa que a GICRA/ANVISA seria responsável por emitir as notificações às empresas produtoras de frango, sempre que na análise de rótulos fosse constatada inconformidade com a RDC nº 13/2001.

Um total de 104 marcas foi analisado e no **Figura 2** podemos destacar a frequência de marcas comercializadas em cada estado e que foram analisadas pelos respectivos Lacen. Podemos observar que no mínimo 7 e no máximo 21 marcas diferentes foram analisadas por cada laboratório, perfazendo uma média de 13 marcas por estado. Entre as marcas analisadas foi verificado que 17 estados são responsáveis pela produção como Alagoas, Amapá, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do sul, Pará, Pernambuco, Paraná, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul e São Paulo.

Tabela 1. Emissão de laudos e análise de rotulagem das 542 amostras de carcaças de frango congeladas analisadas pelos Lacen participantes.

Lacen	Nº de laudos* emitidos	Conclusão do Laudo			Total de unidades amostrais analisadas
		Satisfatório (%)	Insatisfatório (%)	Inconclusivo (%)	
Alagoas	36	28(78)	3 (8)	5 (14)	180
Amapá	40	40(100)	0	0	200
Ceará	36	28(78)	8(22)	0	180
Distrito Federal	36	36(100)	0	0	180
Espírito Santo	28	18(64)	9(32)	1(4)	140
Goiás	38	33(87)	5(13)	0	190
Mato Grosso do Sul	38	38(100)	0	0	190
Minas Gerais	36	26(72)	9(25)	1(3)	180
Paraná	36	36(100)	0	0	180
Rio de Janeiro	38	29(76)	9(24)	0	190
Rio Grande do Norte	36	36(100)	0	0	180
Rio Grande do Sul	36	27(75)	1(3)	8(22)	180
Santa Catarina	36	33(92)	3(8)	0	180
São Paulo – capital	36	36(100)	0	0	180
São Paulo – Ribeirão Preto	36	31(86)	5(14)	0	180
TOTAL	542	475(88)	52(9)	15(3)	2.710

*Cada laudo corresponde à análise de 5 unidades amostrais de mesma marca e lote.

Tabela 2. Estados produtores que foram notificados para adequação da rotulagem conforme a RDC nº 13/2001.

Estado Produtor	Nº de notificações	Adequaram	Não adequaram
AL	1	0	1
CE	2	2	0
DF	2	2	0
ES	1	0	1
GO	5	2	3
MG	11	3	8
MS	1	1	0
PE	2	2	0
PR	7	5	2
RS	3	3	0
SC	3	2	1
SP	6	4	2
TOTAL	44	26	18

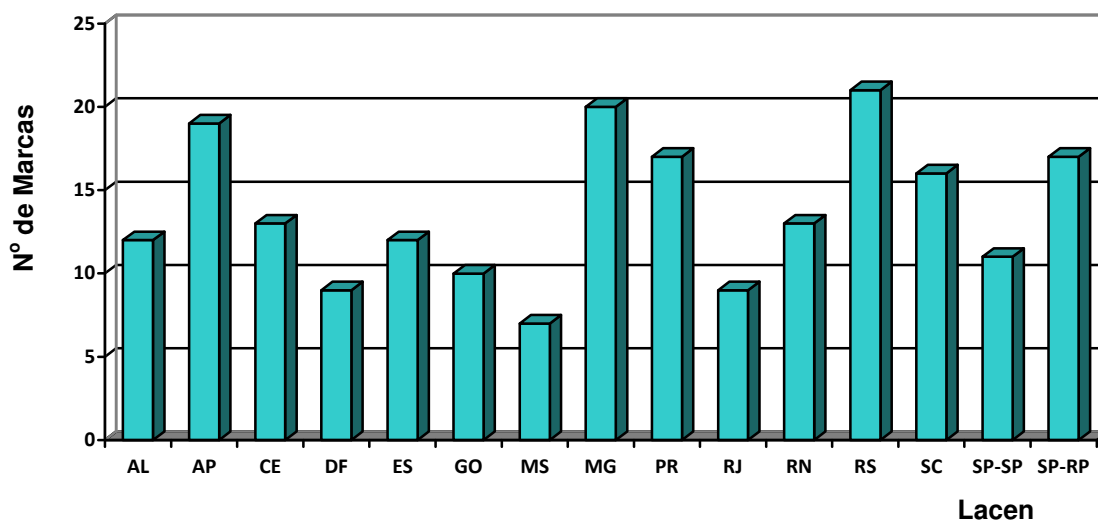


Figura 2. Frequência de marcas comercializadas em cada estado e que foram analisadas pelos respectivos Lacen.

Conforme a **Tabela 3**, as 2.710 unidades amostrais foram analisadas pelos 14 Lacens quanto a presença ou ausência de *Salmonella* tendo sido observada baixa frequência (3%) de isolamento.

Tabela 3. Positividade de *Salmonella* spp. do total de amostras analisadas pelos Lacen participantes.

Lacem	Nº de Unidades amostrais positivas (%)	Total de unidades amostrais analisadas (Nº)
Alagoas	8 (4%)	180
Amapá	6 (3%)	200
Ceará	5 (3%)	180
Distrito Federal	3 (2%)	180
Espírito Santo	0 (0%)	140
Goiás	0 (0%)	190
Mato Grosso do Sul	5 (3%)	190
Minas Gerais	3 (2%)	180
Paraná	2 (1%)	180
Rio de Janeiro	3 (2%)	190
Rio Grande do Norte	2 (1%)	180
Rio Grande do Sul	8 (4%)	180
Santa Catarina	6 (3%)	180
São Paulo - capital	16 (9%)	180
São Paulo – Ribeirão Preto	10 (5%)	180
TOTAL	77 (3%)	2.710

Quanto a avaliação da presença de enterococos nas unidades amostrais, podemos observar uma elevada frequência de isolamento em 95% das unidades analisadas (**Tabela 4**). A pesquisa de enterococos também utilizando um meio de cultura seletivo, com 6 µg/ml de vancomicina, com o objetivo de favorecer o crescimento de cepas com resistência à vancomicina, por isso foi verificada uma menor frequência de isolamento neste meio de cultura (61%).

Tabela 4. Positividade de *Enterococcus* spp. em diferentes meios de cultura no total de amostras analisadas por Lacen participantes.

Lacen	Ágar sem Vancomicina Nº de Unidades amostrais positivas (%)	Ágar com Vancomicina Nº de Unidades amostrais positivas (%)	Total de unidades amostrais analisadas (Nº)
Alagoas	160 (89%)	109 (60%)	180
Amapá	174 (87%)	83 (41%)	200
Ceará	174 (97%)	71 (40%)	180
Distrito Federal	152 (86%)	123 (70%)	177
Espírito Santo	140 (100%)	134 (96%)	140
Goiás	189 (99%)	29 (15%)	190
Mato Grosso do Sul	190 (100%)	136 (72%)	190
Minas Gerais	178 (99%)	140 (78%)	180
Paraná	135 (75%)	26 (14%)	180
Rio de Janeiro	190 (100%)	126 (66%)	190
Rio Grande do Norte	180 (100%)	124 (69%)	180
Rio Grande do Sul	180 (100%)	165 (92%)	180
Santa Catarina	169 (94%)	69 (38%)	180
São Paulo - capital	180 (100%)	161 (89%)	180
São Paulo – Ribeirão Preto	178 (99%)	164 (91%)	180
TOTAL	2.569 (95%)	1.660 (61%)	2.707

5.2 ANÁLISES ESPECÍFICAS REALIZADAS PELOS LABORATÓRIOS DE REFERÊNCIA - IOC E IAL/SP

5.2.1 Salmonela

O Brasil é uma potência mundial na criação de frangos de corte e na exportação de carne de aves e, ainda, possui um *status* sanitário de excelência por ser um país livre de doenças, como a influenza aviária. Neste contexto, os produtos de origem animal devem atender às normas de segurança alimentar tanto visando o mercado interno como o externo.

Várias propostas vêm sendo adotadas para reduzir a incidência de patógenos desde as primeiras fases do ciclo de produção, passando pelo transporte, espera e abate das aves. Os produtos de exclusão competitiva, propióticos, desinfetantes, vacinas e ácidos orgânicos (acético, fórmico, láctico, cítrico, butírico, propiônico e outros) são ferramentas amplamente utilizadas em avicultura, por tornar-se uma alternativa aos antibióticos promotores do crescimento. Da mesma forma, procedimentos nas operações de processamento, tais como cloração e aquecimento de superfície, aplicação de *sprays* de ácidos orgânicos (acético,

fórmico, lático) em carcaças, podem ser úteis na redução da contaminação (Brasil, 2002: Ferreira & Astolfi-Ferreira, 2006).

Apesar do grande controle sanitário brasileiro, existem patógenos que necessitam de constantes e maiores estudos, principalmente aqueles que causam infecção humana, onde *Salmonella* spp. se destaca por sua elevada casuística, adaptabilidade e facilidade de aquisição de resistência antimicrobiana, tendo representado um dos objetivos do Prebaf.

No computo geral foram recebidas 262 cepas, resultantes da análise de 2.710 unidades amostrais correspondentes a 542 coletas, efetuadas no período de 22/09/2004 a 28/07/2006 pelos dezesseis laboratórios participantes do Prebaf. A caracterização antigênica dos isolados permitiu confirmar a identificação de 250 cepas como *Salmonella* spp., cuja distribuição de acordo com o laboratório remetente encontra-se no **Tabela 5**.

Tabela 5. Frequência e distribuição das cepas de *Salmonella* spp. confirmadas bioquimicamente e antigenicamente de acordo com o laboratório remetente

LABORATÓRIOS (LACEN)	ANO			TOTAL DE CEPAS
	2004	2005	2006	
LACEN-AL	-	-	12	12
LACEN-AP	4	7	18	29
LACEN-CE	-	9	4	13
LACEN-DF	-	10	-	10
LACEN-GO	-	3	-	3
LACEN-MG	2	-	8	10
LACEN-MS	-	9	4	13
LACEN-PR	-	2	-	2
LACEN-RJ	10	-	-	10
LACEN-RN	11	-	3	14
LACEN-RS	-	12	-	12
LACEN-SC	-	-	16	16
IAL-SP	-	39	29	68
IAL- Ribeirão Preto	12	26	-	38
TOTAL	39	117	94	250

As 250 cepas, correspondem a 43 (7,9%) coletas positivas do total de 542 efetuadas. No computo geral o isolamento de *Salmonella* spp. foi efetuado em 79 (2,9%) de um total de 2.710 unidades amostrais (dados não apresentados em tabela).

A literatura evidencia taxas variáveis de contaminação por *Salmonella* em carcaças de frango destacando-se percentuais elevados observados por Uyttendaele *et al* (1999), na Bélgica (36,5%), Mikolajczyk & Radkowski, (2002), na Polônia (23,7%), Capita *et al* (2003), na Espanha (55%) e Letellier *et al* (2006), no Canadá (21,2%) em contraposição àqueles obtidos por Dordari (2006), no Iran (3,0%), Sajid (2006), no Paquistão (6,35%) e Hoszowski & Wasyl (2006), na Polônia (8,6%).

Estudos realizados no Brasil reportando o isolamento de *Salmonella* em carcaças de frangos congeladas ou resfriadas, salientam-se os trabalhos de Machado *et al* (1974) e Nascimento (1996), em Santa Catarina, que obtiveram índices de 13,3% e 17,36%, respectivamente; Gonçalves *et al* (1998), Barreto & Ramos (1999) e Silva *et al* (2006), no Rio de Janeiro (26,67%, 14,29%, 22,8%, respectivamente); Santos *et al* (2000), Fuzihara *et al* (2000), Hoffmann *et al* (2002), Matheus *et al* (2003) e Tessari *et al* (2003), em São Paulo (32%, 42%, 28,6%, 5,9% e 13,3%); Silva *et al* (2002), Paraíba (71,7%), Salles *et al* (2002), no Ceará (23,91%) e Tirolli & Costa (2006), no Amazonas (50%).

A caracterização genética permitiu a identificação de 18 sorovares, (*S. Agona*, *S. Enteritidis*, *S. Gaminara*, *S. Give*, *S. Heidelberg*, *S. Infantis*, *S. Lexington*, *S. Mbandaka*, *S. Minnesota*, *S. Newport*, *S. Ohio*, *S. Panama*, *S. Rissen*, *S. Rubislaw*, *S. Saintpaul*, *S. Schwarzengrund*, *S. Senftenberg*, *S. Typhimurium*). A recepção do número anual das 250 cepas foi distinta, tendo sido 39 em 2004, 117 em 2005 e 94 em 2006, ano onde foi observada maior diversidade de sorovares (**Tabela 6**). *S. Enteritidis*, observado durante os três anos e identificado em 48,8% das cepas, seguido de *S. Infantis* (7,6%), *S. Typhimurium* (7,2%), *S. Heidelberg* (6,4%), *S. Mbandaka* (4,8%). Em 6,0% das cepas não foi possível a caracterização de toda a estrutura antigênica, tendo sido identificadas como *Salmonella* spp.

Na avaliação geral, efetuada entre as cepas recebidas (não apresentado em tabela), sob o ponto de vista da região geográfica política atual, o maior número de isolamento de *Salmonella* foi obtido na região sudeste (126 das 250 cepas, 50,4%), sendo *S. Enteritidis* o sorovar mais incidente (47,6%). Este sorovar se apresentou disseminado em todas as regiões e período de análise, enquanto *S. Infantis* apenas na região sudeste, *S. Typhimurium*, no sudeste, norte e centro-oeste, *S. Mbandaka*, norte e nordeste e *S. Heidelberg* na sudeste.

Na análise da distribuição dos sorovares, por estado produtor, observado na **Tabela 7** e na **Figura 3** foi possível verificar que a maioria dos isolamentos teve origem nas regiões sul (RS, SC, PR) e sudeste (SP, RJ, MG). *S. Enteritidis* foi o mais disseminado em 10 e 12 dos 13 estados produtores e consumidores, respectivamente, tendo se apresentado numericamente superior entre os produtores oriundos de São paulo. A totalidade das cepas de *S. Infantis* e *S. Heidelberg* e 66,6% de *S. Typhimurium* também originaram-se de frangos produzidos neste estado (**Figura 3**).

Tabela 6. Distribuição de *Salmonella* spp. de acordo com o ano de isolamento

SOROVARES	ANO			TOTAL n (%)
	2004	2005	2006	
S. Enteritidis	24	61	37	122 (48,8)
S. Typhimurium	3	11	4	18 (7,2)
S. Infantis		7	12	19 (7,6)
S. Heidelberg		16		16 (6,4)
S. Mbandaka	6		6	12 (4,8)
S. Give	5			5 (2,0)
S. Ohio			3	3 (1,2)
S. Lexington		2		2 (0,8)
S. Minnesota		3		3 (1,2)
S. Senftenberg		3		3 (1,2)
S. Schwarzengrund		3		3 (1,2)
S. Gaminara			1	1 (0,4)
S. Agona			9	9 (3,6)
S. Saintpaul			3	3 (1,2)
S. Panama			5	5 (2,0)
S. Newport			2	2 (0,8)
S. Rubislaw			1	1 (0,4)
S. Rissen			8	8 (3,2)
Salmonella spp.	1	11	3	15 (6,0)
TOTAL	39	117	94	250

A elevada frequência de *S. Enteritidis* se coaduna com os dados reportados na literatura nacional e internacional, inclusive por seu envolvimento com doença humana, principalmente de transmissão alimentar, tendo como fontes aves e derivados e, particularmente no caso de surtos, ovos crus ou mal cozidos. Segundo alguns estudos, este sorovar ocupou o nicho ecológico deixado pela erradicação de *S. Gallinarum* das aves, propiciando dessa forma um aumento das infecções no homem. Da mesma forma se destacam por sua importância *S. Typhimurium* e *S. Heidelberg*, tendo este último, se apresentando como um sorovar emergente (Rodrigues, 2003-2008; Velge *et al* 2005).

Tabela 7. Distribuição de *Salmonella* spp. de acordo com os estados produtores e consumidores

ESTADO		SOROVAR
PRODUTOR (No. marcas)	CONSUMIDOR	
CE (1)	CE	S.Enteritidis
RN (1)	RN	S.Enteritidis
PE (3)	CE	S.Enteritidis
	AL	S.Enteritidis, S.Panama
BA (1)	RN	S.Mbandaka
DF (1)	DF	S.Enteritidis
GO (2)	GO	S.Typhimurium
	PR	<i>Salmonella</i> sp.
MS (2)	MS	S.Senftenberg, S.Enteritidis
	AP	S.Typhimurium
MG (2)	MG	S.Enteritidis, S.Rissen
RJ (1)	RJ	S.Enteritidis, S.Give, <i>Salmonella</i> spp.
SP (9)	AP	S.Enteritidis
	CE	S.Minnesota
	RN	S.Enteritidis
	AL	S.Enteritidis
	DF	S.Enteritidis
	MS	S.Typhimurium
	SP	S.Enteritidis, S.Infantis, S.Heidelberg, <i>Salmonella</i> spp
	SP(RP)	S.Enteritidis, S.Typhimurium, S.Infantis, S.Schwarzengrund, S.Heidelberg, <i>Salmonella</i> spp.
	PR	S.Enteritidis
PR (3)	AP	S.Enteritidis, S.Mbandaka, S.Newport, S.Gaminara, S.Rubislaw, <i>Salmonella</i> spp.
	SP (RP)	S.Enteritidis
SC (2)	SC	S.Saintpaul, S.Agona, S.Ohio, <i>Salmonella</i> spp.
RS (4)	RS	S.Enteritidis, S.Lexington, <i>Salmonella</i> spp.
	MS	S.Enteritidis
	SP	S.Enteritidis

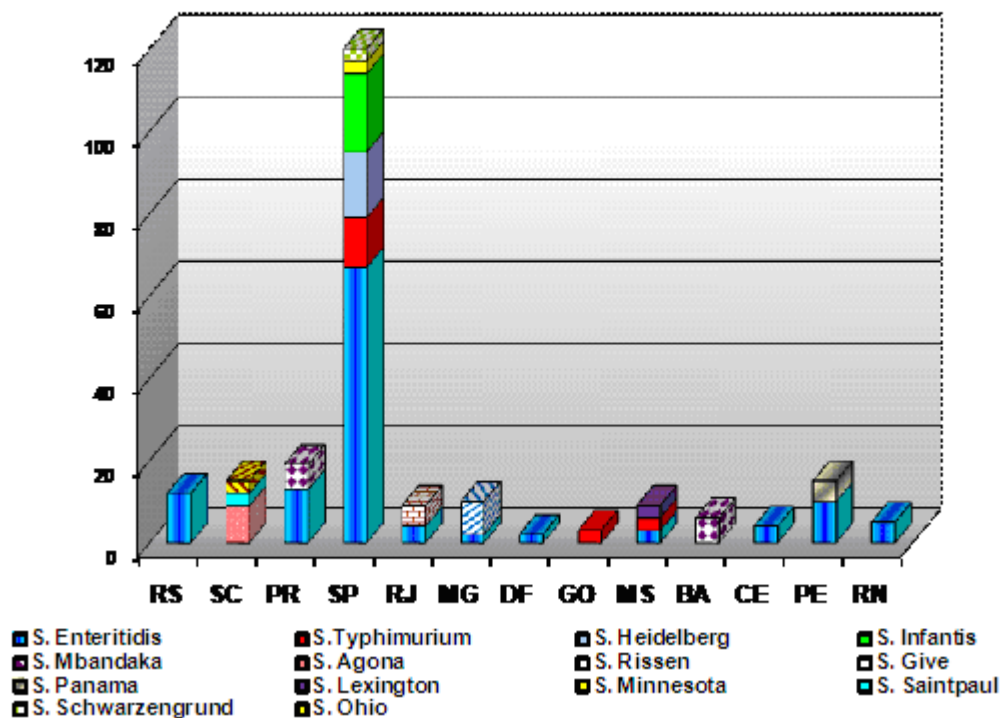


Figura 3. Distribuição numérica de *Salmonella* spp. de acordo com o estado produtor.

Os fatores responsáveis pela disseminação epidêmica de *S. Enteritidis* são ainda obscuros, possivelmente relacionados à dificuldade de detectar a contaminação das aves, que como portadoras assintomáticas, podem disseminar a infecção dentro de um plantel, por contaminação ambiental de seu conteúdo intestinal (Gast & Holt, 1998). Outras dificuldades referem-se a práticas de criação, presença de reservatórios, roedores, aquisição de novas propriedades de virulência (Velge *et al* 2005) e sua presença em ovos, sendo de difícil detecção até que a bactéria exceda \log_9 /ovo (Humphrey, 1994).

S. Typhimurium e *S. Enteritidis* destacam-se como as mais frequentes em casos de infecção alimentar nos países desenvolvidos (Threlfall, 2000; Ribot *et al*, 2002; CDC, 2004; Velge *et al*, 2005). Particularmente no Brasil, estes sorovares encontram-se entre os prevalentes isolados nas duas últimas décadas, sendo notória sua participação em surtos de origem alimentar e isolados de origem humana (Guimarães *et al*, 2001, Geimba *et al*, 2005). Relatórios anuais do Laboratório de Referência Nacional/IOC/FIOCRUZ encaminhados a CGLAB/SVS/MS (Rodrigues 2000-2008) apontam ao longo dos últimos dez anos, que na média anual de 9.000 cepas recebidas *Salmonella* Enteritidis representa o sorovar mais prevalente, seguido de *S. Heidelberg*, *S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Infantis* e *S. Hadar*, entre isolados de fontes humanas, alimentar, ambiental, animal

e matéria prima/rações, o que se coaduna com os percentuais detectados na presente avaliação.

A fagotipagem realizada em *S. Enteritidis* (118 cepas) e *S. Typhimurium* (18), permitiu a identificação em *S. Enteritidis* dos fagotipos PT4 (74,6% das cepas), PT1 (19,5%) , PT5 (4,2%) e PT7a (1,7%) conforme apresentado na **Tabela 8**. Em relação a *S. Typhimurium* (**Tabela 9**), foram identificados dois fagotipos, destacando-se o DT193 em 77,7% dos isolados e o DT208 em 16,6% e uma cepa não tipável (5,5%).

Tabela 8. Distribuição dos fagotipos dos *S. Enteritidis* identificados.

Fagotipos	2004 n = 24	2005 n = 59	2006 n = 35	Total	
				n	%
PT1	6	9	8	23	19,5
PT4	13	48	27	88	74,6
PT5	5	0	0	5	4,2
PT7a	0	2	0	2	1,7

Tabela 9. Distribuição dos fagotipos identificados em *S. Typhimurium*.

Fagotipos	2004 n = 3	2005 n = 11	2006 n = 4	Total	
				N	%
PT193	3	7	4	14	77,7
PT208	0	3	0	3	16,6
PT UT	0	1	0	1	5,5

Sendo uma ferramenta epidemiológica, a fagotipagem é altamente relevante na análise dos lisotipos circulantes e detecção daqueles com características epidêmicas. De acordo com Prat *et al* (2001), a realização da técnica de fagotipagem de *S. Enteritidis* tem sido concentrada principalmente nos países desenvolvidos da Europa, Ásia, América do Norte e Austrália, com poucas informações naqueles em desenvolvimento. Para estes autores a distribuição dos fagotipos de *S. Enteritidis* apresenta uma nítida variação geográfica com predomínio dos tipos 4, 1, 6 e 8 na Europa e dos tipos 4, 8 e 13^a no Canadá. Nos Estados Unidos há predomínio dos fagotipos 8, 13^a, 13 e 14b e uma baixa frequência dos fagotipos 4 e 1. Estes dados indicam que os isolados pertencentes ao fagotipo 1 são próprios do continente europeu, enquanto PT4 pode ser

considerado de distribuição mundial (Gillespie *et al*, 2005; HPA, 2006; IASR, 2006; Ribeiro *et al*, 2007).

Embora em vários países a infecção por *S. Enteritidis* esteja relacionada com o consumo de produtos de origem avícola contaminados, os lisotipos (PT) prevalentes não são os mesmos nos diferentes países (Cox, 1995). As aves são consideradas os maiores reservatórios dos fagotipos PT4, PT7, PT7a, PT8, PT13, PT13a, PT23, PT24 e PT30 (Nunes *et al* 2003, Cogan *et al* 2004). A causa do aumento da presença de *S. Enteritidis* PT4 está ainda obscura. Alguns autores tem postulado que cepas deste fagotipo devem ser mais invasivas em aves jovens, tornando a transmissão transovariana para a próxima geração mais fácil. Independente de qual tenha sido o mecanismo, pesquisas sugerem que *S. Enteritidis* PT4 introduziu rapidamente por si só, infectando os seres humanos ou aves, mantendo-se como sorovar dominante nessas populações (Boyce *et al*. 1996). No entanto esta relação do fagotipo PT4-ave não é excepcional: pesquisas têm evidenciado o seu predomínio em diversos alimentos além de ovos e carne de frango, como a carne bovina, pimenta preta e uma série de outras fontes, o que poderiaser interpretado como um reflexo de sua difusão em vários nichos ecológicos (Lacsoncha *et al*. 1998, Santos *et al*. 2003).

Dados sobre os fagotipos prevalentes no Brasil são escassos. Porém, Irino *et al*. (1996), analisando 574 cepas de *S. Enteritidis*, das quais 383 foram isoladas de fonte humana no período de 1975 a 1992, no estado de São Paulo, observaram prevalência do PT8 (80,9%) entre 1975 a 1992. A partir de 1993, verificou-se aumento crescente no seu isolamento e, em 1995, passou a ser o fagotipo predominante, correspondendo a 64,9% dos isolamentos de material biológico de origem humana e 40,6% de outras fontes (Tavechio *et al*. 1996).

O aumento significativo da ocorrência de *Salmonella* Enteritidis no Estado de São Paulo parece estar associado ao intercâmbio comercial de matrizes de aves com países da Europa, o que pode ter facilitado a introdução e disseminação do fagotipo PT4, a partir de 1993, no Brasil (Irino *et al*.1996). Peresi *et al*. (1998) relataram que 100% das cepas de *S. Enteritidis* isoladas de alimentos e de pacientes envolvidos em 23 surtos ocorridos na região noroeste de São Paulo, entre 1993 e 1997, foram PT4.

Esse mesmo fagotipo foi também o mais frequente encontrado por Ribeiro *et al*. (2007) em 95,2% de *S. Enteritidis* isoladas de cortes de frangos na região sudeste do Brasil no período de setembro a dezembro de 1996 e por Nunes *et al*. (2003) em 249 amostras de *S. Enteritidis* isoladas de frango, entre 1995 e 1997 no Estado de São Paulo. Segundo esses mesmos autores, sua frequência em carcaças de frango e o predomínio deste fagotipo na salmonelose humana, sugerem a particular associação entre reservatórios aviários e os surtos de infecção alimentar no Brasil durante o período de estudo. Alcocer *et al*. (2006) analisando *S. Enteritidis* isoladas de carcaças de frango comercializadas em supermercados do Paraná, identificaram PT4 (em 14 das 18 cepas), PT4a (2 cepas), PT7 (1) e uma cepa não tipavel (PTUT). Santos *et al*. (2008) analisando um total de 111 cepas de *S. Enteritidis* oriundas de carcaças de frango, alimentos e material biológico de origem

humana isolados e episódios de infecções transmitidas por alimentos, obtiveram 57,7% de positividade de PT4; 32,4% do fagotipo PT4a; 3,6% do fagotipo PT6a e 0,9% pertencentes ao fagotipo 7, enquanto 5,4% das cepas não foram fagotipáveis (UT).

S. Typhimurium representa importante sorovar isolado de diferentes fontes da cadeia alimentar no Brasil, as quais podem ser consideradas como as principais vias de transmissão para o homem, onde os produtos de origem animal como carne, leite e ovos constituem os alimentos mais frequentemente incriminados em surtos gastroentéricos.

A fagotipagem tem permitido a diferenciação de *S. Typhimurium* em mais de 200 “*definitive phage types*” (DTs); alguns destes parecem ter alta prevalência em certas áreas geográficas. O fagotipo DT104 é reconhecido como pandêmico, carreador de cassetes gênicos que conferem resistência a classes distintas de antimicrobianos, (ACSSuT), identificado com relativa frequência nos Estados Unidos e Europa. A infecção humana causada por *S. Typhimurium* DT104 veiculada por alimentos é apontada como um problema para a saúde pública em todo o mundo. No Brasil, Ghilardi *et al.*, 2006 relataram a identificação deste fagotipo a partir de pacientes hospitalizados em São Paulo.

Entre cepas de *S. Typhimurium* foi observado o predomínio do PT193 (82,3%). Embora nossos achados não indiquem a presença do fagotipo DT104, foi identificado o fagotipo PT208 entre 17,7% das cepas, o qual é um subfagotipo da cepa epidêmica, considerado mundialmente relacionado à multirresistência, indicando indiretamente a presença de DT104 em nosso meio.

Igualmente, o fagotipo PT193 tem sido identificado em diversos países, apresentando elevados índices de multirresistência antimicrobiana. É considerado uma derivação do PT204, o qual apresenta resistência aos fármacos cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamida e tetraciclina, resultante da aquisição de um plasmídeo que codifica resistência adicional a ampicilina e kanamicina (Daly & Fanning, 2000, Threlfall *et al.*, 2002). Este lisotipo vem se tornando de relevância para a saúde pública estando envolvido em surtos de transmissão alimentar em vários países (Usera *et al.*, 2000; Gebreyes & Altier, 2002; Liebana *et al.*, 2002; Ghilardi *et al.*, 2006; Pereira *et al.*, 2007).

Considerando os resultados obtidos na presente avaliação, observamos que a elevada frequência dos lisotipos *S. Enteritidis* PT4 e *S. Typhimurium* DT193 está de acordo com o índice mundial de ocorrência e reforça a necessidade de estudos para avaliar a sua real significância em nosso meio.

Salmonella spp. Se apresenta, além das implicações em saúde pública, como um dos principais patógenos envolvidos em doenças de transmissão alimentar. Assume significativa importância mundial em face da ocorrência de cepas multirresistentes aos antimicrobianos, estando muitas vezes associada a surtos de DTA em vários países, incluindo o Brasil.

Este tema de extrema importância tem sido objeto de atenção da comunidade científica, que vem discutindo soluções globais para o problema. Assim, dada a utilidade de avaliar a correlação entre os agentes antimicrobianos empregados no tratamento humano de infecções determinadas por este microrganismo e aqueles de uso na produção animal, o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos através da determinação da concentração inibitória mínima foi realizado frente a vinte e três fármacos, sendo um grupo representado por aqueles amplamente utilizados do passado até os dias atuais e outro grupo, que abrangem os antimicrobianos considerados mais recentes.

No cômputo geral, os maiores percentuais de resistência (**Tabela 10**) foram obtidos para estreptomicina (89,3%), sulfonamidas (72,4%), florfenicol (59,2%), ampicilina (44,8%), ácido nalidixico (44,0%), ceftiofur (22,8%), aztreonam (20,4%), enrofloxacina (18,4%), cefoxitina (17,3%), cefalotina (12,4%) e tetraciclina (11,2%).

Resistência a ciprofloxacina (CIP) foi observada em 0,4% das cepas. Este percentual embora seja reduzido no cômputo geral, representa um alerta tendo em vista que esta droga vem sendo utilizada como opção terapêutica e o aumento gradativo de resistência representa elevado risco em curto e médio prazo particularmente em nosso meio.

Essa assertiva tem por base o percentual de resistência detectado na presente avaliação para as outras quinolonas, o qual indica que deve ser dada continuidade ao monitoramento das suscetibilidade a este grupo de drogas. Este permitirá conhecer o impacto do uso da enrofloxacina na produção avícola e avaliar o aumento/redução de cepas resistentes a NAL, tendo em vista a possibilidade de resistência cruzada com drogas de uso humano, apontado por Lopez & Oliveira, 2000.

Níveis de resistência em torno de 1% foram observados em países do hemisfério norte no início deste século, conforme relatado por Ângulo *et al.* (2000) os quais apontaram a emergência de cepas resistentes as fluoroquinolonas entre as salmonelas paratíficas, classe de agentes antimicrobianos empregados como droga de escolha no tratamento de infecções por *Salmonella* spp. Multirresistentes em adultos.

Sensibilidade na totalidade de *Salmonella* spp. foi detectada para o imipenem (IPM) e para o cloranfenicol (CHL), e intermediária em 3,2% das cepas.

