

Isabela Pereira Lanza

Utilização de antimicrobianos em galinhas de postura e avaliação do perfil de resistência de micro-organismos isolados da casca dos ovos.

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal

Orientadora: Prof.^a Silvana de Vasconcelos Cançado

UFMG – Escola de Veterinária

Belo Horizonte

2016

L297u Lanza, Isabela Pereira, 1987-
Utilização de antimicrobianos em galinhas de postura e avaliação do perfil de resistência de micro-organismos isolados da casca dos ovos / Isabela Pereira Lanza. – 2016.
62 p. : il.

Orientadora: Silvana de Vasconcelos Caçado
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Ovos – Análise – Teses. 2. Antimicrobianos – Teses. 3. Salmonela – Teses.
4. Enterococcus – Teses. I. Caçado, Silvana de Vasconcelos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 637.5

FOLHA DE APROVAÇÃO

ISABELA PEREIRA LANZA

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração TECNOLOGIA E INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL.

Aprovada em 31 de Março de 2016, pela banca constituída pelos membros:


Prof.ª. Silvana de Vasconcelos Cançado
Presidente - Orientador


Dra. Liliâne Denise Miranda Menezes
Instituto Mineiro de Agropecuária - IMA


Prof.ª. Débora Cristina Sampaio de Assis
Escola de Veterinária - UFMG

Dedicatória:

À minha família, aos animais.

"A ciência opera na fronteira entre conhecimento e ignorância. Não temos medo de admitir o que não sabemos. Não há vergonha nisso. A única vergonha é achar que temos todas as respostas."

(Neil Degrasse Tyson)

AGRADECIMENTOS:

À Deus por me enxergar sempre melhor do que eu sou. O seu olhar sereno e amoroso foi a luz e a força que me guiaram, e ainda me conduzem, nesse caminho.

Aos meus pais Luiz e Virgínia, por toda dedicação, apoio e carinho.

Às minhas irmãs Mariana e Rafaela pela cumplicidade, pelo incentivo, pelas risadas e palavras amigas.

À professora Silvana pelos constantes ensinamentos, desde a graduação, pela confiança e pela maravilhosa oportunidade. Cada momento foi um grande aprendizado que levarei por toda a minha vida, tanto pessoal como profissional.

Aos queridos professores do DTIPOA, especialmente os professores Marcelo, Tadeu, Cláudia Penna e Débora que me inspiraram e auxiliaram, participando da minha formação, sempre com disponibilidade e paciência.

À Clarinha, Anna, Lu e Arina pelos ensinamentos, conselhos e pela amizade.

Aos amigos do “laboratório de leite”: Cosme, Givanildo, Gabriela, Letícia e Felipe por serem um exemplo de união, pelos bons conselhos e pelas risadas.

Aos meus amigos queridos; Guilherme Resende, pelo apoio imenso e constante durante toda a minha trajetória, Renata Dias de Castro, Ethiene Santos, Andréa Guicheney, Aila Solimar, Carlos Oliveira, Amanda Diniz, Hariany Seabra, Thiago Augusto, Samuel Dias, Baltazar Ruas, Karina Roque, Luiz Eduardo, Lívia Maria, Renata Stefani, Ludmila Barbi, Guilherme Picinin, Cynthia Santos e Amanda Gabrielle, pelo apoio constante e pelos momentos de descontração.

Aos professores, alunos e principalmente aos funcionários da Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa que nos acolheram e nos auxiliaram, especialmente Mailson e Izabel, permitindo a realização e o sucesso desse trabalho.

Aos funcionários e amigos do Instituto Mineiro de Agropecuária – IMA, principalmente: Erolnilda, Roger, Julieta, Carla e Graçinha pelos anos de convivência, além do apoio constante, que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

À Liliane Menezes pela amizade, pelo incentivo, pelos ensinamentos essenciais para a execução desse trabalho. Obrigada por despertar e aprimorar em mim o amor pela microbiologia e pela área de inspeção e tecnologia de Produtos de Origem Animal.

Aos estagiários e alunos de iniciação científica, especialmente à Viviane, companheiros de laboratório que contribuíram para o andamento e finalização deste e de muitos projetos.

À querida Escola de Veterinária da UFMG, que foi a grande responsável pela realização de muitos sonhos.

Ao Aquacen e sua equipe pela disponibilização do laboratório para realização das análises de proteômica

Às instituições de fomento CNPq e FAPEMIG, por viabilizar financeiramente a realização do experimento.

Sumário

Resumo.....	11
1 – Introdução:	13
2 – Objetivos:	14
3 – Revisão de literatura:	14
3.1 – Antimicrobianos:	15
3.1.1 – Classes de antimicrobianos:	16
3.1.2 – Legislação	22
3.2 – Contaminação microbiana dos ovos de consumo.....	24
3.2.1 - Salmonella spp.	25
3.2.2 – Enterococcus spp.....	28
3.3 – Resistência antimicrobiana	30
3.3.1 – Salmonella spp. e resistência aos antimicrobianos.....	31
3.3.2 – Enterococcus spp. e resistência bacteriana	32
3.3.3 – Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos por Disco-difusão	35
3.4 – Identificação e classificação de micro-organismos	36
3.6.1 – Proteômica: metodologias e aplicações.....	36
3.6.2 – Princípios básicos de espectrometria de massas	37
3.6.3 – MALDI-TOF no laboratório de microbiologia	38
4 – Material e métodos	40
4.1 – Obtenção das amostras.....	40
4.2- Tratamentos.....	40
4.3 - Análises microbiológicas:	41
4.4 - Execução de Testes de Disco-Difusão:	42
4.5 – Análise Proteômica.....	43
4.6 - Delineamento experimental:	44
5 – Resultados e Discussão.....	44
5.1 – Isolamento e contagem de Enterococcus spp. na casca dos ovos.....	44
5.2 – Perfil de resistência de Enterococcus spp.	46
5.3 - Isolamento e contagem de Salmonella spp.	50
6– Conclusões.....	54
7– Referências Bibliográficas	54