Resistência a esses fármacos vem sendo notificada em salmonelas de origem aviária (Logue *et al.* 2003; Wilson, 2004; Cui *et al.* 2005; Berrang *et al.* 2006; Zhao *et al.* 2006), principalmente às drogas mais antigas, como a tetraciclina, aminoglicosídeos, ampicilina e sulfonamidas.

Níveis também similares foram observados para betalactâmicos, incluindo ampicilina e as cefalosporinas: cefalotina, cefoxitina e ceftiofur por Berrang *et al.* (2006). Estes representam a classe mais variada e mais amplamente utilizada de antimicrobianos. Este grupo inclui penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e

carbapenêmicos sendo responsável por aproximadamente 50% das drogas utilizadas de forma sistêmica, devido principalmente à sua baixa toxicidade e a grande variedade de compostos disponíveis.

Tabela 10 . Frequência e distribuição dos marcos de resistência nos isolados de *Salmonella* spp.

DROGAS ¹	2004 n = 39		2005 n = 117		2006 n = 94		TOTAL n = 250	
	R %	I %	R %	I %	R %	I %	R %	I %
AMP	79,5	10,2	62,3	5,1	8,5	1,1	44,8	4,4
AMC	5,1	-	10,2	-	1,1	-	6,0	-
CEP	15,4	7,7	19,6	5,1	2,1	12,8	12,4	8,4
FOX	20,5	12,8	14,6	8,6	19,1	8,5	17,3	9,2
CXM	2,6	-	11,1	-	8,5	-	8,8	-
CAZ	-	-	11,1	0,8	8,5	-	8,4	0,4
CRO	-	2,6	11,1	4,3	8,5	9,6	8,4	6,0
TIO	17,9	5,1	19,6	28,2	28,7	7,4	22,8	16,8
FEP	-	-	6,8	-	-	-	3,2	-
ATM	-	5,1	29,9	4,3	17,0	7,4	20,4	5,6
GEN	-	5,1	6,0	11,1	-	10,7	2,8	10,0
STR	35,9	-	100	-	100	-	89,3	-
SSS	56,4	-	66,6	-	86,2	-	72,4	-
TMP	2,6	-	9,4	-	15,9	-	10,8	-
SXT	-	-	6,8	-	14,9	-	8,8	-
NAL	51,3	-	36,7	-	50,0	-	44,0	-
ENR	64,1	20,5	17,1	61,5	1,1	18,1	18,4	38,8
CIP	-	-	-	1,7	1,1	1,1	0,4	1,2
TCY	20,5	56,4	15,4	7,7	2,1	22,3	11,2	20,8
CHL	-	5,1	-	5,1	-	-	-	3,2
FFC	92,9	5,1	84,6	9,4	13,8	1,1	59,2	5,6
NIT	33,3	25,6	8,5	3,4	4,2	-	10,8	5,6

AMP (ampicilina), AMC (amoxicilina-ác. clavulânico), CEP (cefalotina), FOX (cefotaxima), CXM (cefuroxima), CAZ (ceftazidima), CRO (ceftriaxona), TIO (ceftiofur), FEP (cefepime), ATM (aztreonam), GEN (gentamicina), STR (estreptomicina), SSS (sulfonamida), TMP (trimetoprim), SXT (sulfametoxazol-trimetoprim), NAL (ácido nalidíxico), ENR (enrofloxacina), CIP (ciprofloxacina), TCY (tetraciclina), CHL (cloranfenicol), FFC (florfenicol), NIT (nitrofurantoina)

Esta característica é primariamente resultante da produção de β -lactamases adquiridas. Mais de 340 β -lactamases tem sido descritas e muitas vêm sendo identificadas em *Salmonella* sendo motivo de preocupação em face ao emprego destas drogas no tratamento da salmonelose em crianças (Bush, 2001).

Quanto a relação entre os percentuais de resistência e o período de isolamento (**Figura 4**), foi verificado um declínio para AMP, CEP, ENR, FLOR e TCY em 2006. Todavia níveis mais elevados foram obtidos para os antifolatos (SSS, TMP, SXT) e para cefalosporina de 3ª geração ceftiofur (TIO), de uso veterinário exclusivo, empregada com fins profilático e/ou terapêutico, particularmente em pintos de um dia.

Em relação à nitrofurantoína, foi possível observar, quando comparado aos percentuais apontados na bibliografia nacional (Asensi, 1995; Reis, 1998; Rodrigues, 2003-2008) acentuado declínio da resistência, provavelmente um reflexo da proibição pelo MAPA (Brasil, 2003) do uso deste fármaco para uso veterinário e de seu emprego na alimentação animal através da Instrução Normativa Nº 9 de 27/06/2003. Entretanto é importante considerar a possibilidade destes dados representarem uma tendência, onde somente resultados de monitoramento contínuo poderão definir o cumprimento destas normas. Esta tem por base o conhecimento de que ao reduzirmos a pressão seletiva sobre os microrganismos, através da suspensão de uso de alguns antimicrobianos, uma avaliação realizada nos países nórdicos, tem revelado um aumento gradativo e finalmente a sensibilidade da totalidade das cepas às drogas analisadas.

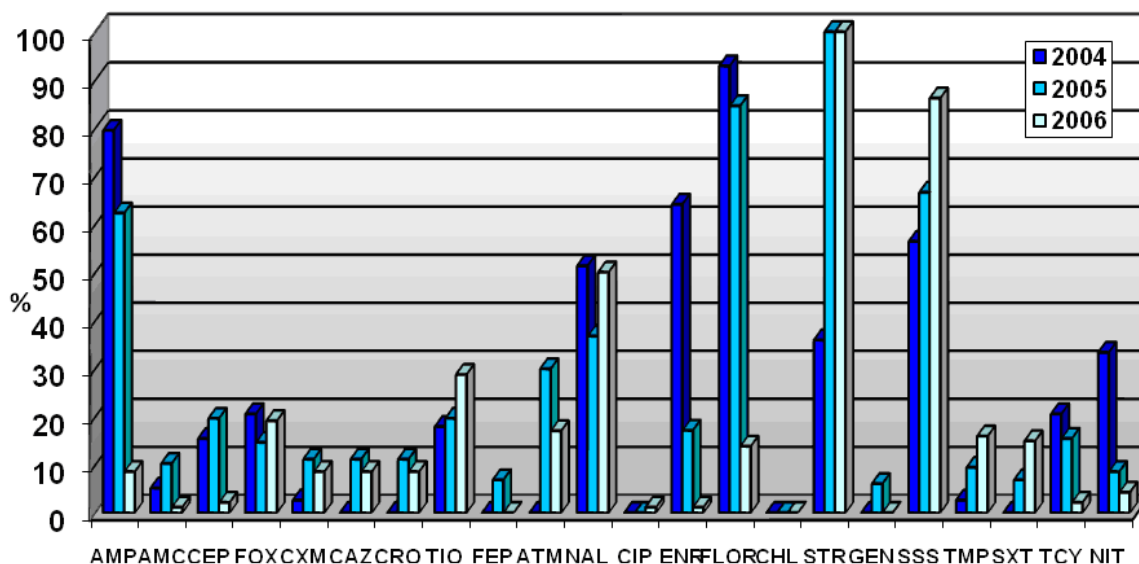


Figura 4. Frequência dos marcadores de resistência nas 250 cepas de *Salmonella* spp. no período de 2004 a 2006.

No presente estudo foi evidenciada na totalidade das cepas, resistência a uma ou mais drogas, permitindo reconhecer 98 perfis de multirresistência e, 192 (76,8%)

das 250 cepas. Quando distribuídos por número de grupos de drogas, aponta-se um quadro extremamente preocupante especialmente em relação a *S. Enteritidis*, com 28% das cepas multirresistentes a ≥ 5 classes (**Tabela 11, Figuras 5 e 6**).

Tabela 11. Distribuição dos sorovares de *Salmonella* spp. de acordo com a resistência a diferentes classes de antimicrobianos.

Sorovares	Classes de Drogas						Total
	1	2	3	4	5	6	
<i>S. Enteritidis</i>	4	5	35	40	32	6	122
<i>S. Typhimurium</i>	1	4	5	3	3	2	18
<i>S. Mbandaka</i>	-	6	6	-	2	3	12
<i>S. Infantis</i>	-	10	1	5	3	-	19
<i>S. Heidelberg</i>	-	-	-	14	2	-	16
<i>S. Agona</i>	7	2	-	-	-	-	9
<i>S. Rissen</i>	-	-	6	2	-	-	8
<i>S. Give</i>	-	-	2	1	2	-	5
<i>S. Panama</i>	-	1	4	-	-	-	5
<i>S. Schwarze ngrund</i>	-	-	-	-	3	-	3
<i>S. Senftenberg</i>	1	1	1	-	-	-	3
<i>S. Minnesota</i>	-	-	1	2	-	-	3
<i>S. Saintpaul</i>	1	2	-	-	-	-	3
<i>S. Ohio</i>	-	1	2	-	-	-	3
<i>S. Lexington</i>	-	-	-	2	-	-	2
<i>S. Newport</i>	-	1	1	-	-	-	2
<i>S. Gaminara</i>	-	1	-	-	-	-	1
<i>S. Rubislaw</i>	-	1	-	-	-	-	1
<i>Salmonella</i> spp	1	7	1	5	1	-	15
Total	15	42	60	74	48	11	250

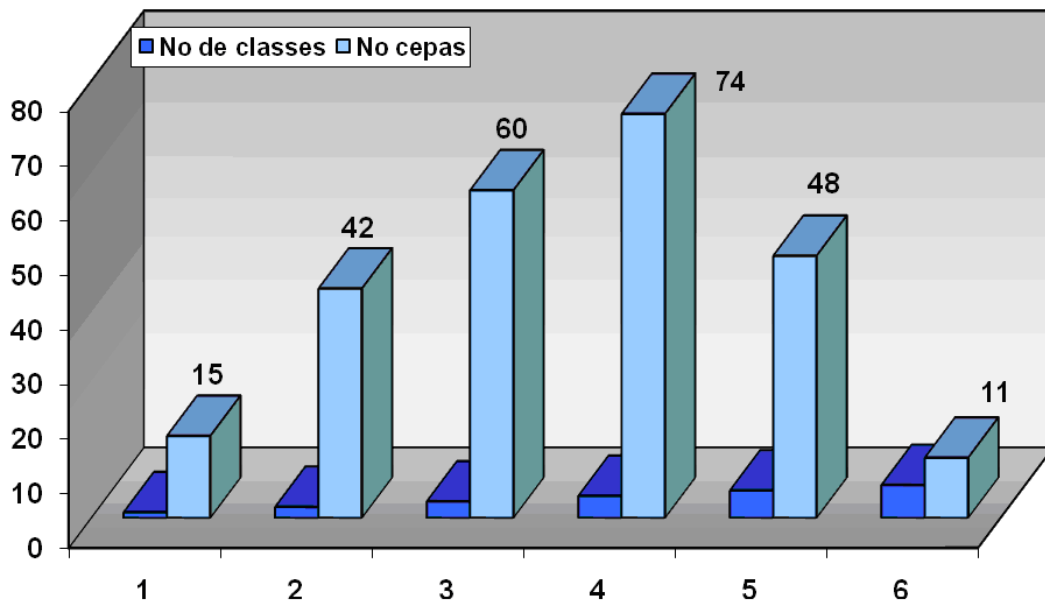


Figura 5. Distribuição numérica de *Salmonella* spp. de acordo com a resistência a diferentes classes de drogas.

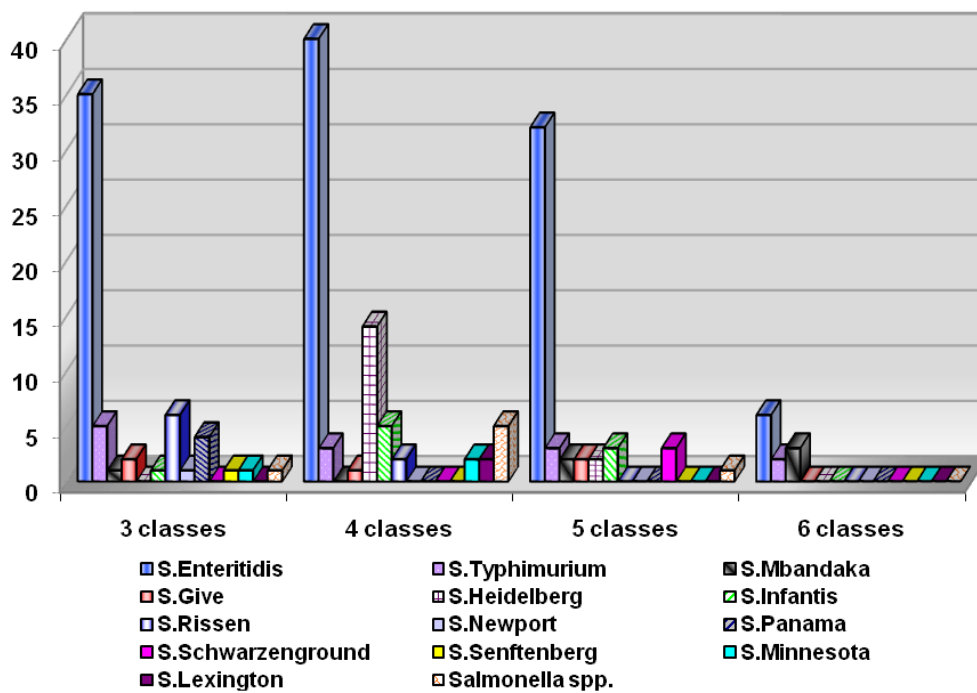


Figura 6. Distribuição numérica de *Salmonella* spp. multirresistentes a diferentes classes de antimicrobianos.

Na **Tabela 12** são apresentados 39 perfis que se repetiram em duas ou mais cepas, totalizando 69,3% dos isolados multirresistentes, destacando-se o modelo FFC, STR, SSS, NAL em *S. Enteritidis* (10 cepas). Em *S. Heidelberg* (total de 16 cepas) foi reconhecido o perfil FFC, STR, CRO, CEP, TIO, SSS, AMP, ATM, AMC, CAZ, CXM, FEP em 7 (43,7%) e FOX, FFC, STR, CRO, CEP, TIO, SSS, AMP, ATM em 3 (18,7%), sendo estas últimas detectadas entre as cinco cepas oriundas de produtos da mesma marca (dados não apresentados em tabela). Reveste-se de importância a presença de *S. Heidelberg* resistentes às cefalosporinas, incluindo aquelas de 3ª geração (CRO e TIO), empregadas no tratamento da salmonelose invasiva no homem e de uso terapêutico e/ou profilático em animais, respectivamente. Este deve portanto ser considerado um alerta, em face às dificuldades de seu uso terapêutico empírico, tendo em vista que este sorovar vem se apresentando emergente, a partir do ano de 2004, particularmente em países da América do Norte e leste europeu.

Um aspecto extremamente preocupante se refere à evidência em uma cepa de *S. Enteritidis* da resistência a seis classes de antimicrobianos. Esta envolve 16 marcadores de resistência (FOX, STR, TMP, CRO, CEP, TIO, SSS, CIP, AMP, NAL, ATM, SXT, NIT, AMC, CAZ, CXM), entre as quais se encontram incluídas drogas de última geração, empregadas no tratamento da salmonelose humana.

Na **Tabela 13**, foi estabelecida correlação entre os perfis de multirresistência idênticos, detectados em mais de um sorovar, destacando-se neste caso FFC-SSS-AMP comum entre *S. Enteritidis* (2 cepas), *S. Mbandaka* (1) e *S. Give* (1); FFC-STR-TMP-SSS-AMP-TCY-SXT entre *S. Enteritidis* (1), *S. Typhimurium* (2) e *S. Schwarzengrund* (2 cepas).

Confrontando os quatro sorovares mais frequentes (**Tabela 14 Figuras 6 e 7**) é possível salientar em *S. Enteritidis* resistência a 19 antimicrobianos, seguida de *S. Heidelberg* (14), *S. Typhimurium* (13) e *S. Infantis* (10). Resistência na totalidade (100%) das cepas de *S. Heidelberg* foi observada para AMP, SSS, FFC e STR e em *S. Typhimurium* e *S. Infantis*, para STR. Por outro lado, resistência a FEP foi observada apenas em *S. Heidelberg*, do mesmo modo que para NIT e CIP em *S.*

Tabela 12. Perfis de multirresistência mais frequentes de 131 (52,4%) cepas de *Salmonella* spp.

PERFIS DE MULTIRRESISTENCIA	Nº Cepas	PERFIS DE MULTIRESISTENCIA	Nº Cepas
FFC,STR,AMP	3	FFC,STR,SSS,AMP	3
FFC,STR,AMP,ATM	2	FFC,STR,SSS,AMP,ATM	3
FFC,STR,ENR,AMP,ATM	2	STR,TIO,SSS	4
FFC,STR,ENR,SSS,AMP	2	FFC,STR,SSS,AMP,NAL	4
FFC,STR,ENR,SSS,AMP,TCY	2	STR,SSS,NAL,NIT	2
FFC,STR,ENR,SSS,TCY,NAL	2	FOX,STR,TIO,SSS,NAL,ATM	3
FFC,STR,ENR,TIO,AMP,ATM	2	FFC,STR,TIO,SSS,GEN,AMP	3
FFC,STR,GEN,AMP,TCY,ATM	2	FOX, FFC,STR, CRO,CEP,TIO,SSS, AMP, ATM, AMC, CAZ,CXM	3
FFC,STR,SSS,NAL,NIT	5	FOX, FFC,STR,CEP,SSS,NAL	4
FFC,STR,TMP,SSS,AMP,TCY,NAL,SXT	2	FFC,SSS,AMP	3
FOX, FFC,STR,ENR,CEP,SSS,AMP,NAL,NIT	2	FFC,STR,ENR,SSS,AMP,NAL	4
FOX,STR,SSS,NAL	2	FFC,STR,TMP,SSS,AMP,TCY,SXT	4
STR,TMP,TIO,SSS,NAL,ATM,SXT	2	FFC,ENR,SSS,AMP,NAL,NIT	5
STR,TMP,TIO,SSS,NAL,SXT	2	STR,TMP,SSS,NAL,SXT	6
STR,SSS,AMP	2	STR,SSS,NAL	6
STR,SSS,AMP,ATM	2	FOX,STR,CRO,SSS,NAL,CAZ,CXM	7
FFC,STR,TIO,SSS,AMP,ATM	2	FFC,STR,SSS	7
FFC,TIO,SSS,AMP	2	FFC,STR,CRO,CEP,TIO,SSS,AMP,ATM, AMC,CAZ, CXM,FEP	7
FFC,ENR,AMP,NAL	2	FFC,STR,SSS,NAL	10
FFC,STR,ENR,AMP,TCY	3		

Tabela 13. Compatibilidade dos perfis de multirresistência entre diferentes sorovares de *Salmonella* spp.

PERFIS DE MULTIRRESISTÊNCIA	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Mbandaka</i>	<i>S. Give</i>	<i>S. Heidelberg</i>	<i>S. Infantis</i>	<i>S. Newport</i>	<i>S. Panama</i>	<i>S. Schwarzengrund</i>	<i>S. Minnesota</i>	<i>S. Lexington</i>	<i>Salmonella</i> sp	TOTAL
FFC,SSS,AMP	2		1										3
FFC,STR,AMP	2			1									3
FFC,STR,AMP,ATM		1								1			2
FFC,STR,SSS	6						1						7
STR,SSS,NAL	5					1							6
STR,TIO,SSS	3							1					4
FFC,STR,ENR,AMP,ATM		1										1	2
FFC,STR,GEN,AMP,TCY,ATM		1								1			2
FFC,STR,SSS,AMP				1							2		3
FFC,STR,SSS,AMP,ATM	1					2							3
FFC,STR,TIO,SSS,AMP,ATM	1				1								2
FFC,ENR,SSS,AMP,NAL,NIT	4			1									5
FFC,STR,SSS,AMP,NAL	2				2								4
FFC,STR,TMP,SSS,AMP,TCY,SXT		2							2				4

Tabela 14. Resistência aos antimicrobianos detectada entre 175 cepas pertencentes aos sorovares mais frequentes

DROGAS	S.Enteritidis	S.Typhimurium	S.Heidelberg	S.Infantis
	%	%	%	%
AMP	36,1	77,8	100	36,8
AMC	2,4	-	75,0	-
CEP	13,9	-	81,2	-
FOX	28,9	5,5	25,0	-
CXM	7,4	-	75,0	-
CAZ	6,5	-	75,0	-
CRO	6,5	-	75,0	-
TIO	18,8	11,1	81,2	26,3
FEP	-	-	50,0	-
ATM	10,6	50,0	87,5	21,0
GEN	-	11,1	-	21,0
STR	81,0	100	100	100
SSS	64,7	50,0	100	94,7
TMP	2,4	27,8	-	10,5
SXT	1,6	27,8	-	10,5
NAL	74,6	11,1	12,5	15,8
ENR	26,2	5,5	-	-
CIP	0,8	-	-	-
TCY	8,2	33,3	-	-
CHL	-	-	-	-
FFC	64,7	61,1	100	31,6
NIT	20,5	-	-	-

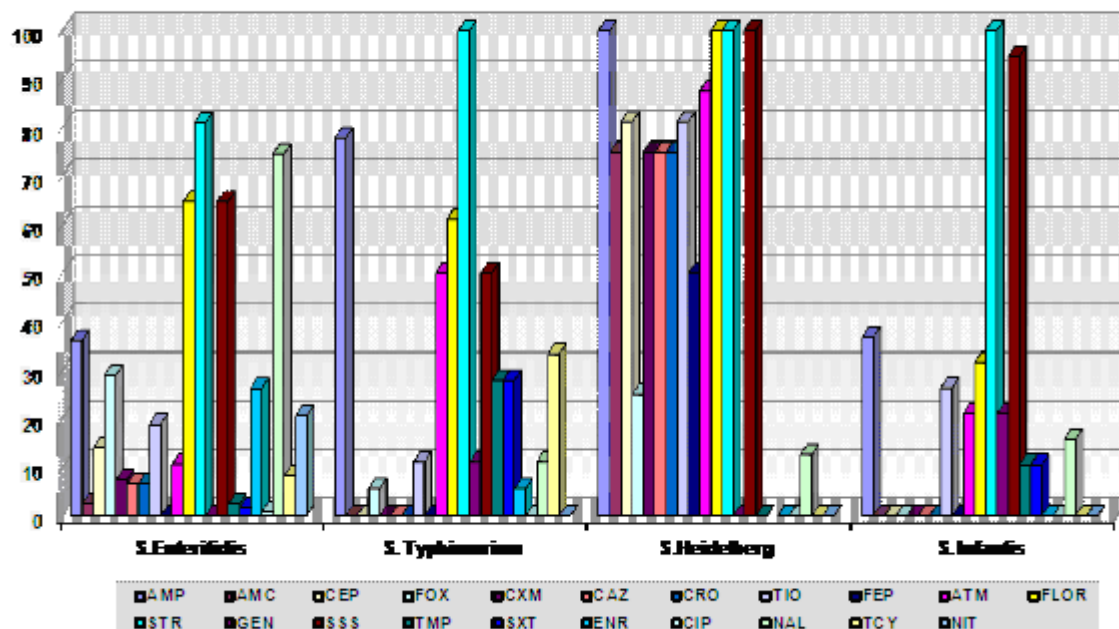


Figura 7. Distribuição dos marcadores de resistência nos sorovares mais frequentes de *Salmonella* spp.



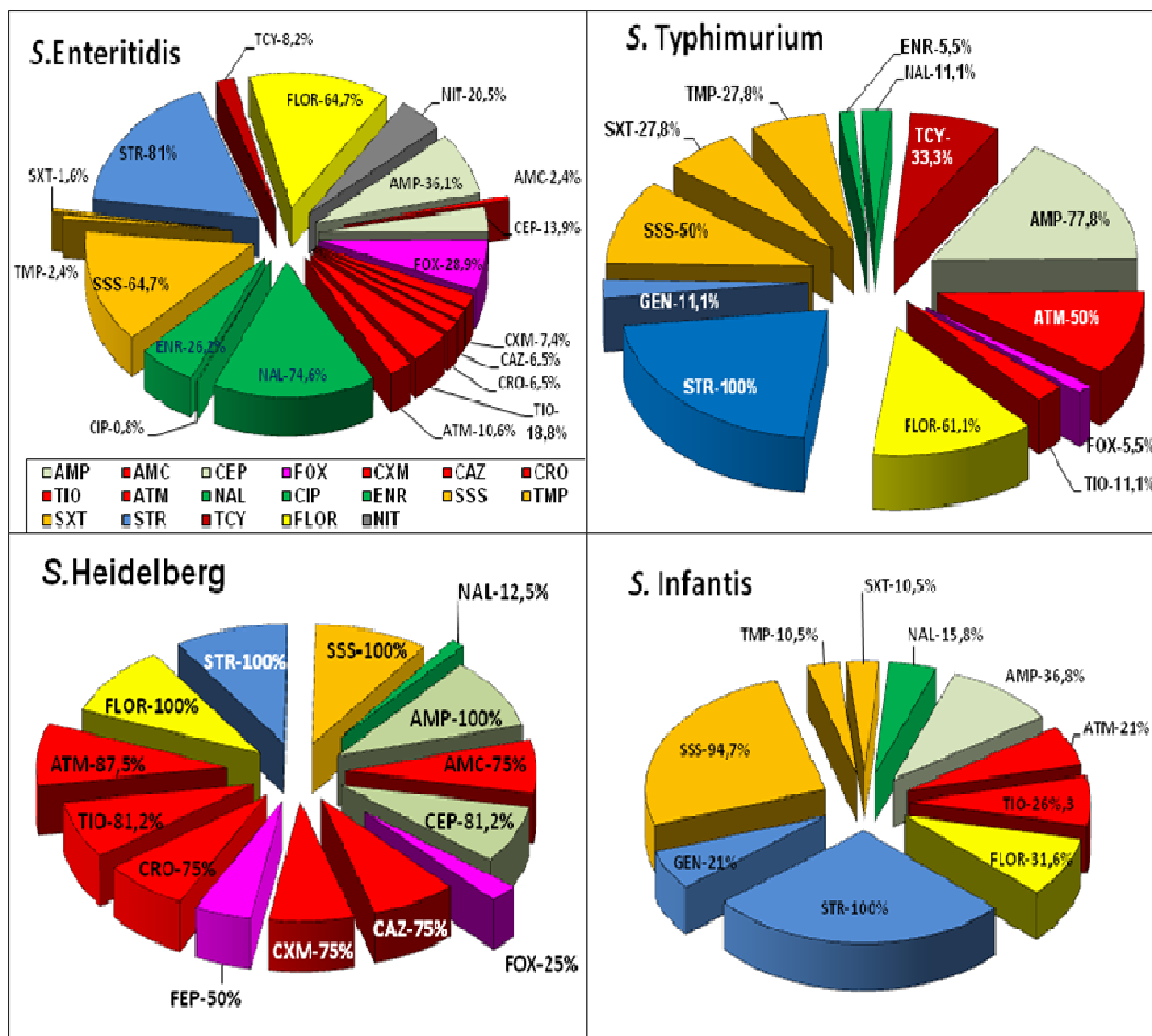


Figura 8. Distribuição dos marcadores de resistência antimicrobiana nos sorovares prevalentes de *Salmonella* spp.

Relacionando os perfis de multirresistência com o estado produtor, em *S. Enteritidis* (**Tabela 15**), foi possível verificar a ocorrência dos perfis STR-SSS-NAL em São Paulo (3 cepas) e Pernambuco (2) em 2006; FOX-STR-CRO-SSS-NAL (10) e FOX-STR-SSS-NAL (2), ambos em São Paulo e no Ceará, 2006; FFC-STR-SSS-NAL (10 cepas) no Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo, 2005 e 2006; FFC-ENR-SSS-AMP-NAL-NIT (Paraná e Minas Gerais, 2004) e FFC-STR-SSS-AMP-NAL (rs E sp, 2005), porém oriundas de produtos de marcas diferentes.



Tabela 15. Perfis de multirresistência em *S. Enteritidis* detectados nos diferentes estados produtores.

PERFIL	ANO	Estado Produtor					
		RS	PR	SP	MG	CE	PE
STR,SSS,NAL	2006			3			2
FFC,STR,SSS,NAL	2005	1	2	4			
	2006			3			
FOX,STR,CRO,SSS,NAL,CAZ, CXM	2006			4		3	
FOX,STR,SSS,NAL	2006			1		1	
FFC,ENR,SSS,AMP,NAL,NIT	2004		3		1		
FFC,STR,SSS,AMP,NAL	2005	1		1			

Resistência às quinolonas é determinada, fundamentalmente, por mecanismos mediados por alterações nos sítios de ligação da DNA gyrase e redução destas no interior da bactéria (Ruiz, 2003). Inicialmente o aparecimento de resistência era considerado somente a partir de mutações, atualmente sabe-se que elementos móveis que carregam o gene *qnr* também têm sido descritos como responsáveis por conferir resistência às quinolonas, podendo ser transferidos de forma horizontal. Considerando estes aspectos, os resultados obtidos onde algumas cepas multirresistentes, incluem em seu perfil, fluoroquinolonas como enrofloxacina e ciprofloxacina, representam um quadro preocupante, pois comprovam que à semelhança de diferentes países da Europa pode ocorrer aumento gradativo de *Salmonella* spp. Resistentes a esta classe de drogas (Threlfall *et al.*, 2000; Marimon *et al.*, 2004).

O crescente isolamento de *Salmonella* spp. resistente a um ou vários antimicrobianos a partir de fontes humanas e animais é considerado alarmante e se tem constituído importante problema de Saúde Pública (Lázaro *et al.*, 2003, 2004a, b, Schoreter *et al.*, 2004; Larkin *et al.*, 2004; Varma *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2008).

Um inevitável efeito colateral do uso de antiicrobianos, o qual é associado à adaptabilidade da bactéria e evolução do genoma bacteriano, é a emergência e disseminação de bactérias resistentes, não somente bactérias patogênicas, mas também a microbiota endógena do homem e animais evidenciando que não ocorre somente a disseminação clonal de uma cepa resistente, mas também a transferência de genes de resistência entre bactérias no homem e nos animais e entre ambos (O'Brien, 2002).

Numerosos estudos, retrospectivos e prospectivos têm demonstrado que o aumento na resistência antimicrobiana ocorre entre bactérias patogênicas e comensais após introdução de um antimicrobiano. A observação comum de um relacionamento entre o uso crescente de antimicrobianos de amplo espectro e a emergência da resistência a estes agentes sugere um contínuo ciclo do uso do fármaco, desenvolvimento de resistência bacteriana, eficácia reduzida de antibióticos e a constante necessidade de novas drogas (Murphy *et al.*, 2001; McDermott *et al.*, 2003).

Em animais produtores de alimentos, estas drogas são utilizadas para a profilaxia, controle e tratamento, bem como promoção do crescimento. Uma consequência indesejável de seu uso é o potencial desenvolvimento de resistência antimicrobiana em



patógenos de origem alimentar e subsequente transmissão ao homem, através dos alimentos (White *et al.* 2006).

Os elevados percentuais de resistência aos antimicrobianos alertam para uma condição de risco à saúde pública, tendo em vista as possíveis implicações no tratamento de quadros clínicos graves de salmonelose. Reforça ainda, a semelhança de outros países, a necessidade de dar continuidade ao monitoramento da resistência antimicrobiana neste patógeno. Esta tem por base o conjunto de informações ofertado pelos relatórios anuais de atividades encaminhados a CGLAB/SVS/MS pelo Laboratório de Referência Nacional desde o ano de 1995 e de avaliações realizadas por diferentes grupos de pesquisa em diferentes regiões do país além dos resultados auferidos no presente estudo. Sua utilização permitirá caracterizar os clones multirresistentes quanto a sua capacidade de albergar e, obviamente, disseminar genes de resistência. Indiretamente tal avaliação possibilita ainda, avaliar o cumprimento das normas de proibição do uso de determinadas drogas e, obviamente, acompanhar o papel de certos fármacos de uso veterinário exclusivo, surpreendendo características inerentes à similaridade química, que possam resultar em resistência nas drogas de utilização terapêutica humana.

Adicionalmente, o conhecimento quanto ao padrão de resistência vem sendo aplicado na tipagem de *Salmonella* spp., tendo maior valor quando associado a métodos moleculares, entre os quais aqueles que visam à detecção destes genes. Sabe-se que a resistência aos antimicrobianos é um dos exemplos bem conhecidos de adaptação das bactérias a um ecossistema que contenha essas moléculas. Embora não esteja clara a origem dos genes de resistência, acredita-se que muitos provenham dos microrganismos produtores de antibióticos, como forma de proteção frente ao efeito das substâncias por eles produzidas; outros, devido a mecanismo de mutação determinando variações nos genes originais (Alvarez, 2007).