Lista de abreviaturas

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAC/RCP - Código de Práticas para Minimizar e Conter a Resistência Antimicrobiana
CCAB - Comitê do *Codex Alimentarius* do Brasil
CDC - Centers For Disease Control And Prevention
CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CGLAB/SVS/MS - Coordenação Geral dos Laboratórios de Saúde Pública
CIMs - Concentrações Inibitórias Mínimas
CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute
COMISA - Consultation Mondiale de Industrie de La Santé Animale
EM - Espectrometria de Massas
EMA - European Agency for the Evaluation of Medical Products
EV/UFGM - Escola de Veterinária da UFGM
FAO - Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação
FDA - Food and Drugs Administration
FEPHB - Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa
FT-ICR - Fourier-transform ion cyclotron resonance
IDA - ingestões diárias aceitáveis
IMA - Instituto Mineiro de Agropecuária
IT - íon-traps
LMR - limites máximos de resíduos
LSMA - Laboratório de Segurança Microbiológica de Alimentos
m/z - massa/carga
MALDI - Ionização/Dessorção à Laser Assistida por Matriz
MPA - Aquacen, Laboratório Oficial Central do Ministério da Pesca e Aquicultura
MS - Ministério da Saúde
NNISS - *National Nosocomial Infection Surveillance System*
OIE - Office Internacional des Epizooties
OMS - Organização Mundial da Saúde
OPAS - Organização Pan-Americana de Saúde
PAMvet-PR - Programa Estadual de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal
PCR - reação em cadeia da polimerase
PREBAF - Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango
Qs - analisadores destacam-se os quadrupolos
RM - Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde
SDA - Secretaria de Defesa Agropecuária
SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde
TOF - *Time Of Flight*
VRE - Enterococos resistentes à vancomicina

Lista de tabelas

Tabela 1. Parâmetros para perfil de resistência para o grupo de bactérias ácido-láticas de acordo com as classes de antimicrobianos	43
Tabela 2. Resultados (UFC/mL) das contagens de <i>Enterococcus</i> spp. isolados das amostras de lavado de casca de ovo	45

Lista de quadros

Quadro 1. Classificação dos antimicrobianos por sua estrutura química, ação biológica, espectro de ação e mecanismo de ação.	17
Quadro 2. – Micro-organismos isolados de amostras de lavado de casca de ovos provenientes da criação de aves realizada na FEPHB da EV/UFMG.	52

Lista de figuras

Figura 1. Estrutura básica das tetraciclinas	19
Figura 2. Estrutura da lincomicina	20
Figura 3. Estrutura base das quinolonas	21
Figura 4. Estrutura base das fluoroquinolonas	21
Figura 5. Estrutura da Neomicina	22
Figura 6. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight Process (Mayo Clinic, 2013).....	39
Figura 7. Aparelho Microflex TM MALDI-TOF -MS da Bruker Daltonics	43
Figura 8 - Crescimento de <i>Enterococcus</i> spp. em ágar Enterococcosel em diferentes diluições	45
Figura 9 - Prevalência de resistência antimicrobiana entre os isolados de <i>Enterococcus</i> spp. submetidos à diferentes dietas (tratamentos).	47
Figura 10 - Resistência antimicrobiana entre os isolados de <i>Enterococcus</i> spp. ao longo do experimento.	48

Resumo

Com o objetivo de avaliar a presença de *Salmonella* spp. e *Enterococcus* spp. nas cascas dos ovos de consumo provenientes de galinhas poedeiras tratadas com tetraciclinas (oxitetraciclina e doxiciclina), lincosamidas (lincomicina) e quinolonas (enrofloxacina) na ração, e avaliar o perfil de resistência desses micro-organismos, foram utilizadas 450 galinhas de postura da linhagem Hy-line. O período experimental total foi de 26 dias, incluindo o dia zero, quando a ração oferecida para todas as aves não continha nenhum medicamento, seguido de cinco dias de tratamento dos animais e mais 20 dias para avaliação do período de depleção. Os tratamentos, definidos de acordo com o medicamento administrado à ração das aves, foram os seguintes: grupo controle e grupos de galinhas tratadas com doxiciclina, lincomicina, oxitetraciclina e enrofloxacina. Para cada micro-organismo pesquisado, foram coletados seis repetições compostas por um *pool* de cinco ovos por tratamento nos dias zero, três, seis, 15 e 25. As colônias isoladas foram enviadas para análise de proteômica para a confirmação do gênero do micro-organismo, e a resistência bacteriana aos antimicrobianos foi verificada por meio do teste de disco-difusão utilizando os compostos das classes tetraciclinas (tetraciclina), lincosamidas (lincomicina), quinolonas (enrofloxacina) e aminoglicosídeos (neomicina). Os resultados da pesquisa de *Enterococcus* spp. demonstraram que este micro-organismo está presente em alta frequência na casca dos ovos, ao contrário de *Salmonella* spp. que não foi isolada de nenhuma amostra. Das 150 amostras analisadas, 97,3% apresentaram contagem para *Enterococcus* spp. e não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre os tratamentos. A avaliação do perfil de sensibilidade de *Enterococcus* spp. isolados da casca dos ovos, demonstrou a existência de resistência bacteriana às quatro classes de antimicrobianos testadas independentemente do tratamento das aves.