Particularmente em *S. entérica*, os genes e mecanismos de resistência de maior frequência afetam basicamente tanto as “famílias” ou grupos de antimicrobianos utilizados no tratamento da salmonelose (betalactâmicos, aminoglicosídeos, fencóis, quinolonas ou folatos), como aqueles não utilizados especificamente para seu controle, como as tetraciclinas e sulfonamidas (Michael *et al.*, 2006).

Na presente avaliação, com base no padrão de resistência aos diferentes antimicrobianos, foram selecionadas para caracterização dos genes cepas de *S. Enteritidis*, *S. Heidelberg*, *S. Infantis*, *S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Mbandaka*, *S. Schwarzengrund* e *S. Minnesota* conforme apresentado nas **Tabelas 16, 17, 18 e 19**.

De um modo geral, o gene *sul1* foi o mais disseminado, estando frequente em 60% das cepas de *S. Enteritidis* resistente a sulfonamida, 91,6% de *S. Heidelberg*, 11,8% de *S. Infantis* e ausente nos demais sorovares. O gene *sul2* foi identificado em 46,7% cepas *S. Heidelberg*.

Em *Samonella* spp. se reconhecem três tipos de genes de resistência às sulfonamidas: *sul1*, *sul2* e *sul3*, que codificam formas resistentes da enzima dihidropteroico sintetase. Esta intervém na síntese do ácido tetrahydrofólico, cofator requerido na biossíntese de bases nitrogenadas e aminoácidos. O gene *sul1* representa parte do segmento conservado 3' (3'=CS) de integrons de classe 1 podendo estar localizado em plasmídeos ou associado à ilha de patogenicidade (SGI 1). O gene *sul 2* é frequentemente relacionado com a resistência a estreptomicina *strA-atrB*, encontrado em plasmídeos



(Michael *et al.* 2006). O predomínio do gene *sul 1* no presente estudo é reconhecido por outras avaliações que o apontam como amplamente distribuído em *Salmonella* (Chen *et al.* 2004, Daly *et al.* 2005, Michael *et al.* 2006).

Por outro lado, os betalactâmicos são amplamente usados para tratar infecções por *Salmonella* em animais e no homem. Atuam de um modo geral por interferência na síntese da parede celular sendo bactericidas e sua ação se dá exclusivamente contra bactérias que estejam em atividade biossintética da mesma, ou seja, em fase de crescimento e/ou reprodução. O mecanismo mais importante de resistência aos betalactâmicos é a produção de enzimas específicas (β -lactamases) que se unem ao antibiótico hidrolizado. Um grande número de estudos tem investigado a ocorrência de diferentes betalactamases em bactérias Gram-negativas isoladas de infecções clínicas no homem. Por outro lado, há um limitado número de estudos sobre a ocorrência de betalactamases em isolados de animais e seus produtos (Carattoli, 2008).

As betalactamases detectadas em *Salmonella* spp. constituem um diverso grupo de enzimas codificadas por um considerável número de genes. Pelo menos 10 diferentes subgrupos de genes beta-lactamases *bla* codificam para TEM, SHV, PSE, OXA, PER, CTX-M, CMY, ACC, DHA ou KPC (Michael *et al.*, 2006), destacando-se os genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX}, e *bla*_{CMY} por codificar resistência a betalactamases de espectro estendido (Winokur *et al.* 2000, Mulvey *et al.* 2003, Michael *et al.* 2006).

A análise da presença de genes *bla* no presente estudo permitiu sua identificação nas cepas de *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg*, resultando negativo para os demais sorovares investigados.

Em *S. Heidelberg* foi observada diversidade genética em três cepas, tendo sido detectados sete (*cmy2*, *ctx*, *tem*, *integron 5'CS/3C'*, *aadA1*, *sul 1*, *sul 2*) e cinco genes (*cmy2*, *ctx*, *aadA1*, *sul 1*, *sul 2*) em uma e duas cepas, respectivamente com os resultados apresentados na **Tabela 16** e ilustrados através das **Figuras 8 e 9**.

Entre os genes *bla* pesquisados em *S. Enteritidis*, (**Tabela 17**), foi detectado *bla*_{TEM} em apenas duas cepas. Correlacionando a presença dos genes *bla* como fenótipo de resistência apresentado pelos sorovares *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg*, foi possível evidenciar sua natureza extracromossômica e consequente perda destes genes. Considerando a similaridade dos fenótipos de multirresistência, particularmente, em *S. Heidelberg*, onde, com exceção de uma cepa, as demais apresentaram o perfil FOX, FFC, STR, CRO, CEP, TIO, SSS, AMP, ATM, CXM, AMC, CAZ entre as quais sete com resistência a FEP (**Tabela 16**).

Em *S. Enteritidis*, uma cepa que apresentou fenotipicamente resistência a dezesseis drogas, quando avaliada através de PCR para evidenciação dos diferentes genes, mostrou resultados negativos, indicando a possível localização extracromossomial e consequente perda.

Entretanto, analisando os perfis de resistência nas três cepas de *S. Heidelberg* em que foram detectados os genes *bla*_{CMY2} e *bla*_{CTX-M}, apontando a associação com resistência a ceftriaxona e ceftiofur, cefalosporina de 3ª geração de uso humano e veterinário, respectivamente. Da mesma forma nestas cepas, além dos betalactâmicos, foi observada a resistência a FFC, STR E SSS.



O aumento da prevalência de cepas de *Salmonella* spp. resistentes à ceftriaxona em animais de produção pode, por sua vez, estar relacionada ao uso veterinário de ceftiofur, uma cefalosporina de espectro estendido de uso exclusivo em medicina veterinária (Carattoli *et al.*, 2002).

Dados do *National antimicrobial Resistance Monitoring System* (NARMS) indicam que o percentual de *S. Heidelberg* isolados de fontes humanas e aviária resistente as cefalosporinas aumentou a partir de 1997. Neste ano, *S. Heidelberg* de origem humana apresentavam sensibilidade, enquanto apenas 1,6% daquelas de origem aviária eram resistentes a droga de uso veterinário, o ceftiofur. A partir de 2003, a resistência ao ceftiofur aumentou para 5,2 e 7,4% entre cepas isoladas de origem humana e de aves respectivamente, além de reduzida suscetibilidade a ceftriaxona (FDA, 2006).

O aumento da resistência às cefalosporinas está provavelmente associado com a disseminação da β -lactamase *AmpC*, a qual é codificada pelo gene *bla_{CMY}*. Este e outros genes de resistência estão associados com plasmídeos transmissíveis, os quais são importantes para a resistência às cefalosporinas (Winokur *et al.*, 200; Aarestrup *et al.*, 2004).

Entretanto devido a dificuldade na detecção ou mesmo na informação sobre microrganismos produtores de β -lactamases sua real prevalência é desconhecida, sabendo-se que são distribuídos mundialmente e que sua prevalência vem ascendendo vertiginosamente (Gupta, 2007).

Em *Salmonella* spp., as β -lactamases eram somente reconhecidas como codificadas em plasmídeos adquiridos de outras enterobactérias (Vahaboglu *et al.*, 2001; Hanson *et al.*, 2002; Carattoli *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2003), reforçado por Gupta, 2007 de que o mecanismo de aquisição pode ocorrer do mesmo modo que para outras enterobactérias, através de diferentes mecanismos.

A disseminação de β -lactamases pode ser cromossomal ou mediada por plasmídeos, podendo ser alguns destes genes carregados através de transposons ou integrons. Em alguns casos, os marcadores de resistência β -lactamases representam parte do integron, que possui um cassete de genes que também o codifica para outras classes de antibióticos, tais como aminoglicosídeos, trimetoprim, sulfonamidas, tetraciclinas e cloranfenicol, conseqüentemente, as cepas produtoras de ESBL são geralmente multirresistentes (Silva & Salvino, 2000, Aarestrup *et al.*, 2004; Zhao *et al.* 2006).

Como consequência, a disseminação de *Salmonella* spp. carregando β -lactamases de espectro estendido (ESBL) tem emergido mundialmente durante as últimas décadas, causando preocupação pelo fato de que as cefalosporinas são drogas de escolha para o tratamento de salmonelose em criança (WHO, 2003).

As ESBL constituem um grupo de enzimas derivadas das β -lactamases clássicas, todas já caracterizadas em *Salmonella* spp., representadas atualmente por diferentes famílias: TEM com >130 tipos, SHV (>50), a família CTX-M que preferencialmente hidrolisa cefotaxime e o grupo OXA, anteriormente relacionado somente em *P. aeruginosa*, apresenta diversos tipos identificados em *Salmonella* spp.

Particularmente TEM-1, TEM-2 e SHV-1, de maior frequência, conferem resistência às cefalosporinas de amplo espectro, penicilinas e monobactâmicos (aztreonam),



permanecendo a sensibilidade às cefamicinas e carbapenêmicos. Outra característica fenotípica importante é de que estas enzimas são sensíveis à ação dos inibidores de betalactamases, como sulbactam, ácido clavulânico e tazobactam.

Considerando o elevado percentual de cepas resistentes a estreptomicina, foram analisadas para a presença do gene *aadA1*, as cepas de *S. Heidelberg*, *S. Enteritidis* e *S. Infantis*. Os resultados revelaram sua presença em 40,0% de *S. Infantis*, seguido de *S. Heidelberg* (25,0%) e *S. Enteritidis* (14,3%).

A resistência aos aminoglicosídeos em sua maioria está mediada por enzimas capazes de modificar grupos amino ou hidroxila de sua molécula, bloqueando assim sua atividade antibacteriana, ao impedir a união do antibiótico às proteínas ribossômicas. São conhecidos três tipos de enzimas: O-adeniltransferases, N-acetiltransferases e O-fosfotransferases. Cada grupo está formado por diferentes proteínas mais ou menos estruturalmente distantes. Em *Salmonella* spp., os genes O-adeniltransferases mais comuns são do tipo *aadA* e *aadB*. O primeiro media resistência a estreptomicina e espectinomicina, enquanto o segundo confere resistência a gentamicina, kanamicina e tobramicina. Dentro do grupo *aadA* existem os subtipos, *aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, *aadA7*, *aadA21*, *aadA22* e *aadA23* (Michael *et al.*, 2006). Dos quatro tipos de genes de N-acetiltransferase, a literatura vem apontando em *Salmonella* somente *aac(3)* e *aac(6')*. Os mais comuns são *aac(3)*, que mediam resistência a gentamicina e aqueles que foram encontrados em diferentes sorovares como *Enteritidis*, *Typhimurium*, *Typhi*, *Agona* e *Choleraesuis* (Michael *et al.*, 2006).

Entre as cinco classes de fosfotransferases descritas, somente aquelas capazes de fosforilar os aminoglicosídeos nas posições 3', 3'' e 6, tem sido identificadas entre cepas de *Salmonella* spp.. Entre estes, destacam-se os genes *aphA*, que conferem resistência a kanamicina e neomicina (Chiu *et al.*, 2005; Michael *et al.*, 2006), os genes *strA* e *strB*, que mediam unicamente resistência a estreptomicina e normalmente se encontram juntos, precedidos, em muitos casos, de *sul2*, o que confere resistência às sulfonamidas (Pezzella *et al.*, 2004; Randall *et al.*, 2004). Na presente avaliação *sul 2* foi identificado em 41,7% das cepas de *S. Heidelberg*, sempre em associação com o gene *sul1*.

São descritos mais de 35 diferentes genes que codificam resistência a tetraciclina, relacionados a bombas de efluxo associadas à membrana capazes de exportar tetraciclina, oxitetraciclina e doxiciclina, enquanto *tetB*, além destes é capaz de exportar também a minociclina. Destes, *tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD* e *tetG* têm sido encontrados em *Salmonella*, sendo *tetA* e *tetB* com elevada frequência e em maior número de sorovares enquanto *tetC* e *tetD* são encontrados raramente (Frech & Schwarz, 2000; Michael *et al.*, 2006). No presente estudo, em face da reduzida casuística em nosso meio e considerando que o mesmo pode ser reconhecido como um marcador epidemiológico, somente foi pesquisada a presença do gene *tet D* tendo sido tomada como amostragem *S. Enteritidis* (4 cepas), *S. Typhimurium* (6), *S. Mbandaka* (3) e *S. Schwarzengrund* (3), todas com resultados negativos.

Este fenótipo de sensibilidade ao cloranfenicol e resistência ao florfenicol, detectado no presente estudo, reflete a ausência da pressão seletiva exercida pelo primeiro tendo em vista a proibição de seu uso pelo MAPA em 2003 (Brasil, 2003). Desde que o cloranfenicol passou a ser proibido em animais, seu análogo sintético fluorinado (Florfenicol) foi aprovado para tratamento em bovinos. Entre os genes identificados *cat*,



cml e *flo*, apenas este último codifica resistência para ambos, cloranfenicol e florfenicol (Bolton *et al.*, 1999).

Por outro lado, o cloranfenicol era considerado a droga de escolha para o tratamento da salmonelose, particularmente da febre tifóide no homem, bem como desta zoonose em animais durante um longo período de tempo, o que levou a seleção de cepas cloranfenicol-resistentes. Esta resistência é mediada por enzimas localizadas em plasmídeos, denominadas cloranfenicol-acetiltransferases (CAT) ou então de natureza não enzimática, que codifica para bomba de efluxo. A expulsão ativa do cloranfenicol/florfenicol das células bacterianas se processa mediante proteínas transportadoras específicas (*Cml* e *Flo*).

Em *Salmonella* spp. existem dois tipos de proteínas transportadoras de fencóis: o primeiro deles codificados pelo gene *cmlA* é responsável pelo transporte de cloranfenicol; o segundo tipo, capaz de mobilizar tanto o cloranfenicol como o florfenicol, estando codificado por genes *flo* em diferentes sorovares (Meunier *et al.* 2002, Doublet *et al.* 2004). De um modo geral, entre as cepas avaliadas, onde a expressão fenotípica da resistência foi observada, em muitos casos não foi detectado o gene associado sugerindo a presença de outra classe de genes. Além deste, outros fatores podem estar implicados como, super-expressão de bombas de efluxo de multirresistência as drogas ou então modificação do alvo de ligação da droga levando a ineficiência do antimicrobiano (Depardieu *et al.* 2007, Nishino *et al.* 2007).

Embora seja reconhecido o potencial zoonótico de *Salmonella* spp., o presente estudo aponta um quadro preocupante, considerando os sorovares circulantes e os fenótipos detectados, onde a capacidade de recepção e intercâmbio de genes de resistência antimicrobiana, passíveis de disseminação através da cadeia alimentar, pode representar uma condição de risco.

Exigindo um esforço contínuo da cadeia produtiva, seu monitoramento permite surpreender a introdução de sorovares exóticos, a detecção de características relevantes em saúde pública, representando em seu conjunto ferramentas epidemiológicas de suma importância para o conhecimento e adoção de medidas de controle.



Tabela 16. Perfis de resistência e genes detectados em S.Heidelberg.

PERFIL	GENES DETECTADOS
FFC,STR,CRO,CEP,TIO,SSS,AMP,ATM,CXM,AMC,CAZ	<i>bla_{CMY2} bla_{CTX}, aadA1, sul 1, sul 2</i>
FOX,FFC,STR,CRO,CEP,TIO,SSS,AMP,ATM,CXM,AMC,CAZ	<i>bla_{CMY2} bla_{CTX} sul 1</i>
FOX,FFC,STR,CRO,CEP,TIO,SSS,AMP,ATM,CXM,AMC,CAZ	<i>bla_{CMY2} bla_{CTX}, aadA1, sul 1, sul 2</i>
FOX,FFC,STR,CRO,CEP,TIO,SSS,AMP,ATM,CXM,AMC,CAZ	Negativo
FOX,FFC,STR,CRO,CEP,TIO,SSS,AMP,ATM,CXM,AMC,CAZ	<i>sul 1</i>
FFC,STR,TIO,SSS,AMP,ATM	Negativo
FFC,STR,CRO,CEP,TIO,SSS,AMP,ATM,CXM,AMC,CAZ,FEP	<i>bla_{CMY2} bla_{CTX}, bla_{TEM}, int 5'CS/3C', aadA1, sul1, sul2</i>
FFC,STR,CRO,CEP,TIO,SSS,AMP,ATM,CXM,AMC,CAZ,FEP	<i>bla_{TEM}, sul1, sul2</i>
FFC,STR,CRO,CEP,TIO,SSS,AMP,ATM,CXM,AMC,CAZ,FEP	<i>sul 1</i>
FFC,STR,CRO,CEP,TIO,SSS,AMP,ATM,CXM,AMC,CAZ,FEP	<i>sul 1</i>
FFC,STR,CRO,CEP,TIO,SSS,AMP,ATM,CXM,AMC,CAZ,FEP	<i>sul 1</i>
FFC,STR,CRO,CEP,TIO,SSS,AMP,ATM,CXM,AMC,CAZ,FEP	<i>sul 1</i>
FFC,STR,CRO,CEP,TIO,SSS,AMP,ATM,CXM,AMC,CAZ,FEP	<i>sul 1, sul 2</i>
FFC,STR,CRO,CEP,TIO,SSS,AMP,ATM,CXM,AMC,CAZ	<i>bla_{TEM}</i>



Tabela 17. Perfis de resistência, fagotipos e genes detectados em *S. Enteritidis*

PERFIL	PT	Genes Presentes
FFC,TIO,SSS,AMP	4	<i>bla</i> _{TEM}
FOX, FFC,ENR,CRO,CEP,SSS,AMP,TCY,NAL,CXM,NIT	5	<i>bla</i> _{TEM} , <i>sul</i> I
FFC,STR,ENR,TMP,TIO,SSS,TCY,NAL	4	<i>aadA1,sul</i> I
FFC,STR,ENR,AMP,TCY	4	<i>sul</i> I
FFC,STR,ENR,AMP,TCY	4	negativo
FOX,FFC,STR,ENR,CEP,SSS,AMP,NAL	4	negativo
FOX,FFC,STR,ENR,CEP,SSS,AMP,NAL,NIT	4	<i>sul</i> I
FOX,FFC,STR,ENR,CEP,SSS,AMP,NAL,NIT	4	<i>sul</i> I
FOX,FFC,STR,TIO,AMP,NAL,ATM	4	negativo
FOX, FFC,STR,ENR,SSS,AMP,NAL	4	negativo
FFC,STR,ENR,SSS,AMP,NAL	4	<i>sul</i> I
FFC,STR,CEP,TIO,AMP	1	negativo
FFC,STR,CEP,TIO,SSS,AMP	4	negativo
STR,TIO,SSS	1	negativo
FOX,STR,TIO,NAL,ATM	4	negativo
FOX,STR,TMP,CRO,CEP,TIO,SSS,CIP,AMP,NAL,ATM, SXT,NIT, AMC,CAZ,CXM	4	negativo
FOX,STR,TIO,SSSNAL,ATM	4	negativo
FOX,FFC,STR,TIO,SSSNAL	4	negativo



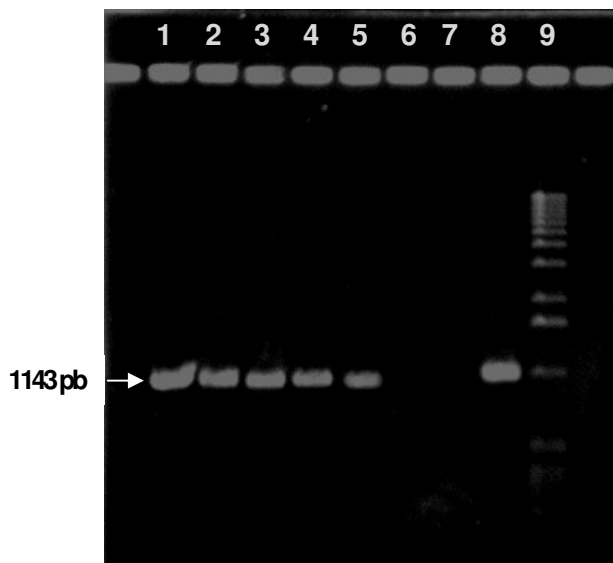
Tabela 18. Perfis de resistência, fagotipos e genes detectados em *S. Typhimurium*.

PERFIL	PT	GENES DETECTADOS
FFC,STR,GEN,AMP,TCY,ATM	208	Negativo
FFC,STR,TMP,SSS,AMP,TCY,SXT	193	Negativo
FOX,FFC,STR,TMP,SSS,AMP,TCY,SXT	193	Negativo
FFC,STR,TMP,SSS,AMP,TCY,NAL,SXT	193	Negativo
FFC,STR,TMP,SSS,AMP,TCY, SXT	ND	<i>sul 1</i>
FFC,STR,TMP,SSS,AMP,TCY,NAL,SXT	193	Negativo
STR,TIO,SSS, ATM	193	Negativo
STR,TIO,SSS,AMP,TCY,ATM	193	Negativo

Tabela 19. Perfis de resistência e genes detectados em *S. Infantis*

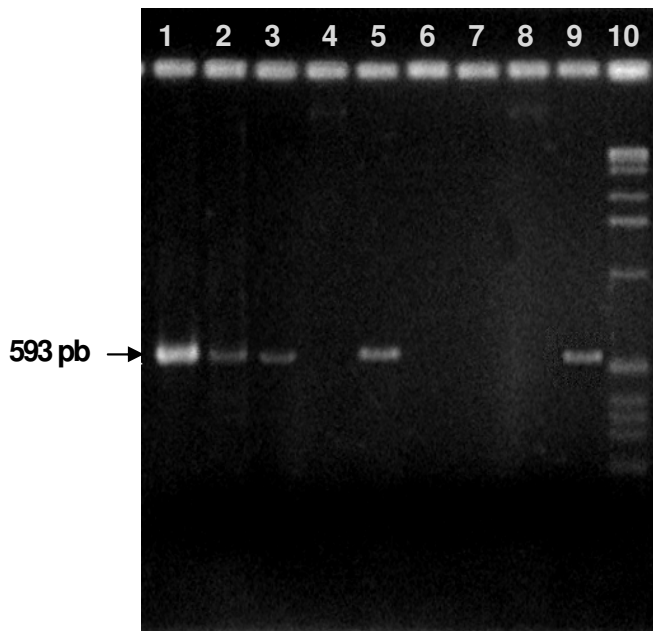
PERFIL	GENES DETECTADOS
FFC,STR,TIO,SSS,GEN,AMP	<i>aad A1</i>
FFC,STR,SSS,GEN,AMP	<i>aad A1</i>
FFC,STR,TIO,SSS,GEN,AMP	Negativo
FFC,STR,SSS,AMP,ATM	Negativo
FFC,STR,SSS,AMP,ATM	Negativo
STR,SSS	Negativo
STR,SSS	Negativo
STR,SSS	Negativo
STR,TMP,TIO,SSS,NAL,ATM,SXT	<i>sul I</i>
STR,TMP,TIO,SSS,NAL,ATM,SXT	<i>sul I</i>
STR,SSS,NAL	Negativo
STR,SSS	Negativo
STR,SSS	Negativo
STR,SSS	Negativo
STR,SSS	Negativo
STR,SSS	Negativo
STR,SSS	Negativo





Linhas: 1 a 5. *S.Heidelberg* (+); 6. *S.Heidelberg* (-); 7. Controle (-);
8. Controle (+); 9. Marcador de PM-1Kb

Figura 9. Amplificação por PCR de gene *cmy*



Linhas: 1, 2,3,5. *S.Heidelberg* (+); 4,6,7. *S.Heidelberg* (-);
8. Controle (-); 9. Controle (+);10. Marcador de PM-1Kb

Figura 10. Amplificação por PCR de gene *ctx*



5.2.2 Enterococcus

Um total de 542 amostras (1 amostra = 5 unidades de frango), que perfaz um total de 2.710 unidades de frango, foram analisadas no período de 2004 a 2006, quanto a presença de enterococos e desse total, 2.569 (95%) unidades amostrais foram positivas para esta bactéria. Um total de 8.187 colônias, identificadas como gênero *Enterococcus* pelo Laboratório Central dos Estados participantes no Programa, foram enviadas ao Instituto Adolfo Lutz (IAL) de São Paulo para determinação da espécie. A **Tabela 20** mostra o número de colônias enviadas ao IAL por Lacen. Destas, 27 colônias não foram caracterizadas quanto a espécie sendo 23 (0,3%) por estarem inviáveis e 4 (0,05%) por pertencerem a outro gênero. Entre as diferentes espécies já descritas no gênero *Enterococcus*, doze delas puderam ser identificadas entre as 8.160 colônias viáveis caracterizadas, como mostra a **Tabelas 21 e 21a**. Contudo, pudemos observar que houve uma predominância de quatro espécies: *E. faecalis* (61,4%), *E. gallinarum* (28,7%), *E. casseliflavus* (5,06%) e *E. faecium* (2,2%) que estão representando cerca de 97% do total das colônias identificadas. Na **Tabelas 22 e 22a**, temos a distribuição das 12 espécies identificadas com relação a região geográfica, e podemos observar que as quatro principais espécies estão uniformemente distribuídas entre as cinco regiões.

Tabela 20. Distribuição de *Enterococcus* spp. encaminhados pelos Lacen ao Instituto Adolfo Lutz, no período de 2004 a 2006.

ESTADO	Nº. DE COLÔNIAS RECEBIDAS
AL	489
AP	497
CE	482
DF	529
ES	517
GO	436
MG	635
MS	654
PR	309
RJ	587
RN	575
RS	641
SC	500
SP*	678 + 658
Total	8187

* SP: laboratórios de SP e Ribeirão Preto.



Tabela 21. Distribuição das espécies de *Enterococcus* identificadas no Instituto Adolfo Lutz, no período de 2004 a 2006 (continua).

ESPÉCIES DE ENTEROCOCOS IDENTIFICADAS							
Estado	<i>E. avium</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. columbae</i>	<i>E. dispar</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
AL	-	16	-	2	3	302	5
AP	-	34	-	-	7	256	24
CE	-	30	-	-	2	327	17
DF	-	13	-	2	13	391	18
ES	-	10	-	-	8	288	10
GO	-	8	-	-	3	375	8
MG	-	51	-	-	-	389	1
MS	-	8	-	1	2	408	4
PR	-	9	-	-	1	254	7
RJ	-	46	-	1	6	338	31
RN	-	28	-	-	1	328	3
RS	1	56	-	1	4	361	5
SC	-	35	-	5	13	314	22
SP*	1	69	1	5	14	679	24
Total	2 (0,024)	413 (5,06)	1 (0,012)	17 (0,21)	77 (0,95)	5010 (61,4)	179 (2,2)

Tabela 21a. Distribuição das espécies de *Enterococcus* identificadas no Instituto Adolfo Lutz, no período de 2004 a 2006 (continuação).

ESPÉCIES DE ENTEROCOCOS IDENTIFICADAS							
Estado	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. raffinosus</i>	<i>E. mundtii</i>	<i>E. ratti</i>	<i>Enterococcus</i> sp	Total
AL	149	5	-	-	-	7	489
AP	153	10	-	1	-	10	495
CE	102	2	-	-	-	1	481
DF	73	9	-	-	-	8	527
ES	187	4	-	2	-	7	516
GO	42	-	-	-	-	-	436
MG	189	-	-	-	-	-	630
MS	226	1	-	-	-	2	652
PR	36	-	-	-	-	2	309
RJ	152	7	-	-	1	3	585
RN	197	5	1	-	-	6	569
RS	209	-	-	1	-	2	640
SC	96	10	-	2	-	2	499
SP*	532	5	-	1	-	1	1332
Total	2343 (28,7)	58 (0,71)	1 (0,012)	7 (0,09)	1 (0,012)	51 (0,62)	8160



Tabela 22. Distribuição por região geográfica das espécies identificadas do Gênero *Enterococcus* identificadas pelo Instituto Adolfo Lutz no período de 2004 a 2006 (continua).

REGIÃO GEOGRÁFICA	ESPÉCIES DE ENTEROCOCOS IDENTIFICADAS						
	<i>E. avium</i>	<i>E. casseliflavus</i>	<i>E. columbae</i>	<i>E. dispar</i>	<i>E. durans</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. faecium</i>
NORTE	-	34 (6,9)	-	-	7 (1,4)	256 (51,7)	24 (4,8)
NORDESTE	-	74 (4,8)	-	2 (0,2)	6 (0,4)	957 (62,2)	25 (1,6)
CENTRO-OESTE	-	29 (1,8)	-	3 (0,2)	18 (1,1)	1174 (72,7)	30 (1,8)
SUDESTE	1(0,03)	176 (6)	1 (0,03)	6 (0,2)	28 (1)	1694 (55,3)	66 (2,1)
SUL	1(0,1)	100 (7)	-	6 (0,5)	18 (1,2)	929 (64,1)	34 (2,4)

Tabela 22a. Distribuição por região geográfica das espécies identificadas do Gênero *Enterococcus* identificadas pelo Instituto Adolfo Lutz no período de 2004 a 2006 (continuação).

REGIÃO GEOGRÁFICA	ESPÉCIES DE ENTEROCOCOS IDENTIFICADAS						Total (N/%)
	<i>E. gallinarum</i>	<i>E. hirae</i>	<i>E. raffinosus</i>	<i>E. mundtii</i>	<i>E. ratti</i>	<i>Enterococcus</i> sp	
NORTE	153 (31)	10 (2)	-	1 (0,2)	-	10 (2)	495 (6)
NORDESTE	448 (29)	12 (0,8)	1 (0,06)	-	-	14 (0,9)	1539 (19)
CENTRO-OESTE	341 (21)	10 (0,7)	-	-	-	10 (0,7)	1615 (20)
SUDESTE	1060 (34,4)	16 (0,5)	-	3 (0,1)	1 (0,03)	11 (0,3)	3063 (37)
SUL	341 (23)	10 (1)	-	3 (0,2)	-	6 (0,5)	1448 (18)

Com a finalidade de selecionar a amostragem a ser analisada quanto a concentração inibitória mínima (CIM) foi utilizado o seguinte critério:

- marca analisada por até 5 vezes em momentos diferentes, todas as amostras foram selecionadas para o teste;
- marca analisada de 6 até 10 vezes, 50% das amostras foram selecionadas;
- marca analisada de 11 a 25 vezes, 25% das amostras foram selecionadas;
- marca analisada por mais de 25 vezes, foram selecionadas 15% das amostras.

No caso de mais de um produtor por marca, levou-se em consideração o número de amostras por estado produtor.

Portanto, 262 (48%) amostras, representadas por 2.136 colônias, foram avaliadas quanto ao perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos pela técnica de microdiluição em caldo (CIM), segundo critérios do CLSI de 2006. Os antibióticos testados foram: vancomicina (VAN), teicoplanina (TEC), ampicilina (AMP), tetraciclina (TCY), ciprofloxacina (CIP), eritromicina (ERI), cloranfenicol (CHL), linezolida (LNZ), quinupristina-dalfopristina (QDA),



gentamicina (GNH) e estreptomicina (STH). Conforme a **Figura 11**, podemos observar que 75% das colônias foram sensíveis a vancomicina, 1% foi resistente (VRE) e 24%, intermediário, sendo estes representado pelas espécies *E. gallinarum* e *E. casseliflavus* (n=506), espécies que apresentam resistência intrínseca a este antibiótico. A resistência a vancomicina (1%) foi detectada entre os isolados remetidos por cinco Lacen (ES, G O, RP, RS e SC) e caracterizados nas espécies *E. faecalis* e *E. faecium*. Encontrou-se 100% de sensibilidade a ampicilina, 98,9% à teicoplanina, 96,4% à linezolida, 87,5% à gentamicina, 71% à estreptomicina. Entretanto, menor nível de sensibilidade foi detectado para ciprofloxacina (31,3%), cloranfenicol (26,9%), tetraciclina (19,6%), eritromicina (15,4%) e quinupristina-dalfopristina (4,5%).

As **Figuras 12, 13, 14 e 15** mostram a distribuição do perfil de suscetibilidade aos onze antibióticos testados para as quatro principais espécies identificadas. Podemos observar que a espécie *E. casseliflavus* apresentou maior sensibilidade à tetraciclina (50,9%) e menor a eritromicina (4,7%). A espécie *E. faecalis* foi a que apresentou menor sensibilidade a quinupristina-dalfopristina (1,4%), com relação as outras três espécies.

As cepas de enterococos avaliadas quanto ao perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos representaram as 104 marcas diferentes de frango analisadas. Portanto, as **Tabelas 23, 23a e 23b** apresentam a distribuição do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos nos diferentes Estados produtores. A resistência a vancomicina foi observada nas amostras de nove marcas diferentes de frango produzidas nos seguintes estados: São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul e Distrito Federal.

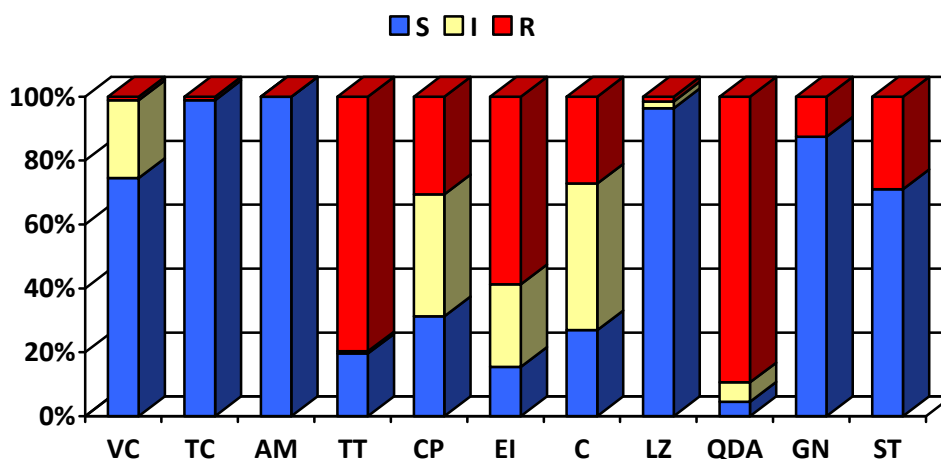


Figura 11. Distribuição do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de 2.136 colônias de *Enterococcus* spp, recebidas pelo IAL no período de 2004 a 2006 (VC, vancomicina, TC, teicoplanina, GN, gentamicina, ST, estreptomicina, AM, ampicilina, TT, tetraciclina, EI, eritromicina, CI, clindamicina, C, cloranfenicol, LZ, linezolida, QDA, quinupristina-dalfopristina).

S: susceptível
I: indeterminado
R: resistente



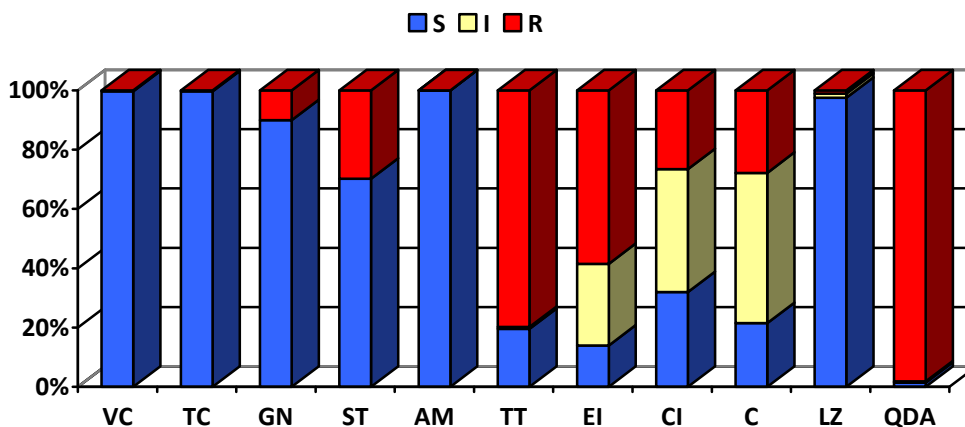


Figura 12. Distribuição do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das 1.501 colônias de *E. faecalis* avaliadas pela técnica da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para 11 antibióticos (VC, vancomicina, TC, teicoplanina, GN, gentamicina, ST, estreptomicina, AM, ampicilina, TT, tetraciclina, EI, eritromicina, CI, clindamicina, C, cloranfenicol, LZ, linezolida, QDA, quinupristina-dalfopristina).

S: suscetível
 I: indeterminado
 R: resistente

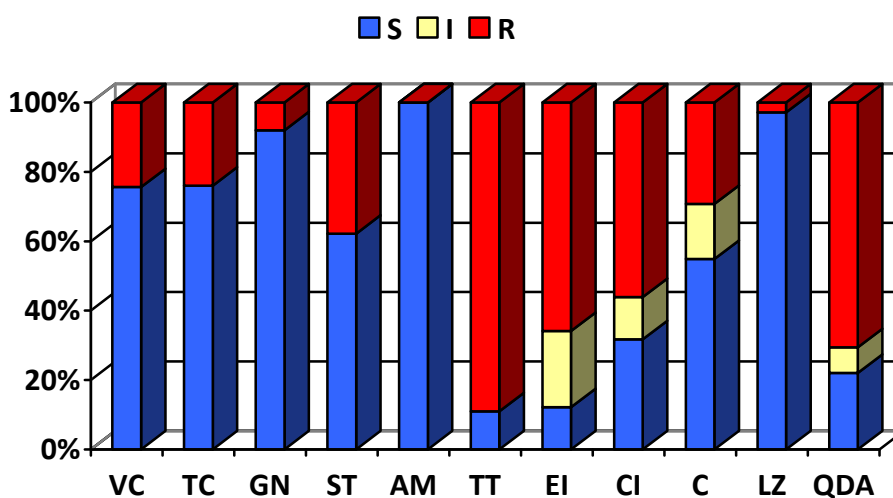


Figura 13. Distribuição do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das 82 colônias de *E. faecium* avaliadas pela técnica da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para 11 antibióticos (VC, vancomicina, TC, teicoplanina, GN, gentamicina, ST, estreptomicina, AM, ampicilina, TT, tetraciclina, EI, eritromicina, CI, clindamicina, C, cloranfenicol, LZ, linezolida, QDA, quinupristina-dalfopristina).

S: suscetível
 I: indeterminado
 R: resistente



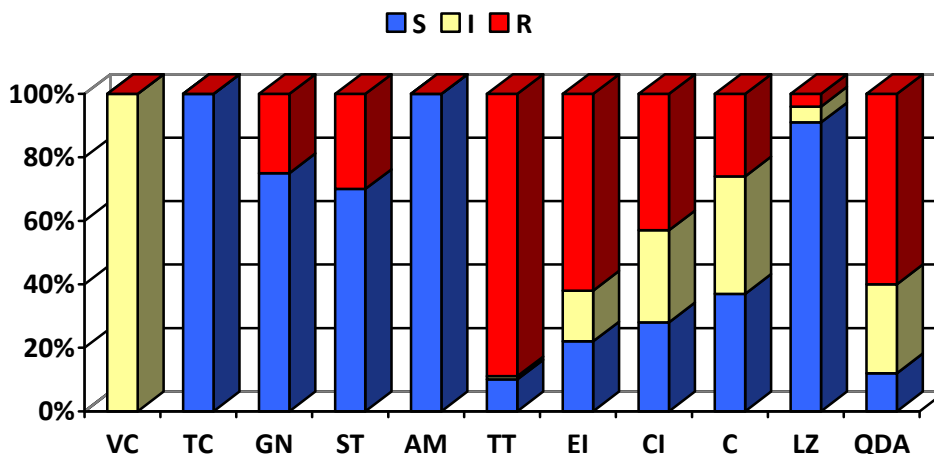


Figura 14. Distribuição do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das 400 colônias de *E. gallinarum* avaliadas pela técnica da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para 11 antibióticos (VC, vancomicina, TC, teicoplanina, GN, gentamicina, ST, estreptomicina, AM, ampicilina, TT, tetraciclina, EI, eritromicina, CI, clindamicina, C, cloranfenicol, LZ, linezolida, QDA, quinupristina-dalfopristina).

S: suscetível
I: indeterminado
R: resistente

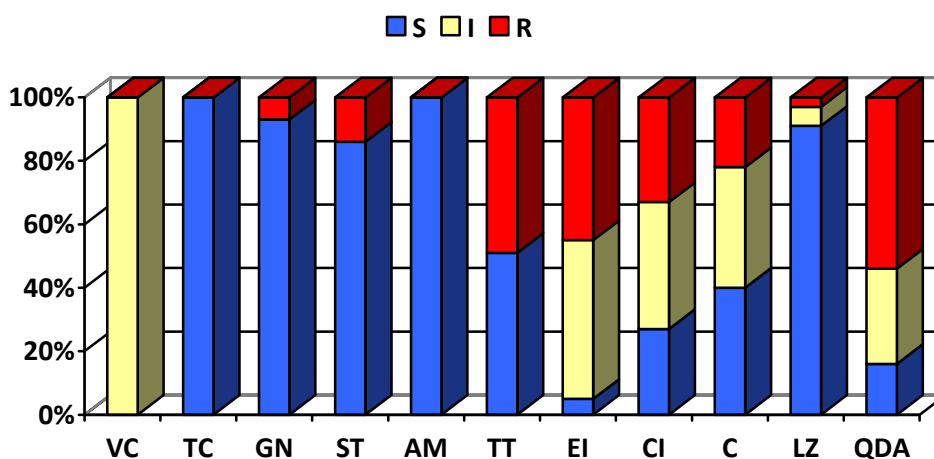


Figura 15. Distribuição do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das 106 colônias de *E. casseliflavus* avaliadas pela técnica da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para 11 antibióticos (VC, vancomicina, TC, teicoplanina, GN, gentamicina, ST, estreptomicina, AM, ampicilina, TT, tetraciclina, EI, eritromicina, CI, clindamicina, C, cloranfenicol, LZ, linezolida, QDA, quinupristina-dalfopristina).

S: suscetível
I: indeterminado
R: resistente



Tabela 23. Distribuição do perfil de susceptibilidade antimicrobiana das 2.135 colônias de *Enterococcus spp.*, considerando os estados produtores de carne de frango congelada para consumo humano (continua).

ESTADO PRODUTOR	Glicopeptídeo			Glicopeptídeo			Aminoglicosídeo			Aminoglicosídeo			Penicilina		
	Vancomicina			Teicoplanina			Gentamicina			Estreptomicina			Ampicilina		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
SP (426)	66	31	3	97	-	3	81	-	19	69	-	31	100	-	-
SC (316)	85	12	3	98	-	2	91	-	9	74	-	26	100	-	-
PR (281)	78	21	1	99	-	1	78	-	22	68	-	32	100	-	-
MG (260)	78	22	-	100	-	-	91	-	9	70	-	30	100	-	-
RS (253)	64	35	1	99	-	1	84	-	16	75	-	25	100	-	-
PE (157)	82	18	-	100	-	-	97	-	3	75	-	25	100	-	-
GO (92)	92	8	-	100	-	-	95	-	5	69	-	31	100	-	-
MT (92)	62	38	-	100	-	-	95	-	5	67	-	33	100	-	-
MS (55)	83	17	-	100	-	-	100	-	-	81	-	19	100	-	-
BA (43)	67	33	-	100	-	-	81	-	19	67	-	33	100	-	-
DF (41)	84	11	5	95	-	5	73	-	27	54	-	46	100	-	-
RN (41)	69	31	-	100	-	-	98	-	2	68	-	32	100	-	-
ES (40)	78	22	-	100	-	-	100	-	-	73	-	27	100	-	-
PA (34)	90	10	-	100	-	-	93	-	7	83	-	17	100	-	-
CE (31)	73	27	-	100	-	-	100	-	-	63	-	37	100	-	-
RJ (16)	60	40	-	100	-	-	100	-	-	52	-	48	100	-	-
AP (7)	100	-	-	100	-	-	100	-	-	66	-	34	100	-	-
AL (3)	67	33	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-	100	-	-



Tabela 23a. Distribuição do perfil de susceptibilidade antimicrobiana das 2.135 colônias de *Enterococcus spp.*, considerando os estados produtores de carne de frango congelada para consumo humano (continuação).

ESTADO PRODUTOR	Tetraciclínas			Macrolídeo			Fluoroquinolona		
	Tetraciclina			Eritromicina			Ciprofloxacina		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
SP (426)	14	1	85	17	21	62	33	34	33
SC (316)	24	1	75	22	23	55	29	35	36
PR (281)	31	1	68	14	36	50	29	46	25
MG (260)	17	1	82	10	33	57	15	45	40
RS (253)	8	0,4	90,6	17	21	62	34	42	24
PE (157)	22	-	78	15	28	57	30	31	39
GO (92)	13	1	86	18	15	67	53	32	15
MT (92)	20	-	80	9	25	66	50	39	11
MS (55)	13	-	87	11	19	70	45	21	34
BA (43)	12	2	86	21	37	42	21	49	30
DF (41)	8	-	92	5	5	90	49	-	51
RN (41)	25	-	75	15	27	58	19	49	32
ES (40)	27	-	73	-	32	68	24	31	45
PA (34)	45	-	55	17	38	45	69	14	17
CE (31)	37	-	63	10	43	47	10	63	27
RJ (16)	27	-	73	20	20	60	33	7	60
AP (7)	33	-	67	17	17	66	66	17	17
AL (3)	-	-	100	-	33	67	-	33	67



Tabela 23b. Distribuição do perfil de susceptibilidade antimicrobiana das 2.135 colônias de *Enterococcus* spp., considerando os Estados produtores de carne de frango congelada para consumo humano (continuação).

ESTADO PRODUTOR	Fenicol			Oxazolidinona			Estreptogramina		
	Cloranfenicol			Linezolida			Quinupristina-Dalfopristina		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
SP (426)	43	32	25	93	2	5	12	6	82
SC (316)	17	58	25	98	1	1	5	10	85
PR (281)	30	52	18	99	1	-	4	6	90
MG (260)	27	55	18	86	10	4	4	1	95
RS (253)	20	52	28	100	-	-	1	10	89
PE (157)	21	40	39	100	-	-	4	3	93
GO (92)	37	25	38	100	-	-	10	-	90
MT (92)	3	64	33	100	-	-	3	1	97
MS (55)	26	31	43	100	-	-	100	-	-
BA (43)	28	46	26	100	-	-	7	13	80
DF (41)	35	15	50	100	-	-	-	5	95
RN (41)	15	39	46	100	-	-	-	13	87
ES (40)	36	27	37	100	-	-	8	10	82
PA (34)	41	28	31	100	-	-	-	10	90
CE (31)	17	57	26	80	13	7	90	-	10
RJ (16)	80	13	7	100	-	-	40	7	53
AP (7)	33	50	17	100	-	-	100	-	-
AL (3)	100	-	-	100	-	-	-	33	67

Enterococos são bactérias amplamente distribuídas, estão presentes em uma grande variedade de alimentos e podem ser consideradas como indicadoras de contaminação fecal. Esta bactéria faz parte da microbiota intestinal do homem e de outros animais e apresenta resistência intrínseca a vários antibióticos, incluindo cefalosporinas, penicilinas, lincosaminas e aminoglicosídeos.

Atualmente, existe uma grande preocupação quanto ao aumento da resistência antimicrobiana adquirida pela bactéria, a qual reduz a eficiência de antibióticos utilizados para o tratamento e prevenção de doenças infecciosas. Muitos antibióticos, incluindo alguns importantes para a medicina humana, são adicionados à ração animal como promotor de crescimento e como proposta profilática. Embora esta alternativa tecnológica favoreça um melhor desempenho dos animais, especialmente para frangos e suínos, o uso de antibióticos na produção animal pode selecionar microrganismos resistentes que podem ser transferidos ao homem através da ingestão de alimentos contaminados.

A avoparcina, que é uma molécula similar à vancomicina exibe o mesmo mecanismo de ação e de resistência. Dada a emergência de resistência cruzada entre estes antibióticos, em 1997 o consumo da avoparcina foi proibido na União Européia. No Brasil, o uso desta droga na ração animal foi proibido em 1998. Entretanto, outros antimicrobianos como avilamicina, bacitracina de zinco, clorexidina, espiramicina, flavomicina, lincomicina,



sulfato de colistina, sulfato de tilosina e virginiamicina são ainda utilizados como aditivos na ração animal.

Resultados similares ao encontrado neste estudo, presença de 95% de enterococos, tem sido reportados confirmando a alta frequência desta bactéria em produtos de origem animal (Hayes *et al.*, 2003; McGowan *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2008). E como já mencionado anteriormente, esta alta ocorrência pode ser atribuída à presença natural da bactéria no trato gastrointestinal e pela habilidade do microrganismo de sobreviver por um período em condições ambientais desfavoráveis.

A prevalência da espécie de *E. faecalis* entre as 4 principais espécies identificadas neste estudo, está de acordo como encontrado na literatura (Fracalanza *et al.*, 2007; Miranda *et al.*, 2007; Pavia *et al.*, 2000).

Enterococcus spp., particularmente *E. faecium* e *E. faecalis*, como já mencionado anteriormente apresentam resistência intrínseca à vários antimicrobianos e podem adquirir genes de resistência para outras classes.

Neste estudo, independente da espécie, foi verificado certo grau de resistência aos antimicrobianos avaliados, com exceção da ampicilina que apresentou 100% de sensibilidade. Outra informação importante também verificada, foi a baixa resistência à vancomicina encontrada (1%), visto a existência da publicação de presença de VRE (9%) em frango exportado pelo Japão (Ike *et al.*, 1999). Em outros estudos brasileiros VRE não foi encontrado em amostras de frango e na cultura de swabs da cloaca de frangos (Fracalanza *et al.*, 2006; Xavier *et al.*, 2006; Leme *et al.*, 2000).

Embora o uso da tetraciclina como promotor de crescimento seja proibido no Brasil desde 1998, este antibiótico, juntamente com a eritromicina é muito utilizado na terapêutica animal (Oliveira *et al.*, 2005), contribuindo assim com o elevado nível de resistência encontrado neste estudo para estes antibióticos.

A quinupristina-dalfopristina é um antibiótico que pertence ao grupo das estreptograminas, assim como a virginiamicina, e tem seu uso aprovado pelo FDA (1999) para tratamento de infecções humanas causadas por *E. faecium* resistente à vancomicina. Entretanto, o *E. faecalis* apresenta resistência intrínseca a este antibiótico e neste estudo sua casuística é de 65% entre as espécies identificadas, justificando o elevado percentual de resistência detectado. Paralelamente, estes resultados representam um alerta, tendo em vista sua reação cruzada pelo uso da virginiamicina, a qual é utilizada como promotor de crescimento (Rende-Fournier *et al.*, 1993).

O elevado nível de resistência para aminoglicosídeos implica diretamente com o tratamento de infecções graves por enterococos, no qual se utiliza um aminoglicosídeo associado a um antibiótico beta-lactâmico ou glicopeptídeo. Neste estudo a resistência encontrada foi de 12,5% para gentamicina e 29% para estreptomicina, que se assemelha aos resultados encontrados por Fracalanza *et al.* (2007).

Considerando que no Brasil os estudos de presença de enterococos nos alimentos são escassos, os resultados apresentados neste estudo indicam a importância do monitoramento, visto que esta bactéria pode estar associada a disseminação da resistência aos antimicrobianos.





6. CONCLUSÕES

- Em relação à verificação de adequação dos rótulos às exigências da RDC nº 13/2001, os resultados das análises mostram que a grande maioria dos produtores de frango atendem ao estabelecido na legislação, que tem por objetivo instruir os consumidores quanto ao manuseio correto do produto, como medida de prevenção sobre agravos à saúde.
- Na análise quanto à região geográfica, o maior número de isolamentos de *Salmonella* foi obtido na região sudeste (50,4%), com prevalência de *S. Enteritidis* seguido de *S. Typhimurium* nas regiões sudeste, norte e centro-oeste;
- O teste de suscetibilidade aos antimicrobianos revelou que a totalidade das cepas apresentou resistência a uma ou mais drogas usualmente empregadas em medicina humana e veterinária, tendo sido reconhecidos 98 perfis de multirresistência;
- Os elevados percentuais de resistência aos antimicrobianos nas cepas analisadas alertam para uma condição de risco, tendo em vista as possíveis implicações no tratamento empírico de quadros clínicos graves de salmonelose;
- Resistência cruzada foi observada entre drogas de última geração, de uso veterinário exclusivo, com aquelas empregadas na clínica humana, provavelmente pela sua utilização em animais, com finalidades terapêuticas, profiláticas ou promotoras do crescimento, contribuindo para a disseminação do *pool* de genes de resistência na população bacteriana;
- A resistência as cefalosporinas de 3ª geração representa uma séria ameaça de falha terapêutica no tratamento de infecções determinadas por *Salmonella* spp. particularmente em crianças;
- As expressivas, resistência e multirresistência aos antimicrobianos observadas no presente estudo refletem a associação de genes que codificam para esta característica, apesar de não terem sido detectados na totalidade das cepas avaliadas;
- A detecção durante o período de avaliação de *S. Heidelberg* portadoras de cassette de genes incluindo resistência a cefalosporina de 3ª geração aponta a introdução em nosso meio de clone com características exóticas, amplamente disseminado em países do hemisfério norte;
- A elevada frequência de fagotipos relevantes, entre *S. Enteritidis* (PT4 e PT1) e *S. Typhimurium* (PT193 e PT208) de disseminação mundial, reconhecidos por carrear cassetes gênicos que conferem resistência a distintas classes de antimicrobianos, aponta um potencial problema de segurança alimentar;
- A realização de estudo abrangente permite avaliar o cumprimento das normas de proibição do uso de determinadas drogas e acompanhar o papel de certos fármacos de uso veterinário exclusivo, cuja similaridade química possa resultar em resistência àqueles de utilização terapêutica humana;



- Atividades contínuas de vigilância, higiene na manipulação de alimentos e caracterização da resistência com a utilização criteriosa de drogas antimicrobianas representam ferramentas relevantes para prevenir a disseminação de populações bacterianas multirresistentes.
- Os resultados do Prebaf mostram elevada positividade de *Enterococcus* spp. (próxima de 100%) nas análises realizadas e revelam níveis variáveis de resistência aos antimicrobianos
- A detecção de resistência a vancomicina, embora em percentuais reduzidos (1%), entre as espécies de importância hospitalar humana alerta para necessidade de continuo monitoramento da resistência a este antimicrobiano, tendo em vista a possibilidade de sua disseminação através da cadeia alimentar.
- Considerando as características zoonóticas de *Salmonella* spp., a presença de microrganismos de origem fecal, representados pelos *Enterococcus* spp., e os perfis de resistência aos antimicrobianos detectados, em seu conjunto tais resultados refletem a existência de pontos frágeis que podem estar desde a cadeia produtiva até a exposição do produto para venda.

7. RECOMENDAÇÕES

- Efetuar o monitoramento contínuo de *Salmonella*, nos produtos de origem avícola o qual permite, indiretamente, avaliar a aplicação da análise de perigos e pontos críticos de controle e o risco de veiculação destes patógenos para o consumidor;
- Detectar a magnitude da resistência aos antimicrobianos, particularmente em relação aos fármacos de escolha terapêutica na salmonelose invasiva no homem;
- Caracterizar os clones multirresistentes quanto a sua capacidade de albergar e, obviamente, disseminar genes de resistência, visando assegurar o tratamento clínico apropriado e orientar intervenções de saúde pública;
- Dar continuidade no monitoramento de *Salmonella* spp., visando através do rastreamento molecular, a caracterização dos clones multirresistentes circulantes, resistentes ou exóticos, buscando determinar no âmbito nacional e/ou internacional sua origem geográfica;
- Considerando a intervenção de outros patógenos de relevância em saúde pública, na cadeia produtiva de frangos, justifica-se ampliar o presente estudo envolvendo além de *Salmonella* spp. e *Enterococcus* spp., *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter* spp.



8. BIBLIOGRAFIA

- Aarestrup, F.M. Monitoring of antimicrobial resistance among food animals: principles and limitations. **J. Infect. Dis. Vet. Public Health**. v. 51, p.380-388. 2004.
- Alcocer; I., Oliveira, K.M.P.; Vidotto, M.C.; Oliveira, T.C.R.M.. Discriminação de sorovares de *Salmonella spp.* isolados de carcaças de frango por REP e ERIC-PCR e fagotipagem do sorovar Enteritidis. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. v.26 n.2 . 2006
- Angulo, F.J., Johnson, K.R., Tauxe, R.V. & Cohen, M.L. Origins and consequences of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella*: implications for the use of fluoroquinolones in foods animals. **Microb. Drug. Resist.** v. 6, p. 77-83. 2000.
- Asensi, M.D.; Costa, A.P.; Reis, E.M.F.; Hofer, E. Lysotypes and plasmidial profiles of *Salmonella* serovar Typhimurium isolated from children with enteric process in the cities of Rio de Janeiro, RJ, and Salvador, BA–Brazil. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, 37(4), 297–302. 1995.
- Back, A., Beltrão, N. & Leão, J.A. Monitoria e controle de *Salmonella*: Aspectos práticos. VII Simpósio Brasil Sul de Avicultura. Chapecó- SC. 2006
- Barreto E.S. & Ramos S.M. Pesquisa de *Salmonella* em cortes congelados de frango comercializados no município do Rio de Janeiro. **Hig. Alim. São Paulo**. v.13, p.53-54. 1999
- Berrang, M.E., Ladely¹, S.R., Simmons, M.D., Fletcher, L. & Fedorka-Cray, P.J. Antimicrobial Resistance Patterns of *Salmonella* from Retail Chicken. **Int. J. Poultry Sci.** v. 5, p. 351-354. 2006
- Bogaard A.E., Stobberingh EE. Antibiotic usage in animals: impact on bacterial resistance and public health. **Drugs** v.58. n 4. p. 589-607. 1999;
www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi
- Bottezini, I.M.P.; Corso, M.P. e Veit, V.M. Uso de Antibióticos na produção de Frango. CEFET/PR - www.dipemar.com.br/carne/materia_arttec_carne.htm. 2003.
- Brasil/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA. Instrução Normativa Nº 9 de 27/06/2003. Seção 1, p. 4. 2003.
- Brasil/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento-MAPA. Legislação de Defesa Sanitária Animal – Avicultura. Programa Nacional de Sanidade Avícola. 312 p. 2002.
<http://200.199.118.140/emdagro/PNSA>
- Bush, K. New β -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clin. Infect. Dis.** v. 32, p.1085-1089. 2001
- Caffer, M.I.; Terragno, R.; Alcain, A. & Eiguer, T. *Salmonella* serovars in Argentina: 1991-1995. In: *Salmonella* and Salmonellosis Proceedings. Zoopôle. Ploufragan, v. 20/22. p. 577-580. 1997.
- Capita, R., Alvarez-Astorga, M., Alonso-Calleja, C., Moreno, B. & Garcia-Fernández, M.C. Occurrence of Salmonellae in retail carcasses and their products in Spain. **J. Food Microbiol.** v. 81, p. 169-173. 2003
- Carattoli, F. Tosini, W. P. Giles, M. E. Rupp, S. H. Hinrichs, F. J. Angulo, T. J. Barrett, and P. D. Fey. Characterization of Plasmids Carrying CMY-2 from Expanded-Spectrum Cephalosporin-Resistant *Salmonella* Strains Isolated in the United States between 1996 and 1998. **Antimicrob. Agents Chemother.** p. 1269–1272. 2002



Cogan, T.A.; Jorgensen, F.; Lappin-Scott, H.M.; Benson, C.E.; Woodward, M.J.; Humphrey, T.J. Flagella and curli *fimbriae* are important for the growth of *Salmonella enterica* serovars in hen eggs. **Microbiol.**, v. 150, n. 4, p. 1.063-1.071, 2004.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. *Salmonella* Surveillance: Annual Summary, 2003. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2004

Chen, S., S. Zhao, D. G. White, C. M. Schroeder, R. Lu, H. Yang, P. F. McDermott, S. Ayers y J. Meng. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats. **Appl. Environ. Microbiol.** v.70, p. 1-7. 2004.

Chiu, C. H., P. Tang, C. Chu, S. Hu, Q. Bao, J. Yu, Y. Y. Chou, H. S. Wang, and Y. S. Lee. The genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis, a highly invasive and resistant zoonotic pathogen. **Nucleic Acids Res.** v. 33, p.1690–1698. 2005.

CDC/Center For Diseases Control. Update: *Salmonella* Enteritidis Frequently Asked Questions. www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/salment/g.htm

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M101-S9, V.25 No. 1. 2006.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100- A11-V23. 2005

CLSI/NCCLS Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Informational Supplement. NCCLS document M31-S1. 2004

Cui, S., Ge, B., Zheng, J. & Meng, J. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* serovars in organic chickens from Maryland retail stores. **Appl. Environ. Microbiol.** v.71 p.4108-4111. 2005

Daly, M., L. Villa, C. Pezzella, S. Fanning y A. Carattoli. Comparison of multidrug resistance gene regions between two geographically unrelated *Salmonella* serotypes. **J. Antimicrob. Chemother.** v. 55, p.558-61. 2005.

DANMAP. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark. <http://www.dfvp.dk>.

Depardieu F, Podglajen I, Leclercq R, et al. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. **Clin .Microbiol. Rev.** v. 20, p.79–114. 2007.;

Dordari, S. Prevalence and drug sensitivity of *Salmonella* serogroups isolates in chicken meat of chain stores of Iran. ASM Conference. 9-13/9/06. Victoria, CN C-6 pg 39, 2006

FAO/ORG. Exposure assessment of *Salmonella* Enteritidis in eggs. www.fao.org/DOCREP/005/Y4392E/y4392e0e.htm 2006.

FDA.National Antimicrobial Resistance Monitoring System-Enteric Bacteria (NARMS): 2003 Executive report. US Department of Health and Human Services, US Food and Drug Administration, Rockville, MD. 2006.

Ferreira, A.P. & Astolfi-Ferreira, C.S. Medidas inespecíficas para o controle bacteriano. VII Simpósio Brasil Sul de Avicultura. Abril de 2006. Chapecó- SC – Brasil.

Fonseca, E. L. Caracterização dos perfis de resistência a antimicrobianos e diversidade genômica em cepas de *Salmonella* Infantis isoladas no Brasil de 1994 a 2001. Rio de



Janeiro; Dissertação [Mestrado em Biologia Parasitária] Instituto Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ. 86 p. 2003.

Fonseca, E.L., Mykytzcuk, O.L., Asensi, M.D., Reis, E.M.F., Ferraz, L.R., Paula, F.L., Ng, L.K. & Rodrigues, D.P. Clonality and antimicrobial Resistance gene profiles of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Infantis from four public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Clin. Microbiol.** v. 44, p. 2767-2772. 2006.

Forsythe, S.J. Microbiologia da Segurança Alimentar. Porto Alegre. Artmed. 424 p. 2002

Franco, B.D.G.M. & Landgraf, M. Microrganismos patogênicos de importância em alimentos. In: Microbiologia dos Alimentos. Ed. Atheneu. p.33 - 81, 1996.

Frech, G. y S. Schwarz. Molecular analysis of tetracycline resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, Dublin, Choleraesuis, Hadar and Saintpaul: construction and application of specific gene probes. **J. Appl. Microbiol.** v. 89, p.633-641. 2000.

Frost, L. S., R. Leplae, A. O. Summers, and A. Toussaint. Mobile genetic elements: The agents of open source evolution. **Nat. Rev. Microbiol.** v. 3, p.722-732. 2005.

Fuzihara T.O., Fernandes A.F. & Franco B.D.G.M. Prevalence and dissemination of *Salmonella* serotypes along the slaughtering process in Brazilian small poultry slaughterhouses. **J. Food Protect.** v. 63, p.1749-1753. 2000.

Gast R.K. & Holt P.S., Experimental horizontal transmission of *Salmonella* Enteritidis strains (phage types 4, 8, and 13a) in chicks. **Avian Dis.** v. 43, p. 774-778. 1998.

Geimba, M.P., Tondo, E.C. & Brandelli, A. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis isolated from foods involved in human foodborne outbreaks that occurred in the south of Brasil, 1999-2000. **J. Food Safety.** v.25, p. 173-182. 2005.

Gonçalves P.M.R., Franco R.M. & Zamborlini L.C. Enumeração de enterococos e coliformes fecais, pesquisa de *Salmonella* e indicação presuntiva de *Proteus*, em cortes e miúdos de frangos (*Gallus domesticus*) congelados. **Hig. Alim. São Paulo**, v.12, p.42-47. 1998.

Guimarães, A.G. , Leite, C.C. , Teixeira, L. D. S. , Sant'Anna, M. E. B. & Assis, P.N. Detecção de *Salmonella spp.* em alimentos e manipuladores envolvidos em um surto de infecção alimentar. **Rev. Bras. Saúde Prod. Animal.** v. 2, p. 1-4. 2001.

Gupta, V. An update on newer β -lactamases. **Indian J Med Res.** v.126, p. 417-427. 2007.