Palavras chave: Ovos, ovos de consumo, resistência bacteriana, antimicrobianos, Enterococcus, Salmonella

Abstract

To assess the presence of *Salmonella* spp. and *Enterococcus* spp. on eggshells, 450 laying hens Hy-line lineage were treated with tetracyclines (oxytetracycline and doxycycline), lincosamides (lincomycin) and quinolones (enrofloxacin) in the diet. The total period of the experiment was 26 days including the day zero, when the food offered to all chickens did not contain any drug, followed by five more days of treatment and 20 days to evaluate the depletion period. The treatments, defined according to the drug administered in the diet of birds, were the following: control group and groups of chickens treated with doxycycline, lincomycin, oxytetracycline and enrofloxacin. For each organism studied, six replications were collected composed of a *pool* of five eggs per treatment on the days zero, three, six, 15 and 25. The isolated colonies were sent to proteomic analysis to confirm the gender of the micro-organism, and the verification of bacterial resistance to antimicrobials was performed using Disk Diffusion Test with compounds of tetracyclines (tetracycline), lincosamides (lincomycin), quinolones (enrofloxacin) and aminoglycosides (neomycin). The results of the search for *Enterococcus* spp. demonstrated that this micro-organism is present in high frequency in the eggshell, unlike *Salmonella* spp. which was not isolated from any sample. Among the 150 samples analyzed, 97.3% had a count for *Enterococcus* spp. and no significant differences were observed ($p > 0.05$) between the treatments. The assessment of *Enterococcus* spp sensitivity profile, from the eggshells, has demonstrated the existence of bacterial resistance to the four classes of antimicrobials tested regardless of treatment of birds.

Keywords: Eggs, bacterial resistance, antimicrobial, *Enterococcus*, *Salmonella*.

1 – Introdução:

O ovo é um dos alimentos mais completos para a alimentação humana e apresenta uma composição rica em vitaminas, minerais, ácidos graxos e proteínas de excelente valor biológico, que reúnem vários aminoácidos essenciais. Sua crescente preferência e popularidade, estão associados ao fato deste ser um produto acessível à população, devido ao seu baixo custo, sendo um alimento importante na culinária brasileira (Lot et al., 2005).

A produção de ovos no Brasil em 2014 foi de 37,2 bilhões de unidades, o que representa um aumento de, aproximadamente, 9,09% em relação ao ano de 2013. O consumo per capita também teve um aumento, passando de 168 unidades/ano, em 2013, para 182 unidades/ano em 2014. Ainda que, comparativamente, a participação do Brasil como exportador mundial de ovos não seja tão expressiva, em 2014 foram exportadas 12,39 mil toneladas, e, deste volume total, 10,51% foram de produtos processados e 89,49% de ovos in natura. As principais regiões de destino do ovo brasileiro foram a África e o Oriente Médio. Os principais países compradores de ovo in natura foram Angola e Emirados Árabes Unidos. (ABPA, 2015).

A cadeia produtiva de ovos no Brasil se caracteriza pela produção para consumo, de ovos “*in natura*” ou industrializados com alta tecnologia, por poedeiras comerciais criadas em gaiolas e por produtores independentes, de pequeno e médio porte, que preparam a própria ração na propriedade e trabalham com galpões abertos, tradicionais. Existem, também, grandes produtores que estão partindo para a adequação climática e automação das instalações

A avicultura brasileira passou por profundas transformações, especialmente nos últimos 30 anos, colocando o país em posição de destaque no ranking mundial de exportações de carnes de aves e ovos. Esta posição de destaque é resultado de uma trajetória de incrementos tecnológicos e capacidade de coordenação entre os diferentes agentes que compõem a cadeia de produção nacional, destacando-se a seleção genética e o manejo das aves.

A busca pela máxima eficiência produtiva leva a uma contínua agregação de novas tecnologias. No setor avícola, esse progresso, no entanto, não ocorreu de forma aleatória. De fato, foram os esforços empreendidos na área da saúde animal que possibilitaram a intensificação da produção; em especial, do conhecimento das diferentes patologias que acometem os animais de criação e dos procedimentos técnicos para preveni-las e curá-las. Tais características fizeram com que a avicultura, atualmente, possua um dos melhores índices de produtividade entre os diversos segmentos da pecuária.

Nesse sentido, a utilização de antibióticos e quimioterápicos tornou-se um importante instrumento, principalmente quando utilizado para assegurar e incrementar a eficiência produtiva como promotores de crescimento e, também, para controlar ou tratar doenças. Destaca-se, ainda,

a relevância do uso desses medicamentos na manutenção dos padrões sanitários e de bem-estar dos animais, meta importante na produção (Borsoi, 2015).

A terapia antimicrobiana, ainda que não seja recomendada na maioria das infecções, se faz, na prática, muitas vezes de modo indiscriminado, resultando no aumento de cepas resistentes podendo representar um grave problema, especialmente nos países emergentes. Os principais aspectos que caracterizam essa preocupação dizem respeito à presença de resíduos dos antimicrobianos nos produtos de origem animal, uma vez que estas substâncias químicas, ao serem absorvidas, podem se distribuir por todo o organismo dos animais tratados, inclusive, no caso das aves, no ovário e no oviduto (Borsoi, 2015). Ainda que o fenômeno de resistência seja inegável, não existe, até o presente momento, um modelo de análise de risco proposto para o estudo da resistência bacteriana a nível de campo, isto é, que avalie a real contribuição do uso de antimicrobianos em animais de produção para a magnitude do problema.

Nesse contexto a OIE, em 2013, realizou uma conferência global sobre o uso responsável e prudente de agentes antimicrobianos. Nesse evento, ainda, foi ressaltado o trabalho com a interface animal-humano-ecossistema e destacado o conceito de “Uma Saúde”, uma vez que humanos e animais compartilham as mesmas bactérias e que 60% das bactérias patogênicas para humanos são de origem animal (Camargo, 2013; JOINT FAO/WHO/OIE, 2007).

Assim torna-se relevante a compreensão do risco que estes compostos podem oferecer à saúde do consumidor, considerando o potencial toxicológico e, principalmente, a contribuição dessas substâncias químicas para um aumento na incidência e na prevalência da resistência bacteriana aos antimicrobianos, além de uma possível transferência destas características para outras bactérias susceptíveis, causando risco à Saúde Pública.

2 – Objetivos:

Realizar a pesquisa de *Salmonella* spp. e *Enterococcus* spp. nas cascas dos ovos de consumo provenientes de galinhas tratadas com tetraciclina (oxitetraciclina e doxiciclina), lincosamidas (lincomicina) e quinolonas (enrofloxacina), na ração, e avaliar o perfil de resistência desses micro-organismos.