Hansson, K., L. Sundström, A. Pelletier y P. H. RoyIntI2 Integron Integrase in Tn7. **J. Bacteriol.** 184: 1712-21. . 2002.

Hasman, H., Mevius, D., Veldman, k., Olesen, I. & Aarestrup, F.M. β -lactamases among extended-spectrum β -lactamase (ESBL)- resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in the Netherlands. **J. Antimicrobiol. Chemother.** v.56, p.115-21. 2005

Hofer, E., Silva F^o, S.J. & Reis, E.M.F. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. **Pesq. Vet. Bras. Rio de Janeiro** v.17, p. 55-62. 1997.

Hofer, E., Silva F^o, S.J. & Reis, E.M.F. Sorovares de *Salmonella* isolados de matérias-primas e de ração para aves no Brasil. **Pesq. Vet. Bras. Rio de Janeiro** v.18, p.21-27. 1998.



Hoffmann F.L., Mansor, A. P., Coelho, A. R. & Vinturim, T. M. Microbiologia de carcaças e carnes mecanicamente separadas (CMS), obtidas em abatedouro de aves da Região de São José do Rio Preto, SP. **Hig. Alim. São Paulo**, v. 16, p.92-93. 2002.

Hoszowski, A & Wasyl, D. Epidemiological importance of feed, animal and food of animal origin as a source of *Salmonella* in Poland in 2004. 13 International Symposium *Salmonella* and Salmonellosis pg 405-406.10-12/05/2006 France

Humphrey, T.J. Contamination of egg shell and contents with *Salmonella* Enteritidis: a review, **Int. J. Food Microbiol.** 21, p. 31– 40. 2000

Khakhria, R., Woodward, W.M., Johnson, W.M. & Poppe, C. *Salmonella* isolated from humans, animals and other sources in Canada, 1983-92. **Epidemiol. Infect.** v. 119, p.15-23. 1997.

Laconcha, I.; López-Molina, N.; Rementeria, A. Phage typing combined with pulsed-field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA increases discrimination in the epidemiological analysis of *Salmonella enteritidis* strains. **Int. J. Food Microbiol.** v.40: 27-34, 1998.

Liebana, E.; Garcia–Migura, L.; Clouting, C.; Clifton–Hadley, F.A.; Lindsay, E.; Threlfall, E.J.; McDowell, S.W.; Davies, R.H. Multiple genetic typing of *Salmonella* enterica serotype typhimurium isolates of different phage types (DT104, U302, DT204b, and DT49) from animals and humans in England, Wales, and Northern Ireland. **J. Clin. Microbiol.**v.40, n.12, p. 4450–4456. 2002.

Larkin, C.; Poppe, C.; McNab, B.; McEwen, B.; Mahdi, A. & Odumeru, J. Antibiotic resistance of *Salmonella* isolated from hog, beef, and chicken carcass samples from provincially inspected abattoirs in Ontario. **J Food Prot.** v.67, p.448-55. 2004.

Lax, A.J., Barrow, P.A., Jones, P.W. & Wallis. T.S. Current perspectives in salmonellosis. Review. **Br. Vet. J.** v.151, p. 351 – 377. 1995

Lázaro, N. S., Tibana, A., Reis, E.M.F., Rodrigues, D. P., Quintaes, B R ; Hofer, E. Antimicrobial resistance and R-plasmid in *Salmonella* spp. from swine and abattoir environments.. **Pesq. Vet. Bras. Rio de Janeiro.** v. 24, p. 57-60, 2004a.

Lázaro, N. S., Tibana, A., Reis, E.M.F., Rodrigues, D. P., Quintaes, B R ; Hofer, E. Padrão de suscetibilidade a antimicrobianos e perfil plasmidial em *Salmonella* Muenster isoladas de suínos e do ambiente de abatedouros. **Pesq. Vet. Bras., Rio de Janeiro.** v. 24, p. 65-70, 2004b.

Lázaro, N. S., Tibana, A., Reis, E.M.F, Vianni, M.C.E. & Hofer, E. Resistência a antimicrobianos em sorovares de *Salmonella* isolados de suínos abatidos no Estado do Rio de Janeiro. **Pesq. Vet. Bras, Rio de Janeiro.** v. 25, p. 14-18, 2003.

Le Minor,L., Popoff, M.Y., Laurent, B. & Hermant, D. **Ann. Inst. Pasteur/ Microbiol.**137 B, p. 211-217. 1986.

Letellier, A., Arsenauld, J., Quessy, S. & Boulianne, M. Prevalence and risk factors for *Salmonella* spp. Carcass contamination in broiler chicken and turkey flocks slaughtered in Quebec, Canada. 13 International Symposium *Salmonella* and Salmonellosis pg 429-431.10-12/05/2006 France

Libby, S.J., Lesnick, M., Hasegawa, P., Weidenhammer, E. & Guiney, D.G. The *Salmonella* virulence plasmid spv genes are required for cytopathology in human monocyte-derived macrophages. **Cell. Microbiol.** v. 2, p.49-58. 2000.



- Logue, C.M.; Sherwood, J.S.; Olah, P.A.; Elijah, L.M. & Dockter, M.R. The incidence of antimicrobial-resistant *Salmonella* spp. on freshly processed poultry from US Midwestern processing plants. **J. Appl. Microbiol.** v.94, p.16–24. 2003.
- López, H.S. & Olvera, L.G. Problemática del uso de enrofloxacin en la aviculture en México. Artículo de Revisión. **Vet. Méx.** v.31, p.137-145. 2000.
- Machado R. A., Tosin, I. & Leitão M. F. F.. Occurrence of *Salmonella* sp and *Campylobacter* sp in chickens during industrial processing. **Rev. Microbiol. São Paulo.** v.4, p.239-244. 1994.
- Mansuy, J.M. & Schlegel, L. Salmonellosis in Martinique: results of a twenty-five years survey. In: *Salmonella* and Salmonellosis Proceedings. *Zoopôle. Ploufragan.* v. 20/22, p.583-586. 1997.
- Marimón, J.M.; Gomáriz, M.; Zigorraga, C. Resing prevalence of quinolone resistance in human nontyphoid *Salmonella enterica* isolates obtained in Spain from 1981 to 2003. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.48, p.2789-3793, 2004.
- Martin, L, Poppe, C., Weir, E., Boerlin, P, Muckle, A. Occurrence and characterization of extended spectrum cephalosporin resistance in *Salmonella* during 1999-2004. . ASM Conference. 9-13/9/06. Victoria, CN A-70 pg 73, 2006
- Matheus, D.P.; Rudge, A.C.& Gomes, S.M.M - Ocorrência de *Salmonella* spp em carne de frango comercializada em Bauru, SP, Brasil. **Rev. Inst. Adolfo Lutz,** v.62, p. 111 - 115, 2003.
- Mazel, D. Integrons: Agents of bacterial evolution. **Nat. Rev. Microbiol.** v.4, p.608–620. 2006.
- McDermott, P. F., Walker, R. D. & White, D. G. Antimicrobials: modes of action and mechanisms of resistance. **Int. J. Toxicol.** v.22, p.135-143. 2003
- Michael, G. B., P. Butaye, A. Cloeckaert y S. Schwarz. Genes and mutations conferring antimicrobial resistance in *Salmonella*: an update. **Microbes Infect.** v.8, p. 1898-914. 2006.
- Mikolajczyk, A. & Radkowski, M. *Salmonella* spp on chicken carcasses in processing plants in Poland. **J. Food Prot.** v. 65, p. 1475-1479. 2002.
- Molbak, K., Baggesen, D. L., Aarestrup, F. M., Ebbesen, J. M., Engberg, J., Frydendahl, K., Gerner-Smidt, P., Petersen, A. M. & Wegener. H.C. An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. **N. Engl. J. Med.** v.341, p.1420-1425. 1999.
- Mulvey, M.R.; Boyd, D.A.; Baker, L.; Mykytczuk, O.; Reis, E.M.; Asensi, M.D.; Rodrigues, D.P. & NG, L.K. Characterization of a *Salmonella enterica* serovar Agona strain harbouring a class 1 integron containing novel OXA-type beta-lactamase (blaOXA-53) and 6'-N-aminoglycoside acetyltransferase genes [aac(6')-130]. **J. Antimicrob. Chemother.** v.54, p.354-359. 2004.
- Mulvey MR, Soule G, Boyd D et al. Characterization of the first extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella* isolate identified in Canada. **J Clin Microbiol.** v.41. p.460-462. 2003
- Murphy, T. M., McNamara, E., Hill, M., Rooney, N., Barry, J., Egan, J., O'Connell, A. , O'Loughlin, J. & McFaddyen, S. Epidemiological studies of human and animal *Salmonella typhimurium* DT104 and DT104b isolates in Ireland. **Epidemiol. Infect.** v.126, p.3-9. 2001.



- Nascimento V. P., Silva A.B., Salle C.T.P., Ribeiro A.R., Schuch D.M.T., Santos, L. R., Cardoso M.O., Rocha S. L.S. & Vieira J. S. 1996. Ocorrência de *Salmonella* sp em carcaças de frango industrialmente processadas. Anais da VI Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, p. 81. 1996.
- Neto, JP. Resíduos de antimicrobianos em alimentos. Revista Conselho Federal de Medicina Veterinária – Brasília/DF. Ano VII nº 22. 65 – 71. 2001
- Nishino K, Nikaido E, and Yamaguchi A. Regulation of multidrug efflux systems involved in multidrug and metal resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **J. Bacteriol.** v.189, p.9066–9075. 2007.
- Nunes, I.A.; Helmuth, R.; Schroeter, A.; Mead, G.G.; Santos, M.A.A.; Solari, C.A.; Silva, O.R.; Ferreira, A.J.P. Phage typing of *Salmonella enteritidis* form different sources in Brazil. **J. Food Prot.** v. 66, n 2, p. 324-327, 2003.
- O'Brien, T.F., Emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistance: how use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. **Clin. Infect. Dis.** v.34, p. S78-S84. 2002
- Oliveira, S.D., Rodenbusch, C.R., Michael,G.B., Cardoso, M.I.R., Canal, C.W. & Brandelli, A. Detection of virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolated from different sources. **Braz. J. Microbiol.** vol. 34, p 123-124. 2003
- OMS/Organización Mundial de la Salud. Control de la salmonelosis: importancia de la higiene veterinária y de los productos de origen animal. Série de Informes Técnicos n. 774. 1988.
- Peirano, G.; Agerso, Y. ; Aarestrup, F. M.; Reis, E. M. F.; Rodrigues, D. P.. Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brazil. **J. Antimicrobiol. Chemother.** v. 58, p. 305-309, 2006.
- Pereira, C.S., Medeiros, L.M., Costa, R.G., Festivo, M.L. Reis, E.M.F., Seki, L.M. Rodrigues, D.P. *Salmonella* Typhimurium phage types and multidrug resistance profiles isolated from different sources in Brazil from 1999 to 2004. **Braz. J. Microbiology.** v.38, p.385 - 390, 2007.
- Pezzella, C., A. Ricci, E. DiGiannatale, I. Luzzi y A. Carattoli. 2004. Tetracycline and streptomycin resistance genes, transposons, and plasmids in *Salmonella enterica* isolates from animals in Italy. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 48, p. 903-908.
- Popoff, M.Y. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. 8th edition. WHO Collaborative Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Paris, Institut Pasteur, 150 p. 2001.
- Poppe, C. *Salmonella* infections in the domestic fowl. In: Wray,C. & Wray, A. (eds). *Salmonella in Domestic Animals*. New York, NY: **CAB International**. pp. 107–132. 2000.
- Prat, S.; Fernández, A.; Fica, A. *et al.* - Tipificación fágica de aislados de *Salmonella* Enteritidis de muestras clínicas, alimentarias e avícolas en Chile. **Rev. panamer. Salud públ.** v.9, p. 7-12, 2001.
- Rabsch, W.; Tschape, H. & Baumler, A.J. Non-typhoid salmonellosis: emerging problems. **Microbes and Infection.** v. 3, p. 237-247. 2001
- Randall, L. P., S. W. Cooles, M. K. Osborn, L. J. Piddock y M. J. Woodward. Antibiotic resistance genes, integrons and multiple antibiotic resistance in thirty-five serotypes of *Salmonella enterica* isolated from humans and animals in the UK. **J. Antimicrobiol. Chemother.** v. 53, p. 208-216. 2004.



- Reis, E.M.F. Análise de marcadores epidemiológicos de *Salmonella* Enteritidis, oriundas de diferentes fontes de infecção e de regiões do país. Dissertação [Mestrado]. UFRRJ. 1994.
- Ribot, E.M.; Wierzba, R.K.; Angulo, F.J. & Barrett, T.J.. *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 isolated from humans, United States, 1985, 1990, and 1995. **Emerg. Infect. Dis.** v.8, p.387-391. 2002.
- Rodrigues, D.P., Alleyene, G.A.O., Rossi, A., Galas, M., Heitmann, I., Munoz, N., Campos, E., Zurita, J., Congo, L. G., Vásquez, S. F.. Resistencia antimicrobiana de aislados de *Salmonella*, *Shigella* y *Vibrio cholerae* en las Americas. Bulletin of the Panamerican Health Organization, Washington-DC-USA, v.163, Suplemento, 2000.
- Rodrigues, D. P. Bacterial Resistance to Antimicrobial Drugs. Surveillance and the example of national programs: Brazil. In: Antimicrobial resistance in the Americas: magnitude and containment of the problem. Ed. Roxane Salvatierra-González and Yehuda Benguigui. Washington DC. PAHO/HCP/HCT/163/2001. p. 184-192
- Rodrigues, D.P. Relatório Anual de Atividades do Laboratório de Referência Nacional Cólera & Enteroinfecções Bacterianas. CGLAB/DEVEP/SVS. 2003-2008.
- Rotger, R. & Casadesús, J. The virulence plasmids of *Salmonella*. **Intern. Microbiol.** v. 2, p. 177-184. 1999
- Sajid, S.U. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars Albany and Enteritidis isolates from Pakistan. *Salmonella: from pathogenesis to therapeutics*. ASM Conference. Victoria, CN 9-13, C-36 pg 55, 2006
- Salles M.A.F., Silva P.K.S., Fonseca V.R.S., Carneiro A.L., Branco F.R., Silva P.L.; Alves N. F., & Cunha A.P. Pesquisa de *Salmonella* sp através de provas de triagem rápida e convencional, em carcaças de frangos abatidos no município de Uberlândia, MG. **Hig. Alim. São Paulo**, v. 16, p. 36-40. 2002
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2 ed. New York. Cold Spring Harbor, 1989.
- Santos D.M.S., Berchieri JR A., Fernandes S.A., Tavechio A. T. & Amaral, L. A. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 20, p.39-42. 2000.
- Santos, L.R.; Nascimento, V.P.; Oliveira, S.D.; Rodrigues, D.P.; Reis, E.M.F.; Seki, L.M.; Ribeiro, A.R.; Fernandes, S.A. Phage types of *Salmonella* Enteritidis isolated from clinical and food samples, and from broiler carcasses in Southern Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**. v. 45, pp. 01-04. 2003
- Schroeter, A.; Hoog, B. & Helmuth, R. Resistance of *Salmonella* Isolates in Germany. **J. Vet. Med.** v.51, p.389-392. 2004.
- Schwarz, S. & Chaslus-Dancla, E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance, **Vet. Res.** v.32, p. 201-225. 2001.
- Seki, L.M. **Estudo** retrospectivo da resistência antimicrobiana em *Salmonella* isoladas de aves industrializadas em diferentes regiões do país. Dissertação [Mestrado]. UFRRJ. 2000.
- Silva J.A., Azeredo G.A, Barros C.M.R, Costa E.L. & Falcão M.S. Incidência de bactérias patogênicas em carne de frango refrigerada. **Hig. Alim. São Paulo**. v. 16, p.97- 101. 2002.



Silva, W.C.P.; Esposito, E. M; Reis, E.M.F.; Rodrigues, D.P.; Lázaro, N. S. *Salmonella* spp. em fígado e cortes de frangos comercializados em áreas do Município do Rio de Janeiro. **Hig. Alim. São Paulo.** v. 20, p. 124-131, 2006.

Tavechio, A. T.; Fernandes, S.S.; Neves, B.C.; Dias, A.M.G. & Irino, K Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.** v.38, p.315-322. 1996.

Tessari, E.N.C.; Cardoso, A.L.S.P; Castro, A.G.M.; Zanatta, G.F.; Kanashiro, A.M.I. Incidência de *Salmonella* spp. em pintos de corte recém-nascidos. **Arq. Inst. Biol. São Paulo.** v.70, p.279-281. 2003.

Threlfall, E. J., L. R. Ward y B. Rowe. Resistance to ciprofloxacin in non-typhoidal salmonellas from humans in England and Wales-the current situation. **Clin. Microbiol. Infect.** v. 5, p. 130-134. 1999.

Threlfall, E.J. Epidemic *Salmonella* typhimurium DT 104--a truly international multiresistant clone. **J Antimicrob Chemother.** v.46, p. 7-10. 2000

Threlfall, E.J.; Ward, L.R.; Skinner, J.A., et al. Antimicrobial drug resistance in non-typhoidal salmonellas from humans in England and Wales in 1999: decrease in multiple resistance in *Salmonella enterica* serotypes Typhimurium, Virchow, and Hadar. **Microb. Drug Resist.** v.6, p.319-325, 2002.

Tirolli, I.C.C. & Costa, C.A. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos recém abatidos em feiras e mercados da cidade de Manaus-AM. **Acta Amaz. Manaus.** v..36, p. 2006

Uyttendaele, M.; De Troy, P.; Debevere, J. Incidence of *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Listeria monocytogenes* in poultry carcasses and different types of poultry products for sale on the Belgian retail market. **J. Food Prot.** v.62, p.735-740. 1999.

Vahaboglu H, Fuzi M, Cetin S, Gundes S, Ujhelyi E, Coskuncan F, et al. Characterization of extended-spectrum β -lactamase (TEM-52)-producing strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium with diverse resistance phenotypes. **J Clin Microbiol.** v.39 p.791–793. 2001;

Varma, J.K.; Molbak, K.; Barrett, T.J.; Beebe, J.L.; Jones, T.F.; Rabatsky-Her, T.; Smith, K.E.; Vugia, D.J.; Chang, H.G. & Angulo, F.J. Antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella* is associated with excess bloodstream infections and hospitalizations. **J. Infect. Dis.** v.191, p.554-61. 2005.

Velge, P.; Cloeckeaert, A. & Barrow, P. Emergence of *Salmonella* epidemics: The problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. **Vet. Res.** v.36, p. 267-288. 2005,

WHO/ World Health Organization. Risks assessments of *Salmonella* in eggs and broiler chickens. Series n° 2, Geneva- Switzerland 328p. 2002.

WHO/World Health Organization. The medical impact of the use of antimicrobials in food animals. Report of a WHO Meeting. WHO/ECM/ZOO/97.4.

World Health Organization. 1st Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: Scientific assessment, Geneva, December 2003

World Health Organization. Drug-resistant Salmonella. Fact sheet N°139. Revised April 2005



Winokur, P. L., Brueggemann, A., De Salvo, D. L., Hoffmann, L., Apley, M. D., Uhlenhopp, E. K., Pfaller, M. A., Doern, G. V. Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC beta-lactamase. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.44, p.2777-2783. 2000.

Yan, J. J., W. C. Ko, C. H. Chiu, S. H. Tsai, H. M. Wu, and J. J. Wu. Emergence of ceftriaxone-resistant *Salmonella* isolates and rapid spread of plasmid-encoded cmy-2-like cephalosporinase, Taiwan. **Emerg. Infect. Dis.** v. 9, p.323–328. 2003.

Zhao, S., McDermott, P.F., Friedman, S., Abbott, J., Ayers, S., Glenn, A., Hall-Robinson, E., Hubert, S.K., Harbottle, H., Walker, R.D., Chiller, T.M. & White, D.G. Antimicrobial resistance and genetic relatedness among *Salmonella* from retail foods of animal origin: NARMS Retail Meat Surveillance. **Foodborne Path. Dis.** v. 3, p. 106-117. 2006.

Brasil – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Ofício Circular 19/98 de 16/11/98, Brasília, Brasil, 1998.

Brasil - Lista de aditivos autorizados uso na alimentação animal no Brasil. Departamento de Fomento e Fiscalização da Produção Animal/ Secretaria de Apoio Rural e Cooperativismo/Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – DFPA/SARC/MAPA. Atualizada em 17/12/2002.

Fracalanza, S. A. P., Scheidegger, E. M. D., Santos, P. F., Leite, P. C., Teixeira, L. M. 2007. Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102(7): 853-859.

Gomes, B. C., Esteves, C. T., Pallazzo, I. C., Darini, A. L., Felis, G. E., Sechi, L. A., Franco, B. D., De Martinis, E. C. 2008. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. Isolated from Brazilian foods. *Food Microbiol.* 25(5): 668-675.

Hayes, J. R., English, L. L.; Carter, P. J. Proescholdt, T., Lee, K. Y., Wagner, D. D., White, D. G. 2003. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Enterococcus* Species Isolated from Retail Meats. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(12): 7153-7160.

Leme, I. L., Ferreira, A. J. P., Bottino, J. A., Pignatari, A. C. C. 2000. Glyco-peptides susceptibility among enterococci isolated from a poultry farm in São Paulo, Brazil (1996/1997). *Braz. J. Microbiol.* 31(1): 53-57.

McGowan, L. L., Jackson, C. R., Barrett, J. B., Hiott, L. M., Fedorka-Cray, P. Prevalence and antimicrobial resistance of enterococci isolated from retail fruits, vegetables, and meats. 2006. *J. Food Prot.* 69(12): 2976-2982.

Miranda, J. M., Guarddon, M., Mondragon, A., Vázquez, B. I., Fente, C. A., Cepeda, A., Franco, C. M. 2007. Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. Strains isolated from organic chicken, conventional chicken and turkey meat: a comparative survey. *J. Food Prot.* 70(4): 1021-1024.

OLIVEIRA, J.S.; ZANINE, A.M.; SANTOS, E.M. Uso de aditivos na nutrição de ruminantes. *RedVet*, v.6, n.11, nov. 2005. Disponível em: <<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111105.html>> Acesso em: 25 jun. 2006

Pavia, M., Nobile, C. G., Salpietro, L., Angelillo, I. F. 2000. Vancomycin resistance and antibiotic susceptibility of enterococci in raw meat. *J. Food Prot.* 63(7): 912-915.




Rende-Fournier, R., Leclercq, R., Galimand, M., Duval, J., Courvalin, P. 1993. Identification of the satA gene encoding a streptogramin A acetyltransferase in *Enterococcus faecium* BM4145. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37(10): 2119-2125.

U.S. Food and Drug Administration (FDA). (1999). *Guidance for industry, consumer-directed broadcast advertisements*. U.S. Food and Drug Administration, U.S. Department of Health and Human Services. Retrieved August 2, 2003, from <http://www.fda.gov/cder>.

Xavier, D. B., Bernal, F. E. M., Titze-de Almeida, R. 2006. Absence of VanA- and VanB-containing enterococci in poultry raised on nonintensive production farms in Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(4): 3072-3073.



	PROCEDIMENTO OPERACIONAL			Data da Revisão:
	Número: POP - 001	Localizador: GICRA/GGALI	Revisão: 0	Data para revalidação:
Título: Colheita de carcaças congelada de frango				
Descrição da Revisão:			Palavra(s) chave: Salmonella – Frango - Rotulagem	
Elaborador: Gerência de Inspeção e Controle de Riscos de Alimentos Cargo: Técnicos			Aprovador: Ana Virgínia de Almeida Figueiredo Cargo: gerente de Inspeção e Controle de Riscos em Alimentos	

1. OBJETIVO

Determinar procedimentos para colheita de amostras de carcaças congeladas de frango destinadas ao Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango – Prebaf, e para a análise de resultados e intervenção.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este Procedimento Operacional Padrão estabelece os procedimentos a serem observados pelos órgãos de vigilância sanitária dos Estados envolvidos no PREBAF, para a colheita de amostras de carcaças congeladas de frango.

3. PROCEDIMENTOS

3.1 COLHEITA DE AMOSTRAS


3.1.1 Colher, no comércio local, duas amostras, de marcas distintas, compostas por 05 (cinco) unidades de frango inteiro congelado e sem tempero, por mês. A seleção das amostras deve ser baseada na disponibilidade das marcas no mercado, priorizando os produtos processados em frigoríficos locais.

3.1.2 As cinco unidades da amostra devem apresentar as mesmas especificações quanto a marca, ao lote, data de fabricação e prazo de validade. As unidades de amostra não devem apresentar sinais de violação na embalagem primária.

3.1.3 Colher amostras com, no mínimo, 60 dias para expirar a validade. Deve ser dispensada a colheita da amostra sempre que o produto estiver visivelmente adulterado ou deteriorado, ou armazenado em temperatura inadequada.

3.1.4 Para cada amostra deve ser emitido um Termo de Colheita de Amostras (TCA) e



	PROCEDIMENTO OPERACIONAL			Data da Revisão:
	Número: POP - 001	Localizador: GICRA/GGALI	Revisão: 0	Data para revalidação:
Título: Colheita de carcaças congelada de frango				
Descrição da Revisão:			Palavra(s) chave: Salmonella – Frango - Rotulagem	
Elaborador: Gerência de Inspeção e Controle de Riscos de Alimentos Cargo: Técnicos			Aprovador: Ana Virgínia de Almeida Figueiredo Cargo: gerente de Inspeção e Controle de Riscos em Alimentos	

especificado o motivo de colheita (PREBAF) e a modalidade de análise (Orientação).

3.1.5 O TCA deve ser preenchido em letra legível, preferencialmente em letra de forma.

3.1.6 Enviar as amostras ao laboratório devidamente identificadas, contendo as seguintes informações:

A data, a hora da colheita, a temperatura do produto e/ou do equipamento; de exposição (gôndola, freezer) no momento da colheita, as condições da amostra no ponto de colheita e outros dados que possam auxiliar as atividades analíticas.

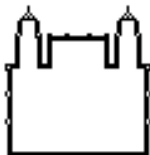
3.1.7 As amostras colhidas devem ser entregues no mesmo dia ao laboratório, devidamente lacradas, sendo mantidas em caixa isotérmica, com gelo reciclável durante o transporte.

As amostras devem permanecer congeladas desde a colheita até a entrega no laboratório.

3.1.8 Excepcionalmente, quando não for possível entregar as amostras ao laboratório no mesmo dia da colheita, as mesmas devem ser mantidas em freezer garantindo a sua integridade.

3.1.9 O prazo máximo de entrega das amostras (congeladas) ao laboratório não deve exceder a 72 horas após colheita, respeitando os dias previamente acordados no cronograma de amostragem entre o órgão de vigilância sanitária e o laboratório.





MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: RECEPÇÃO E PROCESSAMENTO INICIAL DE AMOSTRAS DE CARÇAÇAS CONGELADAS DE FRANGO E EMISSÃO DO LAUDO DE ANÁLISE			NÚMERO 65.3210.043	
PALAVRAS-CHAVE		REVISÃO	Seção do Manual	
TÉCNICA DE ENXAGUADURA - CARÇAÇAS DE FRANGO - LAUDOS		01	10	
ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	REFERENDADO	DATA
Carla de O. Rosas	Márcia B Warnken	Marise S. de Magalhães	Eduardo Chaves Leal	13/07/2004

SUMÁRIO

1. Objetivo
2. Campo de aplicação
3. Siglas
4. Condições Gerais
5. Condições Específicas
6. Bibliografia
7. Anexos
 - A. Meios de Cultura
 - B. Soluções e Reagentes

1. OBJETIVO

Este Procedimento Operacional Padronizado estabelece condições e procedimentos para a recepção, armazenamento processamento as mostras a serem submetidas à pesquisa e contagem de *Salmonella* sp e à pesquisa de *Enterococcus* sp. Este POP também padroniza os dados que devem constar nos laudos de análise e destinatário de encaminhamento.

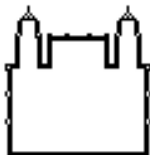
2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Este POP aplica-se ao PREBAF e visa uniformizar as metodologias de análise, bem como a elaboração de laudos a serem encaminhados aos órgãos de Vigilância Sanitária, pelos laboratórios participantes.

3. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

PREBAF – Programa Nacional de monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: RECEPÇÃO E PROCESSAMENTO INICIAL DE AMOSTRAS DE CARÇAÇAS CONGELADAS DE FRANGO E EMISSÃO DO LAUDO DE ANÁLISE

**NÚMERO
65.3210.043**

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC – American Type Culture Collection

IAL – Instituto Adolfo Lutz

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

4. CONDIÇÕES GERAIS

4.1 – Materiais e equipamentos

- a) balança com capacidade para 3000g e sensibilidade de 0,01g;
- b) bandejas inox
- c) bisturis
- d) bolsa plástica estéril com capacidade de 5 L;
- e) frasco erlenmeyer com capacidade de 5 L ou frasco similar;
- f) papel indicador de pH.

Nota:

Esterilizar os materiais em forno Pasteur a 180 °C durante 2 horas.

4.2 – Meios de cultura (ver Anexo A)

- a) água peptonada tamponada (APT)

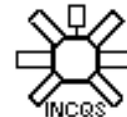
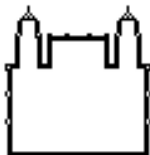
4.3 – Soluções e reagentes (ver Anexo B)

- a) ácido clorídrico 1N;
- b) álcool a 70%
- c) hidróxido de sódio 1N;
- d) triton x-100

5. CONDIÇÕES ESPECÍFICAS

Duas amostras de carcaças congeladas de frango sem tempero, compostas cada uma, por cinco unidades são coletadas mensalmente pela Vigilância Sanitária. As unidades de cada amostra devem pertencer à mesma marca comercial e apresentar a mesma data de embalagem e/ou prazo de validade do produto.

As amostras são acondicionadas, identificadas e enviadas ao laboratório de análise, sob refrigeração, no menor período de tempo possível.



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: RECEPÇÃO E PROCESSAMENTO INICIAL DE AMOSTRAS DE CARÇAÇAS CONGELADAS DE FRANGO E EMISSÃO DO LAUDO DE ANÁLISE

**NÚMERO
65.3210.043**

Cada Termo de Colheita de Amostras corresponde a cinco unidades do produto de uma única marca comercial, conforme descrito acima.

5.1 – Recepção e estocagem no laboratório

Observar o aspecto geral da amostra. Verificar se o produto não contém tempero, se todas as unidades apresentam a mesma data de embalagem e/ou prazo de validade do produto e se as mesmas estão congeladas.

Armazenar as unidades da amostra no laboratório, em freezer. Para iniciar as análises, proceder ao descongelamento das mesmas em refrigerador, na embalagem original, durante 18 horas.

5.3 – Enxaguadura da amostra

A etapa de enxaguadura da amostra é comum para os ensaios de pesquisa e contagem de *Salmonella* e também para pesquisa de *Enterococcus* sp.

Proceder a limpeza da superfície externa da embalagem utilizando gaze embebida em 70%. Abrir a embalagem com bisturi estéril. Desprezar os miúdos e transferir a carcaça para saco plástico estéril.

Pesar a amostra e adicionar, para cada 1 g do frango, 1 mL de APT. Fazer a enxaguadura, cuidadosamente e de maneira uniforme, em toda a superfície da carcaça.

Transferir o caldo de enxaguadura para erlenmeyer de 5L.

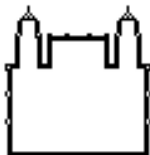
Deixar em repouso durante 60 minutos à temperatura ambiente. Verificar o pH do homogenato com papel indicador de pH. Se necessário, ajustar o pH para $6,8 \pm 0,2$ utilizando ácido clorídrico 1N e hidróxido de sódio 1N.

Após o ajuste do pH, proceder à sementeira dos meios para enterococos a partir do caldo de enxaguadura.

Para os ensaios de *Salmonella* sp, acrescentar ao caldo de enxaguadura, Triton X – 100 (submetido a vapor fluente durante 15 minutos). A utilização desse surfactante deve ser limitada à menor quantidade suficiente para iniciar a formação de espuma.

Nota:

Cada 1 mL do caldo de enxaguadura corresponde a 1g da amostra.



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: RECEPÇÃO E PROCESSAMENTO INICIAL DE AMOSTRAS DE CARÇAÇAS CONGELADAS DE FRANGO E EMISSÃO DO LAUDO DE ANÁLISE

**NÚMERO
65.3210.043**

Proceder à pesquisa de *Salmonella* sp (POP INCQS n° 65.3210.044) e à pesquisa de *Enterococcus* sp (POP IAL) nas 5 unidades da amostra. Realizar a contagem de *Salmonella* sp (POP INCQS n° 65.3210.044) em apenas uma unidade da amostra.