3 – Revisão de literatura:

Nos sistemas de produção usados no país, o convívio entre animais, de mesma linhagem e idade, nas mesmas condições nutricionais e de higiene, possibilita o aparecimento de doenças que podem não se restringir a um único indivíduo, mas sim a toda àquela população animal. Esse fato tem graves consequências sobre o manejo, a sanidade, a rentabilidade do agronegócio e, principalmente, sobre a qualidade do alimento produzido. Nesse contexto, com o risco de

aparecimento de alguma enfermidade, a utilização de antimicrobianos em aves de postura pode se tornar necessária. (Palermo-Neto, 2005; Spinosa et al., 2005).

3.1 – Antimicrobianos:

Antimicrobianos são compostos naturais ou sintéticos, capazes de eliminar ou inibir o crescimento de micro-organismos, sendo classificados, conforme sua ação biológica, em bactericidas ou bacteriostáticos, respectivamente. O termo antibiótico origina-se do grego “*anti*” (contra) e “*bio*” (vida) e, inicialmente, foi empregado para definir as substâncias químicas produzidas por micro-organismos que possuíam a capacidade de, em pequenas doses, inibir o crescimento ou eliminar outros micro-organismos. Posteriormente, esse conceito foi ampliado com o advento da obtenção de medicamentos por síntese laboratorial. Essa obtenção sintética pode ser tanto parcial (semisintéticos ou biossintéticos) como total (sintobióticos). Assim, o termo quimioterápico passa a referir-se à substância química produzida por síntese laboratorial que, introduzida no organismo animal age de maneira seletiva sobre o agente causador do processo infeccioso. (Walsh, 2003; Palermo-Neto et al., 2005).

Segundo Doyle (2006) desde a descoberta e desenvolvimento dos primeiros antibióticos, no final da década de 1920 e durante a Segunda Guerra Mundial, essas substâncias passaram a desempenhar um importante papel tanto na Medicina Veterinária como na Humana. Conseqüentemente, houve um aumento do uso dessas substâncias químicas na medicina veterinária, principalmente a partir da década de 50, como componente da modernização da produção animal (Bondi et al., 2009).

Em medicina veterinária, os antibióticos são aplicados em animais de produção na forma de agentes terapêuticos, profiláticos ou como aditivos químicos, que funcionam como promotores de crescimento. As condições de confinamento e as situações de estresse, às quais os animais de produção são normalmente submetidos, favorecem o aparecimento de infecções por bactérias, fatores estes que justificam o uso desses medicamentos no tratamento/profilaxia destes animais. Aliado a este fato, a redução no custo dos antimicrobianos tornou compensatório o tratamento dos animais em massa (Gustafson et al., 1997; Doyle, 2006, Camargo, 2013).

A escolha e o uso de antimicrobianos em animais de produção envolve conhecimentos do agente etiológico que está causando a doença (identificação baseando-se nos achados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais), do quimioterápico/antibiótico a ser utilizado (conhecimento de suas propriedades e ações) e das condições do animal. Cada um desses componentes deve ser cuidadosamente analisado, uma vez que os mecanismos de ação dos antimicrobianos são complexos e atuam de diferentes maneiras, melhorando o desempenho dos animais através de efeito direto sobre o metabolismo no organismo, atuando na síntese de vitaminas e aminoácidos ou, ainda, inibindo o crescimento de bactérias indesejáveis (Bellaver, 2000; Albuquerque, 2005).

Segundo a Concerning The Performance Of Analytical Methods And The Interpretation Of Results (2002), os antimicrobianos podem ser classificados em dois grandes grupos:

- I. Grupo A - correspondente às drogas de uso proibido (como os cloranfenicóis e os nitrofuranos).
- II. Grupo B - correspondente às drogas de uso permitido (tetraciclinas, macrolídeos, aminoglicosídeos, anfenicóis, quinolonas/fluoroquinolonas, sulfonamidas, lincosamidas, glicopeptídeos e ionóforos) (EEC, 1990).

Apesar do grande número e da diversidade dos grupos, alguns antimicrobianos por motivos de mecanismo de ação e custo, podem ser mais utilizados que outros.

3.1.1 – Classes de antimicrobianos:

A classificação dos antimicrobianos se dá por sua estrutura química, ação biológica, espectro de ação e mecanismo de ação (Quadro 1). A estrutura química e o mecanismo de ação são critérios empregados para apresentar os diferentes grupos farmacológicos dos antibacterianos usados em medicina veterinária, sendo a classificação pelo mecanismo de ação a de maior interesse na prática (Spinosa et al., 2005).

Segundo Bondi et. al. (2009), os principais antimicrobianos usados em medicina humana e veterinária encontram-se divididos nas seguintes classes: beta-lactâmicos, tetraciclinas, macrolídeos, aminoglicosídeos, anfenicóis, quinolonas/fluoroquinolonas, sulfonamidas, lincosamidas, glicopeptídeos e ionóforos.

No entanto, no contexto da avicultura, poucos medicamentos têm sido formulados especificamente para galinhas poedeiras, embora vários deles tenham sido aprovados para outras classes de aves de produção (Borsoi, 2015).

Em 2004, no Estado do Paraná, foi realizado um levantamento de dados pelo Programa Estadual de Controle de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal - PAMvet-PR, tendo por objetivo conhecer os medicamentos mais frequentemente administrados na avicultura de postura local. Para finalidade terapêutica, o trabalho citou os seguintes antimicrobianos: enrofloxacina, oxitetraciclina, norfloxacina, doxicilina, sulfaquinoxalina, bacitracina de zinco, amoxicilina, apramicina, ciprofloxacina e a associação de doxiciclina e gentamicina. Foram mencionados, ainda, os antimicrobianos usados na fase de produção: oxitetraciclina, enrofloxacina, norfloxacina, sulfaquinoxalina, doxicilina, bacitracina de zinco e ciprofloxacina. Este trabalho tornou-se uma importante referência nacional, por ter sido um dos pioneiros no mapeamento da preferência do uso desses medicamentos na avicultura de postura, entre os produtores brasileiros (PAM vet. /PR, 2005).

Quadro 1. Classificação dos antimicrobianos por sua estrutura química, ação biológica, espectro de ação e mecanismo de ação.