5.4 – Análise de Rotulagem

Proceder à análise de rotulagem segundo a Resolução RDC ANVISA n° 13 de 02/01/2001, que estabelece a obrigatoriedade para os produtores de carnes de aves e seus miúdos crus, resfriados ou congelados, de incluir na rotulagem destes produtos as instruções de uso, preparo e conservação dos mesmos.

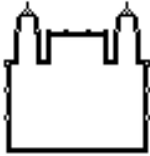
5.5 – Laudo de análise

5.5.1 – Elaborar o “Laudo de Análise” com as informações listadas abaixo.

a) informações sobre a amostra:

- Número de Cadastro da Amostra no Laboratório;
- Modalidade de Análise: Orientação;
- Programa;
- Nome do Produto: Carcaça Congelada de Frango;
- Quantidade Recebida;
- Data de Fabricação;
- Data de Validade;
- Número do Lote;
- Termo de Apreensão;
- Motivo da Apreensão: Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango – PREBAF;
- Registro;
- Fabricante;
- Logradouro;
- País;
- Local de Coleta;
- Requerente;
- Pessoa de Contato;
- Documento;
- Data de Entrada;
- Descrição da Amostra.





MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: RECEPÇÃO E PROCESSAMENTO INICIAL DE AMOSTRAS DE CARCAÇAS CONGELADAS DE FRANGO E EMISSÃO DO LAUDO DE ANÁLISE

**NÚMERO
65.3210.043**

b) Resultado da análise

Nome do Ensaio: **Análise de Rotulagem:**

Referência: Resolução RDC n.º 13 de 02/01/2001-ANVISA

Resultado: Satisfatório/Insatisfatório

Nome do Ensaio: **Pesquisa de Salmonella**

Referência : POP INCQS nº 65.3210.044

Resultado: Presente/Ausente

Unidade da Amostra A _____

Unidade da Amostra B _____

Unidade da Amostra C _____

Unidade da Amostra D _____

Unidade da Amostra E _____

Nome do Ensaio: **Contagem de Salmonella sp**

Referência: POP INCQS nº 65.3210.044

Unidade da amostra _____

Resultado _____ (NMP) LIC = _____ ; LSC = _____

Nome do Ensaio: **Pesquisa de Enterococcus sp**

Referência: POP IAL – Detecção de Enterococos em Carcaças congeladas de Frango Meio com vancomicina:

Resultado: Presente/Ausente

Unidade da Amostra A _____

Unidade da Amostra B _____

Unidade da Amostra C _____

Unidade da Amostra D _____

Unidade da Amostra E _____

Meio sem Vancomicina:

Resultado: Presente/Ausente

Unidade da Amostra A _____

Unidade da Amostra B _____

Unidade da Amostra C _____

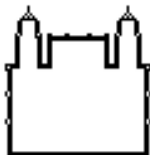
Unidade da Amostra D _____

Unidade da Amostra E _____

5.5.2 – No final do laudo de análise deve constar a seguinte mensagem padrão:

“Este laudo não pode ser utilizado em publicidade, propaganda ou para fins comerciais. Os resultados deste laudo referem-se única e exclusivamente à amostra encaminhada pelo solicitante.”





MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: RECEPÇÃO E PROCESSAMENTO INICIAL DE AMOSTRAS DE CARÇAÇAS CONGELADAS DE FRANGO E EMISSÃO DO LAUDO DE ANÁLISE	NÚMERO 65.3210.043
--	---------------------------

5.5.3 Os Laudos de Análise devem ser encaminhados à VISA responsável pela colheita da amostra.

6. BIBLIOGRAFIA

ANDREWS, Wallace H. & June, Geraldine A. Food Sampling and Preparation of Sample. Homogenate. In: **BACTERIOLOGICAL Analytical Manual Online. [S.l.]**; FDA, 2003. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-1.html>>. Acesso em 12 Jul 2004.

DETECÇÃO de Enterococos em Carcaças Congeladas de Frango. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz.

ISO – 6579:1993. Microbiology – General guidance on methods for the detection of Salmonella.

MESSER, Russel S.; Midura, Thaddeus F.; Peeler, James T. Sampling plans, sample collection, shipment and preparation for analysis. In: COMPENDIUM of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4 ed. Washington, D.C: American Public Health Association (APHA), 2001. cap.2, p. 13-23.

PESQUISA e Contagem de *Salmonella* sp em Carcaças Congeladas de Frango. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 10 (65.3210.044).

Brasil. Resolução RDC nº 13 de 2 de janeiro de 2001 – Aprova o regulamento técnico para instruções de uso, preparo e conservação na rotulagem de carnes de aves e seus miúdos crus, resfriados ou congelados e seu anexo. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília.**



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: RECEPÇÃO E PROCESSAMENTO INICIAL DE AMOSTRAS DE CARÇAÇAS CONGELADAS DE FRANGO E EMISSÃO DO LAUDO DE ANÁLISE

**NÚMERO
65.3210.043**

ANEXO A

MEIOS DE CULTURA

A.1 – Água peptonada tamponada

Peptona -----	10 g
Cloreto de sódio -----	5g
Fosfato de sódio dibásico -----	3,5 g
Fosfato de potássio monobásico -----	1,5 g
Água destilada -----	1000 mL

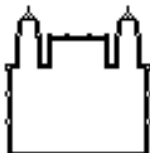
Suspender e dissolver os componentes em água destilada. Distribuir alíquotas de 3000 mL em frascos Erlenmeyers de 5 L ou frasco similar. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.
pH final: $7,2 \pm 0,2$ a 25°C.

Nota:

O meio pronto deve ser estocado a temperatura de 15 a 30°C.

Para o preparo a partir do meio desidratado, obedecer às recomendações do fabricante.





MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: RECEPÇÃO E PROCESSAMENTO INICIAL DE AMOSTRAS DE CARCAÇAS CONGELADAS DE FRANGO E EMISSÃO DO LAUDO DE ANÁLISE

**NÚMERO
65.3210.043**

ANEXO B

SOLUÇÕES E REAGENTES

B.1 – Ácido clorídrico 1N

Ácido clorídrico concentrado -----89 mL
Água destilada q.s.p. -----1000 mL

Esterilizar em autoclave a 121° C durante 15 minutos.

Nota: Estocar a temperatura ambiente.

B.2 – Hidróxido de sódio 1N

Hidróxido de Sódio ----- 40 g
Água destilada q.s.p. -----1000 mL

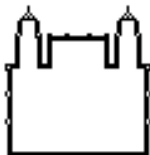
Esterilizar em autoclave a 121° C durante 15 minutos.

Nota: Estocar a temperatura ambiente.

B.3 – Triton X-100

Transferir um volume de aproximadamente 50mL de Triton X-100 para frasco escuro de 250mL ou frasco similar. Esterilizar sob vapor fluente por 15 minutos.

Nota: Estocar a temperatura ambiente.



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: PESQUISA E CONTAGEM DE <i>Salmonella</i> SP EM CARCAÇAS CONGELADAS DE FRANGO				NÚMERO 65.3210.044	
PALAVRAS-CHAVE SALMONELLA SP - ALIMENTOS - CARCAÇAS DE FRANGO			REVISÃO 00	Seção do Manual 10	
ELABORADO Carla de O. Rosas	VERIFICADO Márcia B Warnken	APROVADO Marise S. de Magalhães	REFERENDADO André L. Gemal	DATA 20/10/2003	

SUMÁRIO

1. Objetivo
2. Campo de aplicação
3. Siglas
4. Condições Gerais
5. Condições Específicas
6. Bibliografia
7. Anexos
 - A. Meios de Cultura
 - B. Soluções e Reagentes
 - C. Tabela NMP
 - D. Ficha de Controle dos Ensaio de *Salmonella* sp.

1. OBJETIVO

Este Procedimento Operacional Padronizado (POP) estabelece as condições e procedimentos para pesquisa e contagem de *Salmonella* sp em carcaças de frango sem tempero.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

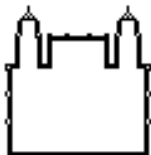
Este POP aplica-se ao Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da ANVISA e visa uniformizar as metodologias de análise para os laboratórios participantes.

3. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC - American Type Culture Collection



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: PESQUISA E CONTAGEM DE *Salmonella* SP EM CARÇAÇAS CONGELADAS DE FRANGO

NÚMERO
65.3210.044

INCQS - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

4. CONDIÇÕES GERAIS

4.1 – Materiais e equipamentos

- a) agitador de tubos;
- b) alça e agulha de platina ou níquel-cromo número 25 (diâmetro de 3 mm);
- c) banho termostático a $42 \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- d) frascos erlenmeyers com capacidade de 250 mL; 500 mL e 1000 mL;
- e) estufa bacteriológica a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$;
- f) lâminas de vidro;
- g) palitos de madeira;
- h) pipetas graduadas de 1, 5 e 10 mL;
- i) placas de Petri;
- j) tubos de ensaio 13 x 100 mm;
- k) tubos de ensaio 16 x 160 mm.

Nota:

Esterilizar o material em forno Pasteur a 180°C durante 2 horas.

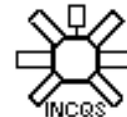
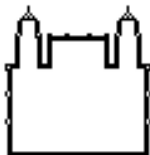
4.2 – Meios de cultura (ver Anexo A)

- a) ágar entérico Hektoen;
- b) ágar lisina ferro;
- c) ágar nutriente;
- d) ágar trílice açúcar ferro;
- e) ágar xilose lisina desoxicolato;
- f) água peptonada tamponada (APT);
- g) caldo tetrionato;
- h) caldo uréia;
- i) meio Rappaport – Vassiliadis.

4.3 – Soluções e reagentes (ver Anexo B)

- a) Antissoro polivalente para *Salmonella* sp;
- b) solução de iodo-iodeto de potássio;
- c) solução de verde brilhante a 0,1%;
- d) solução salina 0,85%;
- e) tampão fosfato de Butterfield.

4.4 – Microrganismos de referência



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: PESQUISA E CONTAGEM DE *Salmonella* SP EM CARCAÇAS CONGELADAS DE FRANGO

NÚMERO
65.3210.044

- a) *Samonella* Typhimurium - INCQS 150 (ATCC 14028);
- b) *Escherichia coli* - INCQS 033 (ATCC 25922);
- c) *Proteus vulgaris* - INCQS 106 (ATCC 13315).

Para a utilização das culturas de microrganismos de referência seguir as especificações do POP (65.3210.041) – “Utilização de Bactérias de Referência da Coleção de Culturas do INCQS no Controle Microbiológico de Alimentos” - INCQS/FIOCRUZ.

5. CONDIÇÕES ESPECÍFICAS

Para os ensaios de pesquisa e contagem de *Salmonella* sp utilizar o caldo de enxaguadura obtido a partir da metodologia descrita no POP (65.3210.043) – “Recepção e Processamento Inicial de Amostras de Carcaças Congeladas de Frango” – INCQS/FIOCRUZ.

5.1 – Pré-enriquecimento

5.1.1 – Pesquisa de *Salmonella* sp (Ensaio qualitativo)

Transferir 25 mL do caldo de enxaguadura (volume correspondente a 25 g da amostra) para frasco erlenmeyer contendo 225 mL de APT. Agitar com movimentos circulares, cuidadosamente. Incubar a 35°C ± 2°C durante 18 a 24 horas.

5.1.2 – Determinação do Número Mais Provável de *Salmonella* sp (Ensaio qualitativo)

Preparar a diluição 10⁻¹ transferindo 50 mL do caldo de enxaguadura para frasco erlenmeyer contendo 450 mL de tampão de Butterfield (diluição 10⁻¹).

A partir da diluição 10⁻¹ preparar diluições decimais seriadas, acrescentando 10 mL da em frasco contendo 90 mL de tampão de Butterfield.

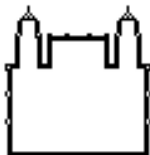
Preparar 5 séries de diluições com 3 tubos cada (correspondendo de 10 g a 0,001 g do alimento), como descrito abaixo:

- 1ª série (10 g) – Distribuir alíquotas de 10 mL do caldo de enxaguadura em 3 tubos de ensaio vazios e estéreis;
- 2ª série (1 g) – Distribuir alíquotas de 1 mL do caldo de enxaguadura em 3 tubos contendo 10 mL de APT;
- 3ª série (0,1 g) - Distribuir alíquotas de 1 mL da diluição 10⁻¹ em 3 tubos contendo 10 mL de APT;
- 4ª série (0,01 g) - Distribuir alíquotas de 1 mL da diluição 10⁻² em 3 tubos contendo 10 mL de APT;
- 5ª série (0,001 g) – Distribuir alíquotas de 1 mL da diluição 10⁻³ em 3 tubos contendo 10 mL de APT.

Notas:

- a) em cada série de tubos identificar as diluições e classificar os tubos como A, B e C;
- b) incubar os tubos a 35°C ± 2°C durante 18 a 24 horas.

5.2 – Enriquecimento seletivo



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: PESQUISA E CONTAGEM DE *Salmonella* SP EM CARCAÇAS CONGELADAS DE FRANGO

NÚMERO
65.3210.044

Para o ensaio quantitativo, selecionar apenas os tubos que apresentarem turvação para proceder à etapa de enriquecimento seletivo.

A partir da etapa de enriquecimento seletivo aplicar o procedimento descrito abaixo tanto para a metodologia de pesquisa (ensaio qualitativo), quanto para a determinação do Número Mais Provável (ensaio quantitativo) de *Salmonella* sp.

Semear os meios de enriquecimento seletivo a partir da APT.

- a) transferir 0,1 mL do caldo de pré-enriquecimento, previamente homogeneizado por movimentos circulares, para tubos contendo 10 mL de meio Rappaport - Vassiliadis;
- b) transferir 1 mL do caldo de pré-enriquecimento, previamente homogeneizado por movimentos circulares, para tubos contendo 10 mL de caldo tetratonato;

Nota:

No momento da utilização do caldo tetratonato acrescentar 0,1 mL de solução de verde brilhante a 0,1% e 0,2 mL de solução iodo – iodeto de potássio (Anexo B). Homogeneizar utilizando agitador de tubos. Incubar os tubos em banho termostático a $42 \pm 1^\circ \text{C}$, durante 18 a 24 horas.

5.3 – Isolamento

Semear, por esgotamento, uma alçada de cada uma das culturas de enriquecimento seletivo, previamente homogeneizadas em agitador de tubos, para a superfície dos seguintes meios seletivo-indicadores: ágar entérico Hektoen e ágar xilose lisina desoxicolato.

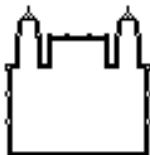
Incubar as placas em posição invertida a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ \text{C}$, durante 18 a 24 horas.

5.3.1 – Controle dos meios seletivo-indicadores

Semear, por esgotamento, as cepas controle de *Salmonella* Typhimurium e *E. coli* (item 4.4) em placas contendo ágar entérico Hektoen e ágar xilose lisina desoxicolato

Incubar a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ \text{C}$, durante 18 a 24 horas.

Observar o crescimento dos microrganismos de referência nas placas de meios que devem apresentar as características descritas a seguir:



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: PESQUISA E CONTAGEM DE *Salmonella* SP EM CARCAÇAS CONGELADAS DE FRANGO

NÚMERO
65.3210.044

	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>Escherichia coli</i>
Ágar Hektoen	Colônias negras ou verde-azuladas com centro negro	Colônias vermelhas ou salmão, com halo de precipitação
Ágar XLD	Colônias negras ou transparentes, da cor do meio, com centro negro	Colônias amarelas, opacas, com halo de precipitação

5.4 – Seleção das colônias

Observar as placas de cada meio seletivo que contenham colônias típicas de *Salmonella* sp. Selecionar de duas a cinco colônias e semear em tubo contendo ágar nutriente.
Incubar a 35 °C ± 2 °C, durante 18 a 24 horas.

5.5 – Triagem Bioquímica

5.5.1 – Semeadura de colônias suspeitas de *Salmonella* sp em ágar TSI e ágar LIA.

Com o auxílio de uma agulha bacteriológica tocar o crescimento do ágar nutriente . Perfurar a base do ágar TSI em profundidade e realizar movimentos de estrias na superfície. Sem flambar a agulha, perfurar a base do ágar LIA em dois diferentes pontos e, em seguida, deslizar a agulha pelo centro da superfície do ágar.

Incubar a 35 °C ± 2 °C, durante 18 a 24 horas.

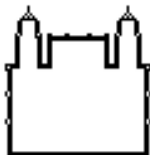
5.5.1.1 – Controle dos meios TSI e LIA

Proceder à semeadura dos microrganismos de referência: *Salmonella* Typhimurium e *E. coli* (item 4.4), em ágar TSI e ágar LIA.

Incubar a 35 °C ± 2 °C, durante 18 a 24 horas.

Observar o comportamento bioquímico das cepas de referência, que apresentar as características descritas a seguir:

	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>Escherichia coli</i>
Ágar TSI	Superfície alcalina (vermelha) e base ácida (amarela) com H ₂ S	Superfície ácida e base ácida (amarelo)
Ágar LIA	Superfície alcalina e base alcalina (violeta) com H ₂ S	Superfície alcalina (violeta) e base ácida (amarela)



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: PESQUISA E CONTAGEM DE *Salmonella* SP EM CARÇAÇAS CONGELADAS DE FRANGO

NÚMERO
65.3210.044

5.5.1.2 – Leitura dos meios TSI e LIA

Selecionar as culturas com comportamento bioquímico característico de *Salmonella* sp. Como descrito acima.

5.5.2 – Semeadura das culturas suspeitas de *Salmonella* sp. em caldo uréia. Semear o crescimento, a partir do ágar TSI em caldo uréia.

Incubar a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 18 a 24 horas.

5.5.2.1 – Controle do caldo uréia

Utilizar como controle as cepas de *Salmonella Typhimurium* e *P. Vulgaris* (item 4.4).

Incubar a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 18 a 24 horas, juntamente com o tubo contendo o meio não semeado, para controle negativo.

	<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
Caldo uréia	Urease negativa: não ocorre mudança na coloração do meio	Urease positiva: coloração do meio é iterada para rosa intenso

5.5.2.2 – Leitura da prova da urease

Selecionar as culturas com comportamento bioquímico característico de *Salmonella* sp. como descrito acima.

5.6 – Sorologia Polivalente

Submeter as culturas suspeitas de *Salmonella* sp. a soroaglutinação em lâmina. Utilizar cepa de referência de *Salmonella Typhimurium* (item 4.4), como controle.

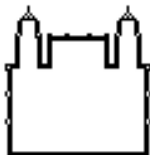
Semear a cultura suspeita em ágar nutriente inclinado, a partir do ágar TSI.

Incubar a $35\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 18 a 24 horas.

Adicionar 1,5 mL de salina 0,85% à cultura de ágar nutriente e suspender o crescimento. A suspensão bacteriana deve ser homogênea, sem grumos e deve apresentar uma turvação que se enquadre entre os tubos 2 e 3 da escala de McFarland.

Na extremidade de uma lâmina limpa e desengordurada com álcool, depositar uma gota da suspensão e uma gota de salina 0,85%. Homogeneizar utilizando palito de madeira.

As culturas que apresentarem aglutinação com salina devem ser classificadas como auto-aglutináveis.



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: PESQUISA E CONTAGEM DE *Salmonella* SP EM CARCAÇAS CONGELADAS DE FRANGO

NÚMERO
65.3210.044

Prosseguir o ensaio somente com as culturas que não aglutinarem com salina.

Na outra extremidade da lâmina adicionar uma gota da suspensão bacteriana e uma gota do antissoro polivalente. Misturar com palito de madeira estéril. Inclinar a lâmina com movimentos leves e circulares, continuamente por 1 minuto.

A formação de grumos na mistura que contém o antissoro polivalente caracteriza o resultado como positivo. Classificar a cultura como *Salmonella* sp.

5.7 – Preparo e envio dos isolados para o Laboratório de Referência
As culturas classificadas como *Salmonella* sp devem ser enviadas ao Laboratório de Enterobactérias/IOC/FIOCRUZ para caracterização antigênica.

Enviar ao Laboratório de Referência somente os isolados obtidos a partir do ensaio qualitativo. Seguir os procedimentos descritos no POP LABENT/IOC - FIOCRUZ:
“Encaminhamento das cepas de *Salmonella* spp, para caracterização antigênica e avaliação da suscetibilidade antimicrobiana“

5.8 – Expressão dos Resultados

5.8.1 – Pesquisa de *Salmonella* sp (ensaio qualitativo)
Expressar o resultado como presença ou ausência de *Salmonella* sp em 25g da amostra.

5.8.2 – Determinação do NMP de *Salmonella* sp (ensaio quantitativo)

Avaliar os tubos positivos de cada série. Fazer a leitura final considerando as três últimas iluições que apresentarem *Salmonella* sp. Proceder à leitura do resultado utilizando as tabelas de NMP (Anexo C).

5.9 – Preenchimento e envio da “Ficha de Controle dos Ensaio de *Salmonella* sp

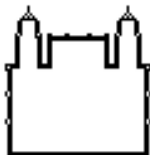
Ao término das análises, preencher na “Ficha de Controle dos Ensaio de *Salmonella* sp“ (Anexo D) e enviá-la à Coordenação do Programa Nacional da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango.

6. BIBLIOGRAFIA

ANDREWS, W. H. And HAMMACK, T.S. *Salmonella*. In: BACTERIOLOGICAL Analytical Arlington: AOAC/FDA, cap. 5, p. 5.01 – 20; Updated: October 2001 (www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html).

ENCAMINHAMENTO das Cepas de *Salmonella* spp. spp, para Caracterização Antigênica e Avaliação da Suscetibilidade Antimicrobiana. Rio de Janeiro: LABENT/IOC – FIOCRUZ.

FLOWERS, Russel S. *et. al.* *Salmonella*. In: COMPENDIUM of methods for the microbiological examination of food. 3 ed. Washington, D.C: American Public Health Association (APHA), 1992. 1219p. cap. 25, p. 371-



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: PESQUISA E CONTAGEM DE *Salmonella* SP EM CARÇAÇAS
CONGELADAS DE FRANGO

NÚMERO
65.3210.044

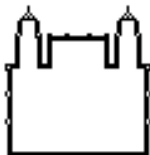
422.

RECEPÇÃO e Processamento Inicial de Amostras de Carcaças Congeladas de Frango. In :
MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 10. (65.3210.043).

Robert Blodgett. Most Probable Number from Serial Dilutions. In: BACTERIOLOGICAL Analytical Manual. 8
ed. – Revision A, 1998. Arlington: AOAC/FDA, Appendix 2, p. App 2.01 – 2.12; Updated: January 2001.
(www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-5.html).

UTILIZAÇÃO de Bactérias de Referência da Coleção de Culturas do INCQS no Controle Microbiológico de
Alimentos. In : MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 10. (65.3210.041).

/ANEXO A



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: PESQUISA E CONTAGEM DE *Salmonella* SP EM CARÇAÇAS CONGELADAS DE FRANGO

NÚMERO
65.3210.044

ANEXO A

MEIOS DE CULTURA

O anexo A apresenta as formulações dos meios de cultura a serem utilizados neste POP. Para o preparo a partir dos meios desidratados, obedecer às recomendações dos fabricantes.

A.1 – Ágar entérico Hektoen

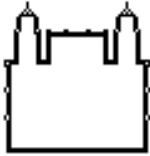
Peptona-----	12g
Sais de bile-----	3g
Extrato de levedura-----	9g
Lactose-----	12g
Sacarose-----	12g
Salicina-----	2g
Cloreto de sódio-----	5g
Tiosulfato de sódio-----	5g
Citrato férrico amoniacal-----	1,5g
Azul de bromotimol-----	0,065g
Fucsina ácida-----	0,1g
Ágar-----	14g
Água destilada-----	1000mL

Dissolver os ingredientes em banho termostático com frequente agitação. Evitar que o meio ferva por mais de 1 minuto. Não autoclavar Distribuir alíquotas de aproximadamente 20 mL em placas de Petri estéreis. pH final $7,5 \pm 0,2$ a 25°C.

A.2 -Ágar Lisina Ferro

Peptona-----	5,0g
Extrato de levedura-----	3,0g
Glicose-----	1,0g
L-Lisina-----	10,0g
L-arginina-----	10g
Citrato férrico amoniacal-----	0,5g
Tiosulfato de sódio-----	0,04g
Púrpura de bromocresol-----	0,02g
Ágar-----	15,0g
Água destilada-----	1000 mL

/ANEXO A – Cont.
ANEXO A – Cont.



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: PESQUISA E CONTAGEM DE *Salmonella* SP EM CARCAÇAS CONGELADAS DE FRANGO

NÚMERO
65.3210.044

Dissolver os ingredientes em banho termostático com frequente agitação. Distribuir alíquotas de 5 mL em tubos 13X100 mm. Esterilizar a 121 °C / 15 min. Inclinando os tubos de maneira a se obter uma base de 4 cm e uma inclinação de 2,5 cm.

pH final 6,8 ± 0,2 a 25°C.

A.3 – Ágar nutriente

Peptona -----5 g
Extrato de carne -----3 g
Ágar -----15 g
Água destilada -----1000 mL

Suspender os componentes em água destilada e dissolver em banho termostático até a dissolução do ágar. Distribuir alíquotas de 3 mL em tubos 13 x 100 mm.

Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos e deixar o ágar solidificar em posição inclinada.
pH final: 6,8 ± 0,2 a 25°C.

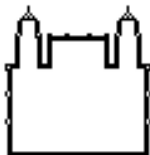
A.4 – Agar três açúcares e ferro (TSI)

Extrato de carne ----- 3 g
Extrato de levedura ----- 3 g
Peptona de caseína ----- 15 g
Peptona de carne ----- 5 g
Lactose ----- 10 g
Sacarose ----- 10 g
Glicose ----- 1 g
Sulfato ferroso----- 0,2 g
Cloreto de sódio ----- 5 g
Tiosulfato de sódio ----- 0,3 g
Vermelho de fenol ----- 0,024 g
Ágar ----- 12 g
Água destilada ----- 1000 mL

Suspender os componentes em água destilada e dissolver por aquecimento até a total dissolução do ágar. Distribuir 3 mL em tubos 13 x 100 mm. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos. Inclinando os tubos de maneira a se obter uma base de 2 a 3 cm e uma inclinação de 4 a 5 cm.
pH final: 7,4 ± 0,2 a 25°C.

/ANEXO A – Cont.





MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: PESQUISA E CONTAGEM DE *Salmonella* SP EM CARCAÇAS CONGELADAS DE FRANGO

NÚMERO
65.3210.044

ANEXO A – Cont.

A.5 – Agar xilose lisina desoxicolato

Extrato de levedura -----	3 g
L-lisina -----	5 g
Xilose -----	3,75 g
Lactose -----	7,5 g
Sacarose -----	7,5 g
Desoxicolato de sódio -----	2,5 g
Citrato férrico amoniacal -----	0,8 g
Cloreto de sódio -----	5 g
Tiosulfato de sódio -----	6,8 g
Vermelho de fenol -----	0,08 g
Ágar -----	15 g
Água destilada -----	1000 mL

Suspender os componentes em água destilada e dissolver por aquecimento com agitação até a ebulição. Evitar o aquecimento excessivo. Não autoclavar. Distribuir alíquotas de aproximadamente 20 mL em placas de Petri.

pH final: $7,4 \pm 0,2$ a 25°C.

A.6 –Água peptonada tamponada (APT)

Peptona -----	10 g
Cloreto de sódio -----	5g
Fosfato de sódio dibásico -----	3,5 g
Fosfato de potássio monobásico -----	1,5 g
Água destilada -----	1000 mL

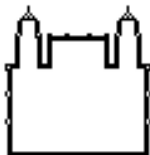
Suspender e dissolver os componentes em água destilada. Distribuir alíquotas de 225 mL em frascos erlenmeyers com capacidade de 500 mL e alíquotas de 10 mL em tubos de ensaio.16 x 160mm. Esterilizar em autoclave a 121°C durante 15 minutos.

pH final: $7,2 \pm 0,2$ a 25°C.

Nota:

Qmeio pronto deve ser estocado em temperatura de 15 a 30°C.

/ANEXO A – Cont.



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: PESQUISA E CONTAGEM DE *Salmonella* SP EM CARCAÇAS CONGELADAS DE FRANGO

NÚMERO
65.3210.044

/ANEXO A – Cont.

A.7 – Caldo uréia

Extrato de levedura-----	0,1g
Fosfato dibásico de sódio-----	9,5g
Fosfato monobásico de potássio-----	9,1g
Uréia bacteriológica-----	20,0g
Vermelho de fenol-----	0,01g
Água destilada-----	1000 mL

Suspender os ingredientes em água destilada e homogeneizar até a total dissolução. Esterilizar por filtração. Distribuir alíquotas de 3 mL em tubos de ensaio 13 x 100 mm.
pH final $6,8 \pm 0,2$ a 25°C.

A.8 – Caldo tetrionato

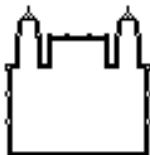
Polipeptona -----	5 g
Sais biliares -----	1 g
Carbonato de cálcio -----	10 g
Tiosulfato de sódio (pentahidratado) -----	30 g
Água destilada -----	1000 mL

Suspender os componentes em água destilada e dissolver por aquecimento até a ebulição. Distribuir alíquotas de 10 mL em tubos de ensaio 16 x 160 mm estéreis. Não autoclavar. Estocar por até duas semanas a 5-10°C.
pH final $8,4 \pm 0,2$ a 25°C.

No momento da utilização do meio adicionar para cada 10 mL de caldo tetrionato 0,2 mL de solução de iodo-iodeto de potássio e 0,1 mL de solução de verde brilhante a 0,1% (Anexo B).

O meio não deverá ser estocado após o acréscimo das soluções descritas acima.

/ANEXO A – Cont.



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: PESQUISA E CONTAGEM DE *Salmonella* SP EM CARCAÇAS
CONGELADAS DE FRANGO

NÚMERO
65.3210.044

ANEXO A – Cont.

A.9 – Meio Rappaport Vassiliadis

Meio base

Triptona ----- 5 g
Cloreto de sódio ----- 8 g
Fosfato monobásico de potássio ----- 1,6 g
Água destilada ----- 1000 mL

O meio base deverá ser preparado no dia da sua utilização.

Solução de Cloreto de Magnésio

Cloreto de magnésio hexahidratado ----- 400g
Água destilada ----- 1000 mL

Estocar em frasco escuro a temperatura ambiente por até 1 ano.

Solução de verde malaquita oxalato

Verde malaquita oxalato ----- 0,4 g
Água destilada ----- 100 mL

Estocar em frasco escuro a temperatura ambiente por até 6 meses.

Meio completo :

Para o preparo do meio completo acrescentar para cada 1000 mL do meio base : 100 mL de solução de cloreto de magnésio e 10 mL de solução de verde malaquita oxalato. Dispensar alíquotas de 10 mL em tubos 16 x 160 mm. Autoclavar a 115°C por 15 minutos. Estocar o meio completo em refrigerador e utilizar em até 1 mês após o preparo.

pH final 5,5 ± 0,2 a 25°C.

/ANEXO B



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: PESQUISA E CONTAGEM DE *Salmonella* SP EM CARCAÇAS
CONGELADAS DE FRANGO

NÚMERO
65.3210.044

ANEXO B

SOLUÇÕES E REAGENTES

B.1 – Solução de iodo-iodeto de potássio

Iodeto de potássio -----

5g

Iodo ressublimado ----- 6 g

Água destilada estéril -----20 mL

Dissolver o iodeto de potássio em 5 mL de água destilada estéril. Adicionar o iodo e dissolver por agitação. Diluir para um volume final de 20 mL.

B.2 – Solução de Verde Brilhante a 0,1%

Corante verde brilhante -----0,1 g

Água destilada estéril -----100 mL

Dissolver o corante em água estéril.

B.3 – Tampão de Butterfield

Solução estoque

Fosfato diácido de potássio (KH_2PO_4) -----34g

Água destilada-----500mL

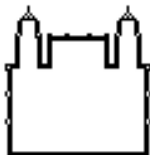
Ajustar o pH a 7,2 com NaOH 1N. Completar o volume para 1 litro, adicionando água destilada. Esterilizar a 121 °C por 15 minutos. Estocar sob refrigeração.