Classificações	Antimicrobianos
<u>Estrutura química:</u>	
- Derivados de aminoácidos	Penicilinas**, cefalosporinas**, bacitracina, vancomicina, polimixinas
- Derivados de açúcares	Aminoglicosídeos, macrolídeos, lincosamidas
- Derivados do acetato e propionato	Rifamicinas, anfotericina B, nistatina, tetraciclina**
- Outros	Fosfomicina
<u>Origem:</u>	
- Produzidos por bactérias	Bacitracina, polimixinas
- Produzidos por ascomicetos	Penicilinas**, cefalosporinas**
- Produzidos por actinomicetos	Aminoglicosídeos, fosfomicina, lincosamidas, macrolídeos, cloranfenicol*
- Produzidos por síntese total ou parcial	Cloranfenicol*, fosfomicina, penicilinas**, semissintéticas (ampicilina, amoxicilina) **
<u>Ação biológica:</u>	
- Bactericida	Penicilinas**, aminoglicosídeos
- Bacteriostático	Tetraciclina**, lincosamidas, macrolídeos
- Fungicida	Anfotericina B, nistatina
- Fungistático	Griseofulvina
<u>Espectro de ação:</u>	
- Ativos sobre bactérias gram-positivas	Penicilinas naturais**, macrolídeos, bacitracina
- Ativos sobre bactérias gram-negativas	Aminoglicosídeos, polimixinas
- Ampla espectro	Tetraciclina**, cloranfenicol*, rifampicina, ampicilina (penicilina semi-sintética)
- Ativos sobre micobactérias	Aminoglicosídeos, rifampicina
- Ativos sobre rickettsias, micoplasma e clamídias	Tetraciclina, cloranfenicol*, macrolídeos
- Ativos sobre fungos	Nistatina, anfotericina B, Griseofulvina
<u>Mecanismo de ação:</u>	
- Parede celular	Penicilinas**, cefalosporinas**, fosfomicina, Bacitracina, vancomicina
- Membrana celular	Polimixinas, anfotericina B
- Síntese de ácidos nucleicos	Novobiocina, rifamicinas, Griseofulvina
- Síntese proteica	Aminoglicosídeos (formação de proteínas defeituosas), macrolídeos, lincosamidas, tetraciclina**, cloranfenicol* (perturbação da tradução da informação genética)

Fonte: Adaptado de Spinosa et al., 2005.

Nota: * Uso proibido na terapêutica em animais produtores de alimentos (Brasil, IN 9/2003).

** Uso proibido como aditivos zootécnicos melhoradores de desempenho ou como conservantes de alimentos para animais (Brasil, IN 26/2009).

No presente experimento, foram utilizadas as seguintes classes de antimicrobianos:

a) Tetraciclinas

As tetraciclinas compreendem um grupo de antibióticos usados terapêutica e profilaticamente em animais de produção. Originalmente, estes compostos foram isolados de culturas de *Streptomyces* spp., no entanto, alguns são semissintéticos. As tetraciclinas são moléculas orgânicas cuja estrutura básica consiste de um hidronaftaceno com quatro anéis fundidos (Fig.1). Elas são anfóteras, solúveis em soluções ácidas, básicas e solventes orgânicos polares, particularmente álcoois, mas insolúveis em hidrocarbonetos saturados. Quando submetidas a condições extremas de acidez e alcalinidade, degradam formando epímeros reversíveis (4-epi-tetraciclina, anidro-tetraciclina e iso-tetraciclina). Porém, ao contrário das tetraciclinas, os epímeros não apresentam atividade antimicrobiana (Blanchflower et al., 1997; Palermo-Neto, 2005; Posyniak et al., 2008; Kinsella et al., 2009).

As tetraciclinas têm efeito bacteriostático, por meio da inibição da síntese proteica dos micro-organismos sensíveis, possuindo amplo espectro de ação contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, incluindo micoplasma, bactérias intracelulares como clamídias e riquetsias e, até mesmo, alguns protozoários. Além de seu uso no tratamento de infecções, principalmente respiratórias e gastrointestinais, as tetraciclinas também são utilizadas como aditivo alimentar para aves e suínos (Blanchflower et al., 1997; Santos et al., 2001; Palermo-Neto, 2005; Spinosa et al. 2011; Tortora et al., 2012).

Os medicamentos do grupo podem ser administrados por via oral, sendo muito bem absorvidos. No entanto a presença de alimento pode prejudicar a absorção, devido à formação de quelatos, quando na presença de cátions polivalentes (Ca^{+2} , Mg^{+2} , Fe^{+2} , Al^{+3}). A absorção e distribuição das tetraciclinas podem variar com a lipossolubilidade das diferentes tetraciclinas. A oxitetraciclina é a menos lipofílica do grupo e, portanto, a que possui menor taxa de absorção após administração via oral. Já a doxiciclina, antimicrobiano sintético derivado da oxitetraciclina, é a mais lipofílica das tetraciclinas (5 a 10 vezes mais), atingindo uma biodisponibilidade elevada de 90 a 100% (Ito et al., 2005; Spinosa, 2011).

Uma vez absorvidas, as tetraciclinas são distribuídas pelo organismo e se concentram no fígado e nos rins. Nas aves, são também depositadas nos ovos sendo detectadas primeiramente na clara, logo após a administração, e em altos níveis de concentração na gema, persistindo por vários dias. A deposição da doxiciclina em ovos atinge níveis bem mais altos que os atingidos pela tetraciclina e esta, por sua vez, atinge níveis de concentração mais altos que a oxitetraciclina, quando utilizadas na mesma dosagem e via de administração (Omija et al., 1994; Zurhelle et al., 2000; Khardori, 2006).

A aplicação destes fármacos em animais de produção é permitida na maioria dos países desde que sejam respeitadas as dosagens para estas drogas. O baixo custo, a toxicidade reduzida e as excelentes propriedades farmacocinéticas da doxiciclina, tornam esse agente uma excelente escolha entre as tetraciclina. (Omija et al., 1994; Zurhelle et al., 2000; Khardori, 2006; Goetting et al., 2011).

É importante ressaltar que, apesar das vantagens mencionadas, a doxiciclina apresenta toxicidade para poedeiras, não sendo indicada a sua posologia. Em 22 de dezembro de 2009 a Comissão Europeia instituiu o Regulamento (CEE) n° 37/2010 que estabelece LMRs para substancias farmacologicamente ativas em produtos de origem animal, principalmente ovos, e recomenda a não utilização dessas substâncias, dentre elas a Doxiciclina em nenhuma quantidade, em animais produtores de ovos para o consumo humano, como as galinhas poedeiras. A utilização desse antimicrobiano no presente trabalho foi para fins acadêmicos, baseando-se nas atividades descritas por Caldeira (2012).

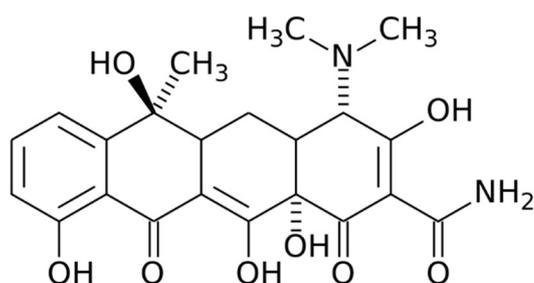


Figura 1. Estrutura básica das tetraciclina

b) *Macrolídeos e Lincosamidas*

Apesar de distintos no ponto de vista estrutural, os macrolídeos e as lincosamidas são antibióticos que compartilham características químicas, antimicrobianas e farmacológicas e, portanto, são normalmente descritos de forma conjunta. São agentes bacteriostáticos ou bactericidas, variando conforme a sua concentração, cujo mecanismo de ação envolve a inibição da síntese proteica. São ativos principalmente contra bactérias Gram-positivas aeróbias e anaeróbias e micoplasmas, tendo efeito variável para as Gram-negativas. São usados na prevenção e no tratamento de doenças respiratórias, enterite bacteriana e como promotores de crescimento em frangos, quando incorporados em níveis subterapêuticos na ração (Spisso, 2010).

Os macrolídeos, em sua maioria, são produzidos pelo fungo *Streptomyces* spp. e são compostos ativos, principalmente, contra bactérias Gram-positivas, sendo utilizados no controle e tratamento de doenças específicas de aves como as micoplasmoses, clostridioses, estafilococoses, estreptococoses. Para uso no Brasil estão comercialmente disponíveis a tilosina, espiramicina, eritromicina e tilmicosina (Ito et al., 2005; Spinosa et al., 2011).

As lincosamidas, que são um grupo de antibióticos monoglicosídeos e possuem uma cadeia lateral semelhante à de um aminoácido (Fig. 2), apresentam um espectro antimicrobiano moderado, atuando principalmente contra bactérias Gram-positivas, aeróbios e anaeróbios e algumas bactérias Gram-negativas. Têm como principais representantes a lincomicina e a clindamicina. A lincomicina quando associada com a espectinomicina (um aminoglicosídeo) é comercializada para uso oral em galinhas para o controle da aerossaculite e Doença Crônica Respiratória (Spisso, 2010).

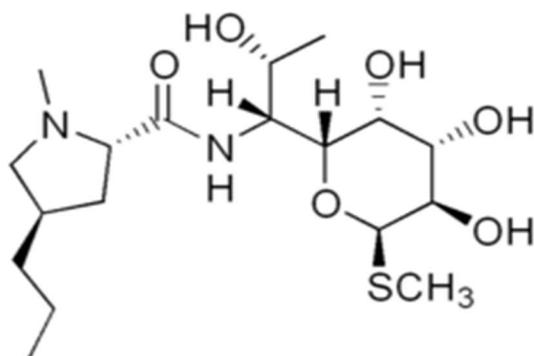


Figura 2. Estrutura da lincomicina

c) *Quinolonas/fluoroquinolonas*

As quinolonas e fluoroquinolonas são antimicrobianos sintéticos, bactericidas, que inibem a replicação da DNA girase bacteriana, impedindo a realização do super-enovelamento do DNA, necessário para o empacotamento da célula bacteriana (Madigan et al., 2004).

No início da década de 1960, o fármaco ácido nalidíxico foi desenvolvido, sendo o primeiro antimicrobiano do grupo das quinolonas, considerado como a primeira geração de quinolona sintética e como “quinolona protótipo”. Embora tenha sido limitada, a manipulação do ácido nalidíxico levou ao desenvolvimento, na década de 1980, de um grupo cujo espectro de atividade tornou-se progressivamente mais amplo: as fluoroquinolonas (Madigan et al., 2004; Khadori, 2006; Tortora et al., 2012).

As fluoroquinolonas possuem flúor na posição “6” da cadeia carbônica, cetona na posição “4” e carboxil na posição “3”, conferindo maior atividade antimicrobiana (Fig. 3 e 4). Este aumento da atividade é atribuído à maior capacidade de penetração do quimioterápico através da membrana celular da bactéria. Esse grupo de antimicrobianos é amplamente empregado na indústria avícola, como forma de prevenção de doenças respiratórias e tratamento de infecções nos tratos respiratório, gastrointestinal e urinário (Madigan et al., 2004; Paturkar et al., 2005).

Em vários países, as quinolonas são extensivamente utilizadas no tratamento de lotes de aves infectadas pela *Salmonella* Enteritidis. Esta prática tem sido facilitada por legislações de

prescrição muito flexível, pelo aparecimento dos genéricos, para uso em ração e água devido à sua eficácia e ao seu custo muito mais baixo (Caldeira, 2012).