Preparo

Retirar 1,25 mL da solução estoque, descrita acima e acrescentar volume necessário de água destilada para completar 1 litro. Distribuir alíquotas de 225 mL em frascos erlenmeyers com capacidade de 500 mL e 90 mL em frascos erlenmeyers com capacidade de 250 mL.

Esterilizar a 121 °C por 15 minutos.

/ANEXO B – Cont.



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: PESQUISA E CONTAGEM DE *Salmonella* SP EM CARCAÇAS
CONGELADAS DE FRANGO

NÚMERO
65.3210.044

ANEXO B – Cont.

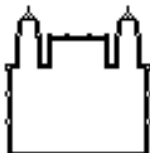
B.4 – Solução salina a 0,85%

Cloreto de sódio-----8,5g

Água destilada-----1000 mL

Dissolver o cloreto de sódio em água. Autoclavar a 121 °C / 15 minutos. Resfriar a temperatura ambiente.

/ANEXO C



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: PESQUISA E CONTAGEM DE *Salmonella* SP EM CARCAÇAS CONGELADAS DE FRANGO

NÚMERO
65.3210.044

ANEXO C

TABELA NMP

TABELA PARA DETERMINAÇÃO DO NÚMERO MAIS PROVÁVEL (NMP)

Tabela 1 – Para 3 séries de 3 tubos, contendo cada série 0.1, 0.01 e 0.001g de inóculo, correlacionados com a tabela de NMP/g e com intervalos de confiança de 95%

Tubos positivos			NMP/g	Limites de confiabilidade		Tubos positivos			NMP/g	Limites de confiabilidade	
0.10	0.01	0.001		Inferior	Superior	0.10	0.01	0.001		Inferior	Superior
0	0	0	< 3.0	--	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,1
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	--

/ANEXO D



MANUAL DA QUALIDADE

TÍTULO: PESQUISA E CONTAGEM DE *Salmonella* SP EM CARCAÇAS CONGELADAS DE FRANGO

NÚMERO
65.3210.044

ANEXO D

FICHA DE CONTROLE DE ENSAIO DE *SALMONELLA* SP.



PROGRAMA NACIONAL DE MONITORAMENTO DA PREVALÊNCIA E DA RESISTÊNCIA BACTERIANA EM FRANGO

FICHA DE CONTROLE DOS ENSAIOS DE *Salmonella* sp

LABORATÓRIO: _____ ESTADO: _____
 NÚMERO DA AMOSTRA: _____
 RECEBIMENTO DA AMOSTRA __/__/__
 INÍCIO DA ANÁLISE __/__/__
 TÉCNICO RESPONSÁVEL: _____ DATA DE ENVIO: __/__/__

1) PESQUISA DE *Salmonella* sp

Resultado:

Unidade Analítica **A** () Presente () Ausente
 Unidade Analítica **B** () Presente () Ausente
 Unidade Analítica **C** () Presente () Ausente
 Unidade Analítica **D** () Presente () Ausente
 Unidade Analítica **E** () Presente () Ausente

Isolados Enviados para Caracterização Antigênica

Número da amostra	Unidade da amostra	Número do isolado do LACEN	Meios de enriquecimento / isolamento	Data de envio dos isolados ao IOC	Caracterização Antigênica *
			/ /	/ /	
			/ /	/ /	
			/ /	/ /	
			/ /	/ /	
			/ /	/ /	
			/ /	/ /	
			/ /	/ /	
			/ /	/ /	
			/ /	/ /	
			/ /	/ /	
			/ /	/ /	
			/ /	/ /	
			/ /	/ /	
			/ /	/ /	
			/ /	/ /	
			/ /	/ /	
			/ /	/ /	
			/ /	/ /	
			/ /	/ /	
			/ /	/ /	
			/ /	/ /	
			/ /	/ /	

*O campo **Caracterização Antigênica** será utilizado pela coordenação do programa

2) Contagem de *Salmonella* sp

Unidade Analítica: ()A ()B ()C ()D ()E

Resultado: _____/g (NMP)

Intervalo de confiança: Limite inferior _____; Limite superior _____

TÍTULO:	DETECÇÃO DE ENTEROCOCOS EM CARCAÇAS DE FRANGO CONGELADAS	Número
		Revisão
PALAVRA-CHAVE	ENTEROCOCOS – ALIMENTOS – CARCAÇAS DE FRANGO	Página 1/11

SUMÁRIO

1. OBJETIVO	1
2. CAMPO DE APLICAÇÃO.....	1
3. REFERÊNCIAS.....	1
3.1 Normativas.....	1
3.2 Cruzadas	2
4. DEFINIÇÕES E SIGLAS	2
5. PROCEDIMENTO	2
5.1 Equipamentos.....	2
5.2 Materiais	2
5.3 Meios de cultura	2
5.4 Soluções e reagentes	3
5.5 Microrganismo de referência	3
6. Condições específicas	3
6.1 - Recepção e estocagem no laboratório	3
6.2 - Enxaguadura da amostra	3

1. OBJETIVO

Estabelecer as condições e procedimentos para a detecção de *Enterococcus* sp em carcaças congeladas de frango.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se ao Programa Nacional de Monitoramento de Enterococos em carcaças congeladas de frango (IAL/ANVISA) e visa uniformizar as metodologias de análise para os laboratórios participantes.

3. REFERÊNCIAS

3.1 - Normativas

Hartman. P. A.; Deibel, R.H.; Sieverding. M. Enterococci. In: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Ed. Washington, D.C.: American Public Health Association (APHA), 2001. cap. 9, p. 83-87.

	DATA	NOME
ELABORAÇÃO		
REVISÃO		
APROVAÇÃO		

CÓPIA NÃO CONTROLADA

POP - Enterococo ARQUIVO 04



TÍTULO:	DETECÇÃO DE ENTEROCOCOS EM CARÇAÇAS DE FRANGO CONGELADAS	Número
		Revisão
PALAVRA-CHAVE	ENTEROCOCOS – ALIMENTOS – CARÇAÇAS DE FRANGO	Página 2/11

3.2 - Cruzadas

Anexo 1 – Meios de cultura para detecção de Enterococos em carcaças congeladas de frango.

4. DEFINIÇÕES E SIGLAS

ATCC – American Type Culture Collection
 ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
 IAL – Instituto Adolfo Lutz

5. PROCEDIMENTO

5.1 - Equipamentos

- a) balança com capacidade para 3.000 g e sensibilidade de 0,01g;
- b) estufa bacteriológica a 35°C ± 2°C;
- c) banho-maria a 45°C ± 0,2°C.

5.2 - Materiais

- a) placas de Petri;
- b) pipetas graduadas de 1, 5, 10 e 25 mL;
- c) tubos de ensaio 16 X 160 mm;
- d) tubos de ensaio de 12 X 120 mm;
- e) erlenmeyer com capacidade de 4.000 mL;
- f) erlenmeyer com capacidade de 300 mL;
- g) saco plástico esterilizado com capacidade de 3k ;
- h) papel indicador de pH;
- i) algodão;
- j) alça e agulha de níquel cromo número 25 (diâmetro de 3 mm);
- k) lâminas de vidro.

Nota: Esterilizar os materiais em forno Pasteur a 170°C durante 2 horas.

5.3 - Meios de cultura (Anexo - 1)

- a) água peptonada 1% (APT);
- b) ágar bile esculina;
- c) caldo Enterococcosel;
- d) Caldo Enterococcosel com vancomicina (6µg/mL);
- e) Ágar Enterococcosel;
- f) Ágar Enterococcosel com vancomicina (6µg/mL).

CÓPIA NÃO CONTROLADA



TÍTULO:	DETECÇÃO DE ENTEROCOCOS EM CARÇAÇAS DE FRANGO CONGELADAS	Número
		Revisão
PALAVRA-CHAVE	ENTEROCOCOS – ALIMENTOS – CARÇAÇAS DE FRANGO	Página 3/11

- g) caldo infusão Cérebro Coração (BHI);
h) caldo BHI contendo 6,5 % de NaCl.

5.4 - Soluções e reagentes (Anexo-2)

- a) peróxido de hidrogênio a 3%;
b) reagentes para coloração de Gram;
c) ácido clorídrico 1 N;
d) hidróxido de sódio 1 N;
e) solução de vancomicina;
f) reagentes para a coloração de Gram.

5.5 - Microrganismo de referência

- a) *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
b) *S. Aureus* ATCC - 25923

6. Condições específicas

Acondicionadas e enviadas caixas isotérmicas ao laboratório, no menor período de tempo possível. Cada termo de coleta corresponde a cinco unidades do produto de uma única marca comercial. As cinco unidades devem apresentar a mesma data de embalagem e/ou data de vencimento do produto. Proceder a pesquisa de Enterococos nas 5 unidades da amostra.

6.1 - Recepção e estocagem no laboratório

Observar o aspecto geral das amostras. Verificar se as mesmas encontram-se congeladas e se todas as unidades apresentam a mesma data de embalagem e/ou vencimento da validade. Manter as amostras congeladas no laboratório. Proceder o descongelamento das mesmas na embalagem original durante 18 horas no refrigerador.

6.2 - Enxaguadura da amostra

Proceder a limpeza da superfície externa da embalagem utilizando algodão embebido em álcool 70%. Transferir a amostra para saco plástico estéril. Desprezar os miúdos de frango. Pesar a amostra e adicionar para cada 1 g do frango 1 mL do APT. Fazer a enxaguadura, cuidadosamente, em toda a superfície

CÓPIA NÃO CONTROLADA



TÍTULO:	DETECÇÃO DE ENTEROCOCOS EM CARÇAÇAS DE FRANGO CONGELADAS	Número
		Revisão
PALAVRA-CHAVE	ENTEROCOCOS – ALIMENTOS – CARÇAÇAS DE FRANGO	Página 4/11

do frango de maneira uniforme. Transferir o caldo de enxaguadura para de 4.000 mL. Deixar em repouso durante 60 minutos à temperatura ambiente. Verificar o pH do homogeneizado com papel indicador. Se necessário, ajustar o pH para $6,8 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ utilizando ácido clorídrico 1N ou hidróxido de sódio 1N.

Nota: Cada 1 mL do caldo de enxaguadura corresponde a 1 g da amostra.

6.3 - Detecção de Enterococos

Retirar duas alíquotas de 25 mL do caldo APT e transferi-las cada uma para um frasco contendo 225 mL de caldo Enterococcosel e para um frasco de caldo Enterococcosel com vancomicina ($6\mu\text{g/mL}$). Incubar a 35°C por até 48 horas.

6.3.2 - Análise Confirmatória

Enterococcosel sem vancomicina, repicar uma sementeira por esgotamento, em uma placa de ágar Enterococcosel sem vancomicina. O mesmo procedimento deve ser realizado quando houver crescimento no caldo acrescido de vancomicina, sendo repicada uma alçada para uma placa de ágar Enterococcosel com vancomicina. Incubar a 35°C - 24h.

6.3.3 - Seleção das colônias

Observar as placas de cada meio seletivo que contenham colônias típicas de *Enterococcus* sp, colônias com halo enegrecido devido a hidrólise da esculina.

Selecionar duas colônias de cada meio, sem e com vancomicina e, repicar em caldo BHI. Incubar a $35^{\circ}\text{C}/18\text{-}24\text{h}$ e proceder aos seguintes testes:

Coloração de Gram. Preparar esfregaço a partir de caldo BHI. Os enterococos são cocos Gram positivos alongados, arranjados em pares ou pequenas cadeias.

Teste de crescimento na presença de bile e hidrólise da esculina. Semear uma alçada de cultura em um tubo de ágar bile esculina e incubar a $35^{\circ}\text{C}/24\text{h}$.

Crescimento indica resistência à bile e escurecimento do ágar indica hidrólise da esculina. Os enterococos crescem na presença de bile e hidrolisam a esculina.

Teste de crescimento em 6,5% de NaCl. Semear uma alçada de cultura em caldo BHI contendo 6,5% de NaCl e incubar a $35^{\circ}\text{C}/72\text{h}$. A maioria dos enterococos cresce em 6,5% de NaCl.

CÓPIA NÃO CONTROLADA



TÍTULO:	DETECÇÃO DE ENTEROCOCOS EM CARCAÇAS DE FRANGO CONGELADAS	Número
		Revisão
PALAVRA-CHAVE	ENTEROCOCOS – ALIMENTOS – CARCAÇAS DE FRANGO	Página 5/11

Teste de crescimento a 45°C. Semear uma alçada de cultura em caldo BHI e incubar a 45°C/72h. Todos os enterococos crescem a 45°C.

Teste de catalase. Adicionar em caldo BHI, 1 mL de peróxido de hidrogênio 3% e observar produção de bolhas de gás (teste positivo) ou não (teste negativo). Os enterococos apresentam reação negativa para o teste da catalase.

Nota: Todas as etapas dos testes devem ser realizadas em paralelo com a cepa de referência.

6.3.4 - Avaliação de resistência antimicrobiana

As colônias identificadas como *Enterococcus* sp, devem ser enviadas para o Instituto Adolfo Lutz – Seção de Bacteriologia - A/C da Dra Rosemeire Zanella para avaliação de resistência antimicrobiana, no endereço:

Av. Dr Arnaldo, 351, 9º andar
CEP: 01246-902
Cerqueira César
São Paulo - Capital

CÓPIA NÃO CONTROLADA



TÍTULO:	DETECÇÃO DE ENTEROCOCOS EM CARCAÇAS DE FRANGO CONGELADAS	Número
		Revisão
PALAVRA-CHAVE	ENTEROCOCOS – ALIMENTOS – CARCAÇAS DE FRANGO	Página 6/11

ANEXO 1

MEIOS DE CULTURA

ÁGUA PEPTONADA TAMPONADA 1% (APT)

Peptona	10,0g
NaCl	5,0g
Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄)	3,5g
Fosfato monopotássico (KH ₂ PO ₄)	1,5g
Água destilada	1 litro

Preparação: dissolver os ingrediente, ajustar o Ph 7,2 +/- 0,2 e esterilizar a 121°C/15minutos.

ÁGAR BILE ESCULINA

Extrato de carne	3,0g
Peptona	5,0g
Sais biliares	40,0g
Esculina	1,0g
Citrato férrico	0,5g
Ágar	15,0g
Água destilada	1 litro
Ph final: 6,6.	

Preparação dissolver os ingredientes, ajustar o pH e aquecer até a completa fusão do ágar. Distribuir em tubos de 12 x 120 mm, esterilizar a 121°C/15 min e inclinar.

CALDO ENTEROCOCCOSEL

Caseína (digestão pancreática)	17,0g
Peptídeo	3,0g
Extrato de levedura	5,0g
Oxagal	10,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Citrato de sódio	1,0g
Esculina	1,0g
Citrato de ferro amoniacal	0,5g
Azida sódica	0,25g
Água destilada	1 litro

CÓPIA NÃO CONTROLADA



TÍTULO:	DETECÇÃO DE ENTEROCOCOS EM CARÇAÇAS DE FRANGO CONGELADAS	Número
		Revisão
PALAVRA-CHAVE	ENTEROCOCOS – ALIMENTOS – CARÇAÇAS DE FRANGO	Página 7/11

Preparação: Dissolver os ingredientes, ajustar o Ph 7,1+/- 0,2 e esterilizar a 121°C/15min.

ÁGAR ENTEROCOCCOSEL

ágar	
Caseína (digestão pancreática)	17,0g
Peptídeo	3,0g
Extrato de levedura	5,0g
Oxagal	10,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Citrato de sódio	1,0g
Esculina	1,0g
Citrato de ferro amoniacal	0,5g
Azida sódica	0,25g
Água destilada	1 litro

Preparação: Dissolver os ingredientes, ajustar o Ph 7,1+/- 0,2 e esterilizar a 121°C/15min. Distribuir em placas de Petri estéreis e identificar o meio de cultura na placa. Manter em geladeira por no máximo 15 dias.

CALDO ENTEROCOCCOSEL COM VANCOMICINA (6µg/mL)

Adicionar em 225 ml do caldo 0,54 ml de vancomicina preparada na concentração 2.500 µg/mL. Homogeneizar o meio de cultura.

Nota: adicionar a solução de vancomicina, no meio de cultura, somente no dia que será feita a pesquisa de Enterococo na carcaça do frango.

ÁGAR ENTEROCOCCOSEL COM VANCOMICINA (6µg/mL)

Preparar 150 ml da base e quando o ágar atingir a temperatura de 45 – 50°C adicionar 0,4 ml de vancomicina preparada na concentração de 2.500 µg/mL. Identificar o meio de cultura na placa.

Nota: preparar o meio de cultura próximo a data de uso e mantê-lo sempre em geladeira por no máximo 15 dias e embrulhado para evitar ressecamento.

CALDO INFUSÃO CÉREBRO CORAÇÃO (BHI)

Infusão de cérebro de bezerro	200,0g
-------------------------------	--------

CÓPIA NÃO CONTROLADA



TÍTULO:	DETECÇÃO DE ENTEROCOCOS EM CARÇAÇAS DE FRANGO CONGELADAS	Número
		Revisão
PALAVRA-CHAVE	ENTEROCOCOS – ALIMENTOS – CARÇAÇAS DE FRANGO	Página 8/11

Infusão de coração de boi	250,0g
Proteose peptona	10,0g
Dextrose	2,0g
Cloreto de sódio	5,0g
Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄)	2,5g
Água destilada	1 litro

Preparação: Dissolver os ingredientes, ajustar o Ph 7,4 distribuir 90 ml em frascos de 250 ml de capacidade e esterilizar a 121°C/15min.

CALDO INFUSÃO CÉREBRO CORAÇÃO (BHI) com 6,5% de NaCl

Infusão de cérebro de bezerro	200,0g
Infusão de coração de boi	250,0g
Proteose peptona	10,0g
Dextrose	2,0g
Cloreto de sódio	65,0g
Fosfato dissódico (Na ₂ HPO ₄)	2,5g
Água destilada	1 litro

Preparação: Pesar 37,0g do meio desidratado "Brain Heart Infusion Broth", acrescentar 65g de NaCl e 1 litro de água fria. Aquecer, agitando frequentemente, até completa dissolução do meio. Distribuir 5 mL em tubos de 12 mm x 120mm. Esterilizar a 121°C/15min.

CÓPIA NÃO CONTROLADA



TÍTULO:	DETECÇÃO DE ENTEROCOCOS EM CARÇAÇAS DE FRANGO CONGELADAS	Número
		Revisão
PALAVRA-CHAVE	ENTEROCOCOS – ALIMENTOS – CARÇAÇAS DE FRANGO	Página 9/11

ANEXO 2

SOLUÇÕES E REAGENTES

ÁCIDO CLORÍDRICO 1N

Ácido clorídrico concentrado 89 mL
 Água destilada q.s.p. 1000 ml
 Esterilizar em autoclave a 121°C/15 min. Estocar à temperatura ambiente.

HIDRÓXIDO DE SÓDIO 1N

Hidróxido de sódio 40g
 Água destilada q.s.p. 1000 mL

Esterilizar em autoclave a 121°C/15 min. Estocar à temperatura ambiente.

PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO 3%

Peróxido de hidrogênio 30% 3,0 mL
 Água destilada completar para 100 mL

Preparação: dissolver a água oxigenada 30% em água destilada, completando volume para 100 mL.
Cuidado! O peróxido de hidrogênio a 30% pode provocar queimaduras dolorosas, devendo ser manuseado com luvas e óculos protetores. Em caso de respingos na pele, lavar com etanol 70% em abundância. Não lavar com água.

REAGENTES PARA COLORAÇÃO DE GRAM

SOLUÇÃO DE CRISTAL VIOLETA DE HUCKER

Solução A
 Cristal violeta (90% pureza) 2,0g
 Etanol 95% 20,0 mL

Solução B
 Oxalato de amônio monohidratado 0,2g
 Água destilada 20,0 mL

CÓPIA NÃO CONTROLADA



TÍTULO:	DETECÇÃO DE ENTEROCOCOS EM CARCAÇAS DE FRANGO CONGELADAS	Número
		Revisão
PALAVRA-CHAVE	ENTEROCOCOS – ALIMENTOS – CARCAÇAS DE FRANGO	Página 10/11

Misturar as soluções A e B, deixar em repouso por 24h e filtrar em papel de filtro comum. Estocar em frasco escuro.

SOLUÇÃO DE IODO (LUGOL)

Iodo	1,0g
Iodeto de potássio (KI)	2,0g
Água destilada	300 mL

Colocar o iodeto de potássio num almofariz, adicionar o iodo e homogeneizar com pistilo. Adicionar, porções de 1 mL, 5 mL e 10 mL de água destilada, homogeneizando a solução após cada adição. Em seguida, transferir a solução para um frasco escuro, lavando o almofariz e o pistilo com o restante da água destilada.

SOLUÇÃO DE SAFRANINA

Safranina O	0,25g
Etanol 95%	10,0 mL
Água destilada	100,0 mL

Dissolver a safranina no álcool e adicionar a solução resultante aos 100 mL de água destilada. Estocar em frasco escuro.

SOLUÇÃO DE VANCOMICINA

Preparar a solução de vancomicina, distribuir em alíquotas para uso e manter em freezer -20°C por até 6 meses. Descongelar somente a alíquota para o uso e a sobra deve ser desprezada.

Nota: importante verificar antes do uso a potência do antibiótico, que varia a cada lote de purificação.

Cálculo para preparo da solução

Exemplo: Sigma : V-2002

Potência : 1.132 µg/mL

Cálculo usando a fórmula :

Volume x [] µg/mL

$$\text{Peso} = \frac{\text{Volume} \times [\text{Potência}]}{\text{Potência}}$$

$$P = \frac{50 \text{ mL} \times 2.500 \text{ µg/mL}}{1.132 \text{ µg/mg}} = \frac{125.000 \text{ µg}}{1.132 \text{ µg / mg}} = 110.42 \text{ mg} = 0,11 \text{ g/50 mL de H}_2\text{O estéril}$$

Preparo das alíquotas

CÓPIA NÃO CONTROLADA



TÍTULO:	DETECÇÃO DE ENTEROCOCOS EM CARÇAÇAS DE FRANGO CONGELADAS	Número
		Revisão
PALAVRA-CHAVE	ENTEROCOCOS – ALIMENTOS – CARÇAÇAS DE FRANGO	Página 11/11

Preparar líquotas e 0,7 mL para serem utilizadas tanto para o preparo do caldo Enterococcosel como para o preparo das placas de ágar.

CÓPIA NÃO CONTROLADA



	INSTITUTO ADOLFO LUTZ REGISTRO DA QUALIDADE		
NÚMERO ASMI5-01	MANUTENÇÃO DE CEPA DE ENTEROCOCO PARA SER ENVIADA AO LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA	REVISÃO 01	Página 74 / 6

SUMÁRIO

1. OBJETIVO	1
2. CAMPO DE APLICAÇÃO:.....	1
3. REFERÊNCIAS:.....	1
3.1 Normativas.....	1
3.2 Complementares:.....	1
3.3 Cruzadas:.....	1
4. DEFINIÇÕES E SIGLAS	2
5. PROCEDIMENTO	2
5.1 Equipamentos, vidraria, material.....	2
5.2 Meios de Cultura	2
5.3 Procedimento.....	2

1. OBJETIVO

Estabelecer as condições e procedimentos para a manutenção de cepas de *Enterococcus* sp no laboratório até o envio para o laboratório de referência.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO:

Aplica-se ao Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (IAL / ANVISA) e visa uniformizar as metodologias de análise para os laboratórios participantes.

3. REFERÊNCIAS:

3.1 Normativas

Não se aplica

3.2 Complementares:

Facklan, R.R.; Sahm, D.F.; Teixeira, M.M. *Enterococcus*. In: Murray, P.R.; Baron, E.J.; Pfaller, M.A.; Tenover, F.V.; Tenover, R.H. (ed). Manual of Clinical Microbiology, 7th edition. American Society for Microbiology, Washington, 199: p.297-305.



3.3 Cruzadas:

POP: Detecção de Enterococos em Carcaças Congeladas de Frango

	DATA	NOME
ELABORAÇÃO		Rosemeire Cobo Zanella
REVISÃO		Glória Regina Freitas do Valle
APROVAÇÃO		

CÓPIA CONTROLADA – REPRODUÇÃO PROIBIDA



	INSTITUTO ADOLFO LUTZ REGISTRO DA QUALIDADE		
NÚMERO ASMI5-01	MANUTENÇÃO DE CEPA DE ENTEROCOCCO PARA SER ENVIADA AO LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA	REVISÃO 01	Página 2 / 6

ANEXO 1 – Meios de cultura para detecção de Enterococos em Carcaça de Frango.

DEFINIÇÕES E SIGLAS

IAL – Instituto Adolfo Lutz

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BHI – Brain heart infusion (infusão de cérebro e coração)

cepa – cultura pura do crescimento bacteriano.

5. PROCEDIMENTO

5.1 Equipamentos, vidraria, material

- a) placa de Petri;
- b) erlemeyer com capacidade de 500ml;
- c) tubos de 16 x 160 mm;
- d) estufa bacteriológica a 35
- e) swab estéril, com haste flexível e embalados individualmente;
- f) pipetas graduadas de 5, 10 e 25ml;
- g) geladeira;
- h) tubos criogênicos de 2,0 ml estéreis

Nota: todo o material deve ser esterilizado em forno Pasteur a 170°C / 2 horas.

5.2 Meios de Cultura

- a) ágar BHI
- b) meio de Amies sem carvão (meio de transporte)

5.3 Procedimento

A partir da análise confirmatória de *Enterococcus* das amostras de frango, proceder a manutenção das cepas para o envio ao laboratório de referência.



5.3.1. Manutenção da cepa.

Após obtenção do resultado da análise confirmatória do gênero Enterococos, selecionar 2 colônias isoladas do ágar Enterococcosel sem vancomicina e 2

	DATA	NOME
ELABORAÇÃO		Rosemeire Cobo Zanella
REVISÃO		Glória Regina Freitas do Valle
APROVAÇÃO		

CÓPIA CONTROLADA – REPRODUÇÃO PROIBIDA



	INSTITUTO ADOLFO LUTZ REGISTRO DA QUALIDADE		
NÚMERO ASMI5-01	MANUTENÇÃO DE CEPA DE ENTEROCOCCO PARA SER ENVIADA AO LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA	REVISÃO 01	Página 3 / 6

Encaminhadas para o Laboratório de Referência. A partir do crescimento obtido em ágar bile-esculina, fazer um repique da cepa em tubo de ágar BHI e após o período de incubação a 35-36°C por 18-24hs. Manter a cepa corretamente identificada em geladeira até o encaminhamento para o laboratório de referência. Não exceder 1 mês.

Nota: identificar corretamente as colônias isoladas do ágar Enterococcosel sem ecom vancomicina.

5.3.2. Preparo da cepa para encaminhamento ao Laboratório de Referência.

A partir do tubo de ágar BHI semear a cepa, com swab, em placa de ágar BHI e incubar a 35-36°C por 18-24hs. Coletar todo o crescimento com auxílio de um swab e introduzi-lo no meio Amies, quebrar ou cortar a haste do swab que fica para fora do tubo, fechar, vedar e identificar adequadamente cada cepa no próprio tubo.

Manter o tubo pronto em temperatura ambiente até o envio para o Laboratório de Referência, este período não deve ultrapassar 3 dias. Encaminhar a cepa segundo o PSMIB2-01 – TRANSPORTE DE SUBSTÂNCIAS INFECCIOSAS PARA O LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA.

ANEXO A



ANEXO A

MEIOS DE CULTURA

	DATA	NOME
ELABORAÇÃO		Rosemeire Cobo Zanella
REVISÃO		Glória Regina Freitas do Valle
APROVAÇÃO		

CÓPIA CONTROLADA – REPRODUÇÃO PROIBIDA



	INSTITUTO ADOLFO LUTZ REGISTRO DA QUALIDADE		
NÚMERO ASMI5-01	MANUTENÇÃO DE CEPA DE ENTEROCOCCO PARA SER ENVIADA AO LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA	REVISÃO 01	Página 4 / 6

ÁGAR BHI (INFUSÃO DE CÉREBRO E CORAÇÃO)

Meio Base:

Infusão de cérebro	200 g
Infusão de coração	250 g
Proteose Peptona	10 g
Bacto dextrose	2g
Cloreto de sódio	5g
Fosfato di-básico de sódio	2,5 g
Ágar	15 g
Água destilada	1 l
pH final	7,4 +/- 0,2 a 25°C

Preparar a base conforme instrução do fabricante. Autoclavar 15 minutos/121 °C. Dispensar em tubos de 16x160 mm o volume de 10 ml e manter o tubo deitado e inclinado até sua solidificação e preparar placas com aproximadamente 20 ml de meio de cultura.

Fazer controle de esterilidade, incubando por 24 e 48hs a 37°C. Rotular e datar.

Estocar a 4°C, devidamente armazenado.

Validade de aproximadamente 15 dias.

/ANEXO A - Cont.

ANEXO A - Cont.

MEIO AMIES SEM CARVÃO PARA TRANSPORTE DE CEPA

Meio base:

Cloreto de sódio	3g
------------------	----

	DATA	NOME
ELABORAÇÃO		Rosemeire Cobo Zanella
REVISÃO		Glória Regina Freitas do Valle
APROVAÇÃO		

CÓPIA CONTROLADA – REPRODUÇÃO PROIBIDA

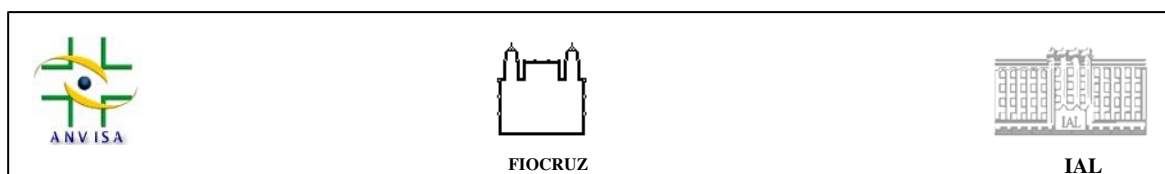


	INSTITUTO ADOLFO LUTZ REGISTRO DA QUALIDADE		
NÚMERO ASMI5-01	MANUTENÇÃO DE CEPA DE ENTEROCOCO PARA SER ENVIADA AO LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA	REVISÃO 01	Página 5 / 6

Cloreto de potássio	0,2g
Cloreto de cálcio	0,1g
Cloreto de magnésio	0,1g
Fosfato monobásico de potássio	0,2g
Fosfato di-básico de sódio	1,15g
Tioglicolato de sódio	1g
Bacto ágar	7,5g
Água destilada	.1L
pH final 7,3 +/- 0,1 a 25°C	

Preparar a base conforme instrução do fabricante. Autoclavar 15 minutos/121°C.
 Dispensar 1,5 ml do meio nos tubos criogênicos, tampar e manter o tubo em pé até sua solidificação. Fazer controle de esterilidade, incubando por 24 e 48hs a 37°C. Rotular e datar.
 Estocar a 4°C, devidamente armazenado por 30 dias.

ANEXO B



ANEXO B



PROGRAMA NACIONAL DE MONITORAMENTO DA PREVALÊNCIA E DA RESISTÊNCIA BACTERIANA EM FRANGO

Formulário para o envio dos isolados de *Enterococcus* sp

	DATA	NOME
ELABORAÇÃO		Rosemeire Cobo Zanella
REVISÃO		Glória Regina Freitas do Valle
APROVAÇÃO		

CÓPIA CONTROLADA – REPRODUÇÃO PROIBIDA



	INSTITUTO ADOLFO LUTZ REGISTRO DA QUALIDADE		
NÚMERO ASMI5-01	MANUTENÇÃO DE CEPA DE ENTEROCOCO PARA SER ENVIADA AO LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA	REVISÃO 01	Página 6 / 6

Laboratório Estado Responsável Rubrica

Nº da amostra do LACEN	Número do laudo	Unidade da amostra	Nº do isolado do LACEN	Meio de isolamento	Identificação (preenchido pelo Lab. De Referência)	Observações
			E Ea	sem vancomicina		
		A	E Eb	sem vancomicina		
			E Ec	com vancomicina		
			E Ed	com vancomicina		
			E Ba	sem vancomicina		
		B	E Bb	sem vancomicina		
			E Bc	cem vancomicina		
			E Bd	cem vancomicina		
			E Ca	sem vancomicina		
		C	E Cb	sem vancomicina		
			E Cc	cem vancomicina		
			E Cd	cem vancomicina		
			E Da	sem vancomicina		
		D	E Db	sem vancomicina		
			E Dc	com vancomicina		
			E Dd	cem vancomicina		
			E Ea	sem vancomicina		
		E	E Eb	sem vancomicina		
			E Ec	cem vancomicina		
			E Ed	cem vancomicina		

A ser preenchido pelo Laboratório de Referência:

Data:

Assinatura do responsável:

	DATA	NOME
ELABORAÇÃO		Rosemeire Cobo Zanella
REVISÃO		Glória Regina Freitas do Valle
APROVAÇÃO		

CÓPIA CONTROLADA – REPRODUÇÃO PROIBIDA





**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DOS INSTITUTOS DE PESQUISA**



TÍTULO	Transporte de substâncias infecciosas para o Laboratório de Referência (Território Nacional)	Número: PSMIB2-01
PALAVRAS-CHAVE	Transporte, Material infeccioso	Revisão: 00
		Página: 1/5

SUMÁRIO

1. OBJETIVO:	1
2. CAMPO DE APLICAÇÃO.....	1
3. REFERÊNCIAS.....	1
3.1 Normativas.....	1
3.2 Complementares.....	2
3.3 Cruzadas:.....	2
4. DEFINIÇÕES E SIGLAS	2
5. PROCEDIMENTO:	2
5.1 Equipamentos.	2
5.2 Procedimento:	3
5.3 Formulários e documentos para remessa.....	4

CONTROLE DAS ALTERAÇÕES:

1. OBJETIVO:

Estabelecer as condições e procedimentos para o transporte de material biológico para o Laboratório de Referência.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se ao Programa Nacional de Monitoramento de *Enterococcus* em carcaças congeladas de frango (IAL/ANVISA) e visa uniformizar as metodologias que serão empregadas pelos laboratórios participantes.