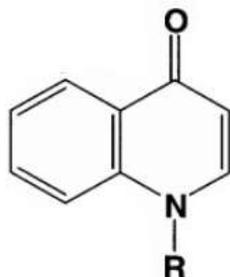


Figura 3. Estrutura base das quinolonas

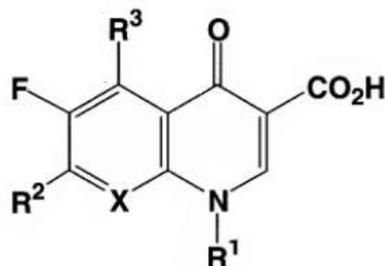


Figura 4. Estrutura base das fluoroquinolonas

d) *Aminoglicosídeos*

Os aminoglicosídeos são antimicrobianos bactericidas, inibidores da síntese proteica e amplamente utilizados contra bactérias Gram-negativas, principalmente as da família Enterobacteriaceae, e as dos gêneros *Pseudomonas* spp. e *Serratia* spp. Porém, estes compostos têm ação limitada e variável contra bactérias Gram-positivas e micoplasmas. Os aminoglicosídeos são compostos de um grupo amino básico e uma unidade de açúcar ou grupo glicosídeo e apresentam melhor atividade em pH levemente alcalino (em torno de 7,4). A maioria dos compostos desse grupo é produzida pelos micro-organismos *Streptomyces* spp., *Micromonospora* sp., e *Bacillus* sp. e destacam-se, como representantes desse grupo a neomicina, a gentamicina, a tobramicina, a amicacina e a estreptomicina (Palermo-Neto et al., 2005; Spinosa, et al., 2011).

São moléculas solúveis em água sendo altamente ionizáveis em pH fisiológico por serem polications básicos. Sua estrutura química está relacionada com a atividade microbiana, com a resistência bacteriana e com a capacidade de produzir efeitos tóxicos. Por se ligarem especificamente à subunidade 30S dos ribossomos bacterianos, impedem o movimento do ribossomo ao longo do RNA mensageiro e, conseqüentemente, interrompem a síntese de proteínas ou levam à incorporação de aminoácidos incorretos na cadeia polipeptídica que está sendo formada, dando origem a proteínas defeituosas (Ito et al., 2005; Guimarães et al., 2010; Górnaiak, 2011),

Como agentes antimicrobianos, os aminoglicosídeos tem ação rápida, são dose-dependentes e podem ter efeito residual após a interrupção de seu uso. Na avicultura, é comum o uso desses antimicrobianos sendo os mais utilizados a neomicina, apramicina, gentamicina e espectinomicina, podendo ser associados à lincomicina, com o objetivo de tratar infecções mistas

e obter maior efeito terapêutico, sendo seu uso recomendado nas formas de pó solúvel, suspensão oral ou injetável, ou como na forma de pré-mix na ração (Ito et al., 2005; Spinosa et al., 2011).

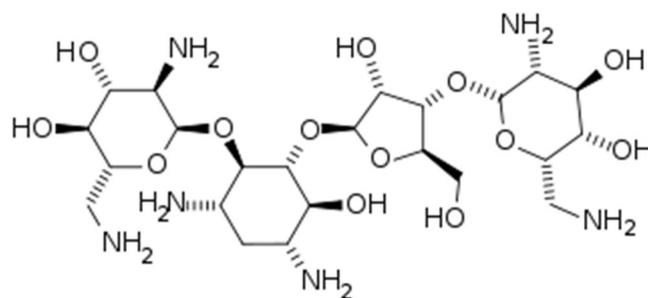


Figura 5. Estrutura da Neomicina

3.1.2 – Legislação

O uso indiscriminado de medicamentos veterinários em animais de produção levou ao desenvolvimento de regulamentações sobre a presença de seus resíduos nos produtos de origem animal. Estas regulamentações, que foram desenvolvidas no âmbito nacional e internacional, visam harmonizar os valores de limites máximos de resíduos (LMR) permitidos para as diferentes combinações de fármacos e matrizes e estudar os potenciais efeitos que essas substâncias podem causar no consumidor. Um exemplo destes efeitos é a possibilidade do uso de determinado antimicrobiano contribuir para a disseminação da resistência microbiana. Tais conhecimentos tornam-se bastante relevantes no que diz respeito à saúde pública e as relações internacionais de comércio (Hoff, 2008; Prebaf, 2012).

Existem diversas organizações envolvidas no desenvolvimento de mecanismos de controle da utilização de medicamentos veterinários na produção animal. Esses mecanismos incluem controle da distribuição e o uso em animais, a determinação de níveis seguros de resíduos nos alimentos de origem animal, as metodologias empregadas para detecção e quantificação de resíduos e as pesquisas sobre resistência a antimicrobianos. Entretanto, as legislações podem diferir consideravelmente entre os países, especialmente em regiões em desenvolvimento, quando, em muitos casos, órgãos reguladores ainda estão sendo criados e desenvolvidos (Spinosa et al., 2011).

Com a finalidade de proteger a saúde da população e assegurar práticas equitativas no comércio regional e internacional de alimentos, foi criado, em 1963, o *Codex Alimentarius*, um programa conjunto da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) e da Organização Mundial da Saúde (OMS), que trata da normalização sobre alimentos. O *Codex* é responsável pela análise crítica da literatura existente sobre a toxicidade de cada antimicrobiano usado como medicamento veterinário, fixando as ingestões diárias aceitáveis (IDA) e os respectivos LMR's (Codex Alimentarius, 1994; Paschoal et al., 2008; Palermo-Neto et al., 2011).

Na década de 70, o Brasil tornou-se membro deste programa e em 1980 foi criado o Comitê do *Codex Alimentarius* do Brasil (CCAB), por meio das Resoluções 01/80 e 07/88 do Conselho Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (CONMETRO). O CCAB tem como principais finalidades a participação, em representação do país, nos Comitês internacionais do *Codex Alimentarius* e a defesa dos interesses nacionais, bem como a utilização das Normas *Codex* como referência para a elaboração e atualização da legislação e regulamentação nacional de alimentos.

Outros órgãos internacionais, como a Agência Europeia para a Avaliação de Medicamentos (European Agency for the Evaluation of Medical Products - EMEA), a Organização Internacional de Epizootias (Office Internacional des Epizooties - OIE) e o Conselho Mundial da Indústria de Saúde Animal (Consultation Mondiale de Industrie de La Santé Animale - COMISA) também recomendam um controle sobre a utilização de antimicrobianos em alimentos. Além desses, alguns países têm grupos de especialistas envolvidos com o assunto, como o Food and Drugs Administration (FDA), nos Estados Unidos, o Bureau of Veterinary Drugs, no Canadá, e o Veterinary Products Committee of the Ministry of Agriculture, Fisheries and Foods, na Inglaterra.