3. REFERÊNCIAS

3.1 Normativas

	DATA	NOME
ELABORAÇÃO		Rosemeire Cobo Zanella
REVISÃO		Glória Regina Freitas do Valle
APROVAÇÃO		

CÓPIA CONTROLADA – REPRODUÇÃO PROIBIDA





**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DOS INSTITUTOS DE PESQUISA**



TÍTULO	Transporte de substâncias infecciosas para o Laboratório de Referência (Território Nacional)	Número: PSMIB2-01
PALAVRAS-CHAVE	Transporte, Material infeccioso	Revisão: 00 Página: 2/5

3.2 Complementares

Guia para transporte seguro de substâncias infecciosas e material de diagnóstico da OMS (WHO/EMC/97.3)

Regulamento de cargas perigosas (IATA seção 5, instrução 602 e 650)

Portaria n° 1985, de 25 de outubro de 2001- Regulamento técnico para o transporte de substâncias infecciosas e amostras para o diagnóstico, no MERCOSUL.

Recomendações do Comitê de Especialistas das Nações Unidas para o Transporte de Artigos Perigosos.

Portaria N° 271E/SPL, de 1° de julho de 1998.

3.3 Cruzadas:

PSMIB2-02 – Manutenção de cepa de *Enterococcus* isolada de carcaça de frango para encaminhamento ao Laboratório de Referência.

4. DEFINIÇÕES E SIGLAS

IAL : Instituto Adolfo Lutz

INCQS : Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IATA : International Air Transport Association

OMS – Organização Mundial da Saúde

Substâncias infecciosas: São aquelas que contêm microorganismos viáveis, tais como bactérias, rickettsias, vírus, parasitas, fungos ou um microorganismo recombinante, híbrido ou mutante que sabidamente ou com probabilidade razoável é capaz de provocar doenças no homem e nos animais, segundo WHO/EMC/97.3.

Amostra para diagnóstico: Definida como qualquer material humano ou animal que incluem, porém não se limitam a: excrementos, secreções, sangue e seus derivados, tecidos e líquidos orgânicos, e que são coletados para fins de diagnósticos: se excluem os animais infectados vivos.

Laboratórios de Referência: Os Laboratórios que receberão as amostras biológicas para análises.

5. PROCEDIMENTO:

5.1 Equipamentos.

Caixa para transporte de substâncias infecciosas de acordo com: “Guia para transporte seguro de substâncias infecciosas e material de diagnóstico da OMS”.

CÓPIA CONTROLADA – REPRODUÇÃO PROIBIDA





**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DOS INSTITUTOS DE PESQUISA**



TÍTULO	Transporte de substâncias infecciosas para o Laboratório de Referência (Território Nacional)	Número: PSMIB2-01
PALAVRAS-CHAVE	Transporte, Material infeccioso	Revisão: 00
		Página: 3/5

5.2 Procedimento:

As amostras acondicionadas e identificadas deverão ser embaladas em caixas específicas para transporte de amostras biológicas, segundo: “Guia para transporte seguro de substâncias infecciosas e material de diagnóstico (WHO/EMC/97.3) e “Regulamento de cargas perigosas” (IATA seção 5, instrução 602 e 650).

O encaminhamento das amostras deve ser feito de forma segura e eficaz e no menor espaço de tempo para a entrega aos Laboratórios de Referência.

Laboratório de Referência para *Salmonella*:

Dália dos P. Rodrigues
Laboratório de Enterobactérias
Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ
Av. Brasil, 4365 - Pav. Rocha Lima - 3o. andar
Manguinhos- Rio de Janeiro -RJ
CEP: 21.045-900
Tel # 0 xx 21 2598-4277 R 316
Fax # 0 xx 21 2270-1599 R 331

Laboratório de Referência para *Enterococcus*:

Instituto Adolfo Lutz
Avenida Dr Arnaldo, 355 / 9º andar – Cerqueira Cezar
CEP: 01246-902 – São Paulo – SP
Tel.: (xx11) 3068-2894
Fax: (xx11) 3085-3505
Contato: Dra Rosemeire Zanella
email: cobo@ial.sp.gov.br

5.2.1. Responsabilidades do procedimento:

O transporte de substâncias infecciosas e amostras biológicas para análise em laboratórios habilitados pelos Ministérios da Saúde, estabelece responsabilidades para o remetente e o destinatário.

CÓPIA CONTROLADA – REPRODUÇÃO PROIBIDA





**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DOS INSTITUTOS DE PESQUISA**



TÍTULO	Transporte de substâncias infecciosas para o Laboratório de Referência (Território Nacional)	Número: PSMIB2-01
PALAVRAS-CHAVE	Transporte, Material infeccioso	Revisão: 00
		Página: 4/5

Do Remetente:

Com antecedência contatar com o destinatário (laboratório) para as providências necessárias para o recebimento e processamento das amostras.

O envio será acertado através do transporte mais adequado.

O envio deverá ser feito pela rota mais direta e evitando sua chegada nos finais de semana e feriados no destino.

Embarcar e identificar a substância infecciosa ou a amostra biológica para análise laboratorial, seguindo padrões de biossegurança estabelecidas nas "Recomendações do Comitê de Especialistas das Nações Unidas para o Transporte de Artigos Perigosos".

Do destinatário:

- Notificar imediatamente ao remetente a chegada do material enviado.

5.2.2. Embalagem e rótulo

Deverá ser realizado de acordo ao prescrito no documento:

"DANGEROUS GOODS REGULATIONS" 40 th Edition – 1 January 1999.

International Air Transport Association (I.A.T.A.) Section 5 – Packing – Instruction Nº 602 y Nº 650.

5.3. Formulários e documentos para remessa

As remessas de substâncias infecciosas e/ou biológicas para análise laboratorial entre serviços de saúde, pesquisas e profissionais de saúde, devem ser acompanhada da declaração de transporte de carga perigosa impressa em duas vias e em papel timbrado da instituição remetente, conforme modelo.

CÓPIA CONTROLADA – REPRODUÇÃO PROIBIDA





**SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DOS INSTITUTOS DE PESQUISA**



TÍTULO	Transporte de substâncias infecciosas para o Laboratório de Referência (Território Nacional)	Número: PSMIB2-01
PALAVRAS-CHAVE	Transporte, Material infeccioso	Revisão: 00
		Página: 5/5

ANEXO A

EXEMPLO

PAPEL TIMBRADO

São Paulo, 31 de julho de 2000

DECLARAÇÃO

Ao Correio - **Nome da cidade**

Destinatário:

Dra. Rosemeire Cobo Zanella
Bacteriologia
Instituto Adolfo Lutz
Av. Dr. Arnaldo 351
São Paulo, SP CEP: 01246 – 902

Remetente:

Dr. Fulano de Tal
Laboratório Central do Estado XXXX
Endereço Completo

Declaramos que estamos enviando material biológico, **não comerciável**, não explosivo e não volátil para complementação científica necessária no Serviço de Saúde, sendo de uso exclusivo de pesquisa. Trata-se de bactéria acondicionada em meio de transporte específico e contido em **XX** frascos devidamente fechados e acondicionados. A embalagem contendo os frascos não deve ser aberta a fim de se evitar que se quebre e ocorra perda do material.

Atenciosamente,

Nome do responsável - No do CRBM/ CRB/ CRF
Encarregada Setor Técnico
Seção de Bacteriologia
Lacen XXXXX

	DATA	NOME
ELABORAÇÃO		Rosemeire Cobo Zanella
REVISÃO		Glória Regina Freitas do Valle
APROVAÇÃO		

CÓPIA CONTROLADA – REPRODUÇÃO PROIBIDA



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz



FIOCRUZ



Dep. Bacteriologia – Laboratório de Enterobactérias
Av. Brasil, 4365 – Pav Rocha Lima – Manguinhos – RJ – CEP 21.045-900
TEL # 0 XX 21 2598-4277 / 2270-1590 R 316 FAX # XX 21 2270-1599 R 331

Procedimentos Operacionais Padrão Laboratório de Enterobactérias

TITULO DA ATIVIDADE: Encaminhamento das cepas de *Salmonella* spp, para caracterização antigênica e avaliação da suscetibilidade antimicrobiana

1. OBJETIVO

Estabelecer as condições e procedimento para o transporte das cepas de *Salmonella* sp. para o LABENT – IOC – FIOCRUZ – Laboratório de Referência em *Salmonella* sp.

2. CAMPO DE APLICAÇÃO

Aplica-se ao Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência da Resistência bacteriana em Frango.

3. NÍVEL DE BIOSSEGURANÇA COM RECOMENDAÇÕES PARA A ATIVIDADE

Nível de Biossegurança 2, na etapa de semeadura das cepas em Agar tamponado.

4. DEFINIÇÕES E SIGLAS

LABENT- Laboratório de Enterobactérias

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

IATA – International Air Transport Association

OMS – Organização Mundial de Saúde

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz



FIOCRUZ



Dep. Bacteriologia – Laboratório de Enterobactérias

Av. Brasil, 4365 – Pav Rocha Lima – Manguinhos – RJ – CEP 21.045-900

TEL # 0 XX 21 2598-4277 / 2270-1590 R 316 FAX # XX 21 2270-1599 R 331

5. CONDIÇÕES GERAIS

5.1) Material e Equipamentos

- a) tubos de poliestireno com capacidade de 2 mL;
- b) caixas para transporte de material para diagnóstico laboratorial, OMS/IATA;
- c) estufa bacteriológica a 30-35°C.

5.2) Meio de cultura (Anexo A)

- a) Ágar nutriente tamponado.

6. CONDIÇÕES ESPECÍFICAS

Os isolados obtidos através da metodologia descrita no POP (65.3210.044) - “Pesquisa e Contagem de *Salmonella* sp em Carcaças Congeladas de Frango” (INCQS / FIOCRUZ), devem ser encaminhados ao LABENT – IOC – FIOCRUZ – Laboratório de Referência para *Salmonella* sp, através dos procedimentos estabelecidos neste POP.

A cepa identificada presuntivamente como *Salmonella* spp., não deverá ser submetida a sub-cultivos.

Não utilizar meios de cultura que contenham carboidratos.

6.1 - Semeadura no meio de transporte

Semear cada uma das cepas identificadas em um tubo de poliestireno contendo 1,5mL de ágar nutriente tamponado, efetivando duas a três picadas em profundidade e estriamento em superfície.

Incubar a 37°C por 18-24 horas.

Após este período manter em temperatura ambiente, ao abrigo da luz solar.

Identificar o tubo de acordo com “Formulário para o Envio dos Isolados de *Salmonella* sp”, em anexo.



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz



FIOCRUZ



Dep. Bacteriologia – Laboratório de Enterobactérias
Av. Brasil, 4365 – Pav Rocha Lima – Manguinhos – RJ – CEP 21.045-900
TEL # 0 XX 21 2598-4277 / 2270-1590 R 316 FAX # XX 21 2270-1599 R 331

6.2 - Controle de qualidade interno (cepas padrão)

Deverá ser efetivado no meio de cultura utilizado, empregando cepa de *Salmonella* spp., visando garantir a qualidade dos resultados presuntivos efetivados

6.3 – Preparo do isolado para encaminhamento ao Laboratório de Referência

O encaminhamento das cepas deverá ser efetivado, com o máximo de intervalo, mensalmente.

Os isolados devidamente acondicionados e identificados deverão ser embalados em caixas específicas para o transporte de cepas para diagnóstico laboratorial, de acordo: “Guia para transporte seguro de substâncias infecciosas e materiais de diagnóstico da OMS” (WHO/EMC/97.3) e “Regulamento de cargas perigosas” (IATA seção 5, instrução 602 e 650) e Espécimes para diagnóstico devem ser assinaladas com o código IATA UM 3373.

6.4 - Detalhes do processamento

Todos os isolados deverão possuir identificação, compatível com o “Formulário para o Envio dos Isolados de *Salmonella* sp”, encaminhado em anexo.

7– RESPONSABILIDADE DO PROCEDIMENTO

O transporte de substâncias infecciosas em laboratórios habilitados pelo Ministério da Saúde estabelece responsabilidade para o remetente e o destinatário.



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz



FIOCRUZ



Dep. Bacteriologia – Laboratório de Enterobactérias
Av. Brasil, 4365 – Pav Rocha Lima – Manguinhos – RJ – CEP 21.045-900
TEL # 0 XX 21 2598-4277 / 2270-1590 R 316 FAX # XX 21 2270-1599 R 331

Do remetente:

Com antecedência contactar com o destinatário (laboratório) para as providências necessárias para o recebimento e processamento das amostras.

O envio deverá ser efetivado mensalmente através do transporte mais adequado, na região.

O envio deverá ser feito pela a rota mais direta e evitando sua chegada nos finais de semana e feriados no destino.

Embarcar e identificar a substância infecciosa ou amostra biológica para análise laboratorial, seguindo padrões de Biossegurança estabelecidas nas “Recomendações do Comitê de Especialistas das Nações Unidas para o Transporte de Artigos Perigosos”.

Do destinatário:

Notificar imediatamente ao remetente a chegada do material enviado.

8. SOLUÇÃO DE POSSÍVEIS PROBLEMAS

Caso não ocorra o crescimento no meio a ser empregado para manutenção e envio das cepas, repetir o procedimento de repique a partir do meio original de crescimento.

A empresa de transporte precisa entrar em contato com o remetente e o destinatário, além de informar as autoridades de saúde pública toda vez que uma remessa contendo substâncias infecciosas for danificada durante o transporte.

9. EMBALAGENS E RÓTULO

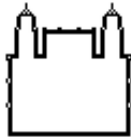
Deverá ser realizado de acordo ao prescrito no documento: “DANGEROUS GOODS REGULATIONS” 40th Edition – 1 January 1999. International Air Transport Association (IATA); Section 5 – Packing - Instruction N° 602 and N° 650, as quais devem apresentar as seguintes informações:

- Especificação da amostra;
- Nível de Biossegurança;
- Rótulo avisando perigo biológico;



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz



FIOCRUZ



Dep. Bacteriologia – Laboratório de Enterobactérias
Av. Brasil, 4365 – Pav Rocha Lima – Manguinhos – RJ – CEP 21.045-900
TEL # 0 XX 21 2598-4277 / 2270-1590 R 316 FAX # XX 21 2270-1599 R 331

- Rótulo com o endereço do remetente e destinatário, inclusive telefone de contato.

10. FORMULÁRIOS E DOCUMENTOS PARA REMESSA

As remessas de substâncias infecciosas e/ou biológicas para análise laboratorial entre serviços de saúde, pesquisas e profissionais de saúde, devem ser acompanhadas da declaração de transportes de cargas perigosas impressa em duas vias em papel timbrado da Instituição remetente, conforme o modelo.

11. REGISTRO DE PROCESSAMENTO E RESULTADOS

Todas as cepas encaminhadas deverão conter no laboratório de origem o mesmo registro efetivado no encaminhamento.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Costa, G.A. & Hofer, E.. Isolamento e identificação de enterobactérias. Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 120 pp., 1972

Ewing, W. H.. Edward's & Ewing's Identification of Enterobacteriaceae. 4th Ed., Elsevier Sci. Publ Co. Inc. New York .536 pp., 1986.

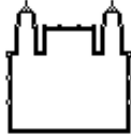
Grist, N.R. Manual de Biossegurança para Laboratórios. 2^a Ed. edição, Livraria Ed. Santos, pag. 48-54, 1995.

PESQUISA e Contagem de *Salmonella* sp em Carcaças Congeladas de Frango. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ. Seção 10 (65.3210.044)



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz



FIOCRUZ



Dep. Bacteriologia – Laboratório de Enterobactérias
Av. Brasil, 4365 – Pav Rocha Lima – Manguinhos – RJ – CEP 21.045-900
TEL # 0 XX 21 2598-4277 / 2270-1590 R 316 FAX # XX 21 2270-1599 R 331

ANEXO A

MEIO DE CULTURA

1) Agar nutriente tamponado

Agar nutriente-----	23 g
Cloreto de sódio-----	5 g
Fosfato de sódio dibásico-----	2 g
Água destilada-----	1000 mL

Suspender os componentes na água destilada. Dissolver sob agitação até a total dissolução do Agar. Distribuir alíquotas de 1,5mL em tubos de poliestireno.

Esterilizar a 121 ° C por 15 minutos.

Após a esterilização inclinar os tubos para a solidificação do ágar.

pH final 7,0 – 7,2



Ministério da Saúde

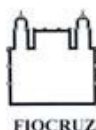
Fundação Oswaldo Cruz



FIOCRUZ



Dep. Bacteriologia – Laboratório de Enterobactérias
Av. Brasil, 4365 – Pav Rocha Lima – Manguinhos – RJ – CEP 21.045-900
TEL # 0 XX 21 2598-4277 / 2270-1590 R 316 FAX # XX 21 2270-1599 R 331



**PROGRAMA NACIONAL DE MONITORAMENTO DA PREVALÊNCIA E DA RESISTÊNCIA
BACTERIANA EM FRANGO**

Formulário para o envio de isolados de *Salmonella* sp

Laboratório:

Estado:

Responsável:

Rúbrica:

Destinatário: Laboratório de Enterobactérias – IOC/FIOCRUZ

Nº da amostra do LACEN	Número do laudo	Unidade da amostra	Número do isolado do LACEN	Caracterização Antigênica (a ser preenchido pelo Lab. de Referência)	Observações
		A	S Aa		
			S Aa		
			S Aa		
		B	S Aa		
			S Aa		
			S Aa		
		C	S Aa		
			S Aa		
			S Aa		
		D	S Aa		
			S Aa		
			S Aa		
		E	S Aa		
			S Aa		
			S Aa		

A ser preenchido pelo laboratório de referência

Data:

Assinatura do responsável:



Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango – Prebaf – Equipe Técnica

Equipe de coordenação geral – GGALI/ANVISA

- Lucas Medeiros Dantas – GACTA/GGALI (Coordenador – até 2009)
- Francisco Roberto Gomes Cardoso - GACTA/GGALI (Até junho 2006)
- Denilson da Silva Santos - GACTA/GGALI (a partir de junho 2006)
- Paula Roberta Mendes - GACTA/GGALI
- Angela Karinne Fagundes de Castro – GICRA/GGALI
- Rosane Maria Franklin Pinto - GICRA/GGALI
- Karem Gomes Modernell - GICRA/GGALI
- Laura Misk de Faria Brant - GICRA/GGALI

Equipe de coordenação técnica - INCQS/FIOCRUZ (Até abril/2005)

- Márcia Barbosa Warnken

Equipe de coordenação técnica - GGLAS/ANVISA (A partir de abril/2005)

- André Luiz Oliveira da Silva
- Lara Cristianine Tenório

Equipe do Laboratório do IOC/FIOCRUZ

- Dália dos Prazeres Rodrigues (coordenadora)
- Norma dos Santos Lazaro
- Eliane Moura Falavina dos Reis
- Wanderson Clay Porcino da Silva
- Renata Garcia Costa

Equipe do Laboratório do IAL/SP

- Rosemeire Cobo Zanella (coordenadora)
- Miyoko Jakobi

Colaboradores:

- Ricardo Titze – Universidade de Brasília (UnB)
- Ângela Patrícia Santana – Universidade de Brasília (UnB)



LISTA DOS PARTICIPANTES DO PREBAF – POR ESTADO

ALAGOAS

DIREÇÃO GERAL DO LACEN/AL:

Telma Machado Lisboa Pinheiro

GERENTE DE CONTROLE DA QUALIDADE DE PRODUTOS:

Everaldo Queiroz de Campos Júnior

EQUIPE EXECUTORA:

- Anna Cristina Costa Moreira da Silva – LACEN/AL
- Celi Silva do Nascimento – LACEN/AL
- Elaine Cristina Pereira Barros – LACEN/AL
- Ernande Rodrigues Leite Filho – LACEN/AL
- Maria Tânia Bezerra Guedes – VISA/AL
- Nadja Celina Cavalcante – LACEN/AL
- Paulo Costa Pereira – LACEN/AL
- Rejane Barros Cavalcante – LACEN/AL

AMAPÁ

EQUIPE TÉCNICA

- Emi Toguchi Emin – Farmacêutica Bioquímica;
- Sandra Eliane Maia P. da Silva – Farmacêutica Bioquímica (trabalhou no PREBAF até out/05, atualmente trabalha em outra Instituição);
- Newton Oliveira do Carmo – técnico de laboratório;
- João Soares – médico veterinário.

CEARÁ

EQUIPE ENVOLVIDA

VIGILÂNCIA SANITÁRIA

- Norival Ferreira dos Santos
- Ângela Maria Leite Gomes
- Fernando Rodrigues de Souza

LACEN

- Ana Claudia Lopes Aguiar
- Edna Cristina de Oliveira Brito
- Mirtis Tavares de Oliveira
- Maria Tereza Pinto da Costa
- Francisa Alexandra C. Pinto
- Elaine Pereira Macedo
- Helena Silvia F. de Arruda



- Everanne Madja Gomes
- Alisson Lima de Souza
- Marcelo Pamplona Fiuza

DISTRITO FEDERAL

EQUIPE EXECUTORA DO LACEN-DF

- Patrícia Almeida Bavaresco: Chefe do Núcleo de Alimentos e responsável junto a Coordenação Nacional pelo Programa no Lacen-DF
- Laila Chahele Miguel: analista responsável pelas análises laboratoriais
- Helena Michiko Yokoyama: analista responsável pelas análises laboratoriais
- Jane Rocha Figueiroa: apoio logístico
- Joana D'Arc Parente dos Reis: Chefe substituta do Núcleo de Alimentos, responsável pelo Programa de setembro a dezembro de 2005, período em que foram analisadas 20 amostras.

ESPÍRITO SANTO

ESTRUTURA/EQUIPE ENVOLVIDA

- Núcleo de Vigilância Sanitária Estadual
Responsável Administrativo/Amostragem – Maria Júlia Dam
Responsável pela Coleta
- Marisa Helena Dan
- Maria Júlia Dam
- Laboratório Central de Análise – LACEN-ES
Responsável pela Análise: Vera Lúcia Valle

GOIÁS

VISA

- Angela Maria M.M.Cardoso - Superintendente Vigilância Sanitária
- João Ferreira de Moraes - Gerente de Fiscalização
- Márcia Regina de Moura Dias - Coordenação de Alimentos - Responsável pelo Projeto na VISA (coletas)

LACEN

- Maria Bárbara Helou Rodrigues - Diretora do LACEN
- Marluvia Catúlio - Chefe da Sessão de Bromatologia
- Maria Augusta P. Paiva - Responsável pelo projeto no LACEN

MATO GROSSO DO SUL

EQUIPE TÉCNICA MICROBIOLOGISTAS



- Míriam Tokeshi Muller
- Andréia Massulo
- Kelly Cristina S. da Silveira Salles
- Cleide Medeiro

COORDENAÇÃO DO PROJETO

- Sônia Aparecida Viana Câmara

MINAS GERAIS

GERÊNCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA DE ALIMENTOS DE MINAS GERAIS - GVA

Gerentes:

- Ligia Lindner Shereiner (antes de março/2007)
- Milton Cabral de Vasconcelos Neto (março/2005 a maio/2007)
- Claudia Parma Machado (a partir de maio/2007)

Coordenadora do Prebaf/ GVA:

- Magda Regina Gonçalves de Paula Ferreira

LACEN/FUNED:

- Maria Crisolita Cabral da Silva
- Karine Queiroz da Silva
- Eronilda de Castro Pena
- Junara Viana de Oliveira

Agentes de Vigilância Sanitária que procederam coletas de amostras no comércio:

GRS/ALFENAS/VISA MUNICIPAL de Poço Fundo – Silnes Helena Diogo Marçal

GRS/ALFENAS/VISA MUNICIPAL de Serrania – Ivana Araújo

GRS/ BARBACENA/VISA MUNICIPAL de Ouro Branco – Marise Lopes Paiva de Moraes

GRS/ BARBACENA/ VISA MUNICIPAL Conselheiro Lafaiete – Kassim G.Raslan

GRS/ BARBACENA/VISA MUNICIPAL de Barbacena – Marco Túlio Santos Salim

GRS/ BARBACENA/VISA MUNICIPAL de Piranga – Aline Faria Cruz

GRS/CORONEL FABRICIANO MUNICIPAL de Ipatinga – Barôncio Paulo de Oliveira Cabral

GRS/BELO HORIZONTE/ VISA MUNICIPAL de Ribeirão das Neves – Adaurly Benicio Costa

GRS/BELO HORIZONTE/VISA MUNICIPAL Nova Lima – contato: Antonio Furtado

GRS/BELO HORIZONTE/VISA MUNICIPAL de Belo Horizonte/Regional Centro Sul – Leandro Esteves de Vasconcellos

GRS/BELO HORIZONTE/VISA MUNICIPAL de Contagem – Rosemere Valadares Santana

GRS/DIVINÓPOLIS/VISA MUNICIPAL de Pará de Minas – Adilson José Batista

GRS/DIVINÓPOLIS/VISA MUNICIPAL de Arcos – Sebastião Alves Bitencourt

GRS/DIVINÓPOLIS/VISA MUNICIPAL de Divinópolis – contato: Celina Maria Pires dos Santos

GRS/DIVINÓPOLIS – Maria Cleide Freire

GRS/DIVINÓPOLIS – Elizabeth Champion

GRS/GOVERNADOR VALADARES/VISA MUNICIPAL de Caratinga – Bruno da Costa Pinto



GRS/ITABIRA/VISA MUNICIPAL de São Gonçalo do Rio Abaixo – Erlon Cristian Lopes
GRS/ITABIRA/VISA MUNICIPAL de Itabira – Adir da Conceição Jabom
GRS/ITUIUTABA/VISA MUNICIPAL de Ituiutaba – Aguinaldo Moura da Silva
GRS/MANHUMIRIM/VISA MUNICIPAL de Manhumirim – Sávia Francklin Mansur
GRS/MONTES CLAROS/VISA MUNICIPAL de Montes Claros – Ivanilde Alves Gusmão
GRS/PASSOS/VISA MUNICIPAL de São Sebastião do Paraíso – Maria Antonia de Freitas Pereira
GRS/PONTE NOVA/VISA MUNICIPAL de Viçosa – Luiz Roberto de Freitas da Silva
GRS/POUSO ALEGRE/VISA MUNICIPAL de Itajubá – Jonas Rodrigues
GRS/UBERABA/VISA MUNICIPAL de Uberaba – Adilson Caetano da Silva
GRS/UBERABA – Adilson Caetano da Silva
GRS/UBERLÂNDIA/ VISA MUNICIPAL de Uberlândia – Marco Aurélio Ribeiro de Sá
GRS/SÃO JOÃO DEL REI/VISA MUNICIPAL de São João Del Rei – Flavio Raimundo Soares
GRS/SETE LAGOAS/VISA MUNICIPAL de Curvelo – Geraldo Moreira da Costa Filho
GRS/SETE LAGOAS/VISA MUNICIPAL de Paraopeba – Maria Aparecida Aguiar S. Nogueira
GRS/SETE LAGOAS/VISA MUNICIPAL de Sete Lagoas – Jorge Antônio Mansur Miranda

PARANÁ

EQUIPE ENVOLVIDA:

- Ana Maria Senff	SESA- LACEN- PR
- Carmen Lúcia Gomes Souza	SESA- LACEN- PR
- Fernanda Nogari	PMC – VISA
- Pedro Paulo Pedroso	SESA- VISA- PR
- Sonia Regina Wotkoski	SESA- LACEN- PR
- Wanda Moscalewski Abrahão	SESA- LACEN- PR

RIO DE JANEIRO

- Andréa Maria Bastos Germano
Responsável pelo PREBAF e colheitas no Estado do Rio de Janeiro

- Eliane Maria Cardoso
Representante das análises do Laboratório Noel Nutels

RIO GRANDE DO SUL

VIGILÂNCIA SANITÁRIA ESTADUAL /CEVS
INSTITUTO DE PESQUISAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO CENTRAL DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL – IPB-LACEN.
SEÇÃO DE MICROBIOLOGIA DE ÁGUAS E ALIMENTOS / DAP:

- Suzete Lobo Saar de Almeida
Responsável pelo setor de Alimentos



TÉCNICAS

- Carolina Alfama;
- Jane Mari Both;
- Laura V. Jacociunas;
- Mara L. T. Soeiro;
- Rosane C. Ramos;
- Simone Haas;
- Solange M. Longaray;
- Tatiana Tramontina

COLETA

- Maria da Graça A. da Cunha - 1ª CRS/DVS/SES.

SANTA CATARINA

VIGILÂNCIA SANITÁRIA ESTADUAL

João Carlos da Costa

LABORATÓRIO CENTRAL DO ESTADO DE SANTA CATARINA (LACEN)

BIOQUÍMICAS

- Cristina Matos Maia de Oliveira;
- Maria Aparecida Mendes de Souza;
- Rita de Cássia Gonçalves D'Ávila da Silva;
- Valkíria Nahas Ávila

TÉCNICAS

- Adriana Couto La Porta;
- Karoline da Silva Pereira.

Setores de Recepção e Cadastro de Amostras, Meios de Cultura e Reativos, Lavagem e Esterilização de Materiais.

SÃO PAULO - CAPITAL

DIVISÃO DE BROMATOLOGIA E QUÍMICA
DIRETORA DO SERVIÇO DE ALIMENTOS
Dra. Deise Ap. Pinatti Marsiglia

EQUIPE TÉCNICA DA SEÇÃO DE MICROBIOLOGIA ALIMENTAR - IAL SÃO PAULO – CAPITAL



COORDENADORA

Dra. Miyoko Jakabi

EQUIPE DE ANÁLISE

- Ana Maria Ramalho de Paula
- Christiane Asturiano Ristori Costa
- Giselle Ibetete S. Lopez Lopes
- Ruth Estela Gravato Rowlands
- Ana Luiza Gomes Nicoliello
- Andrey Guimarães Sacramento
- Marisa de Jesus de Castro Lima
- Luciana Soares Tegani
- Adriana Hitomi Watanabe

EQUIPE TÉCNICA DA SEÇÃO DE ÓLEOS, GORDURAS E CONDIMENTOS DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ RESPONSÁVEL PELA ANÁLISE DE ROTULAGEM

Jussara Carvalho de Moura Della Torre;
- Regina Sorrentino Minazzi Rodrigues.

Seção de Meios de Cultura do Instituto Adolfo Lutz
Secretaria do Serviço de Alimentos pelo escaneamento dos rótulos.

SÃO PAULO – RIBEIRÃO PRETO

VISA/DIR XVIII – RIBEIRÃO PRETO / SP –

- Omara Gemha Tara – Engenheira de Alimentos
IAL/RIBEIRÃO PRETO
- Alzira Maria Morato Bergamini – Pesquisador Científico II
IAL/RIBEIRÃO PRETO
- Eliana Guimarães Abeid Ribeiro – Pesquisador Científico II
IAL/RIBEIRÃO PRETO
- Maria Aparecida de Oliveira - Pesquisador Científico II
IAL/RIBEIRÃO PRETO
- Sonia de Paula Toledo Prado – Pesquisador Científico II
IAL/RIBEIRÃO PRETO