A comissão do *Codex Alimentarius* tem encorajado os países membros a desenvolverem programas de vigilância e controle, 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 um “Código de Práticas para Minimizar e Conter a Resistência Antimicrobiana” (CAC/RCP 61-2005), alertando para as responsabilidades específicas que têm a indústria farmacêutica, produtores, distribuidores, autoridades regulatórias e profissionais que atuam como responsáveis técnicos (Prebaf, 2012; Campos et al. 2013).

Ainda em 2005 especialistas da FAO, em reunião conjunta com membros da OIE e OMS, identificaram os seguintes antimicrobianos criticamente importantes para uso humano e em saúde animal, para os quais deveriam ser priorizadas as medidas de análise de risco com relação à questão de transmissão de resistência: as cefalosporinas de 3^o e 4^o gerações, os macrolídeos e as quinolonas (incluindo as fluoroquinolonas). Finalmente, frangos de corte e suínos foram tomados como espécies de animais de produção prioritárias para estudos relacionados a questão de risco de transmissão de resistência entre animais e humanos (JOINT FAO/WHO/OIE, 2007; Camargo 2013).

O uso de antibióticos em animais produtores de alimentos sempre foi e sempre será passível de discussão entre produtores, consumidores, autoridades e a comunidade científica. Diante dessas preocupações e as principais questões que a cercam (relacionados ao risco de toxicidade e

resistência bacteriana para saúde humana), todos os antibióticos promotores de crescimento foram proibidos na Suécia em 1986 e na Dinamarca em 1998 (Prebaf, 2012).

A União Europeia iniciou a proibição do uso de antibióticos em 1997 e com o Regulamento CE 1831/2003 (European Commission, 2003) proibiu o uso de todos os antibióticos, com exceção dos coccidiostáticos, como aditivos para alimentação animal e promotores de crescimento a partir de 01 de janeiro de 2006. Essa proibição tem restringido a importação dos produtos originados destes animais e influencia a opinião de importantes importadores como os blocos asiáticos e o Oriente Médio. Promotores de crescimento antimicrobianos continuam autorizados nos Estados Unidos sob regulamentação e controle do FDA (Companyó et al., 2009; Santana et al., 2011).

No Brasil, todo e qualquer medicamento a ser utilizado em terapêutica humana e animal é regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde (MS). Além disso, entre o período de 2004 a 2006, implementou-se o Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (PREBAF), tendo por foco a determinação da prevalência e quantificação das espécies do gênero *Salmonella* spp. e *Enterococcus* spp. em carne de frango exposta ao consumo humano, bem como a verificação do cumprimento das disposições constantes da Resolução - RDC Anvisa nº 13/01. Este programa foi desenvolvido em 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 (Prebaf, 2012).

Em 2006, entrou em funcionamento no Brasil a Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (RM) vinculada à ANVISA em parceria com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) e com a Coordenação Geral dos Laboratórios de Saúde Pública (CGLAB/SVS/MS) com o objetivo de tornar a assistência à saúde mais efetiva por meio do uso adequado de antimicrobianos e da detecção, prevenção e controle da emergência de resistência microbiana em serviços de saúde no país (ANVISA, 2006).

No Brasil, empregam-se 17 antimicrobianos como aditivos e existem aproximadamente 70 liberados para uso terapêutico, metafilático ou profilático. Segundo a Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA), os antimicrobianos autorizados para uso exclusivo em rações para galinhas poedeiras são bacitracina de zinco e bacitracina de metileno dissalicilato, sulfato de colistina, cloridrato de clorexidina, enramicina, halquinol (clorohidroxiquinolina) e fosfato ou tartarato de tilosina. Contudo, não há, para nenhuma dessas substâncias, exigência quanto ao período de carência para liberação do produto para consumo (Brasil, 2009).

3.2 – Contaminação microbiana dos ovos de consumo

Sabe-se que os alimentos podem veicular um grande número de micro-organismos. De modo geral, doenças infecciosas de origem alimentar ocorrem quando bactérias patogênicas,

presentes nesses alimentos, são ingeridas e conseguem superar as diversas barreiras orgânicas que dificultam a sua instalação. Barreiras estas representadas, entre outras, pelo pH e enzimas gástricas, muco, microbiota normal e ação do sistema imune (Oliveira, 2012).

A contaminação microbiana dos ovos pode ocorrer por transmissão vertical, durante a formação do ovo ainda no ovário e oviduto, ou por transmissão horizontal, no momento ou após a postura, por meio do contato com o conteúdo intestinal e com o ambiente, favorecendo a deposição e a subsequente penetração do micro-organismo através das estruturas da casca. Alguns estudos microbiológicos revelam que a microbiota do oviduto de aves saudáveis difere daquela encontrada em ovos comercializados, indicando que a contaminação dos ovos ocorre, preferencialmente, após postura, para a maioria dos micro-organismos (Board et al., 1994; Sesti et al., 2000; Téó, 2005).

O consumo de ovos ou produtos derivados contaminados por *Salmonella* spp., ou por outros patógenos entéricos, carrega potencial para desencadear infecções na população em geral e para aumentar a suscetibilidade de idosos, crianças e indivíduos imunocomprometidos às doenças. Alguns fatores intensificam este risco, tais como o armazenamento de ovos sob temperatura ambiente, a possibilidade de disseminação de cepas bacterianas resistentes pelo emprego de fármacos na produção animal, além da desinformação do consumidor, em termos de armazenamento e técnicas seguras de preparo dos alimentos (Téó, 2005; CAC/RPC, 2007).

A este respeito, *Salmonella* spp. juntamente com *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp. e *Enterococcus* spp. foram consideradas bactérias criticamente relevantes para as análises de risco de resistência antimicrobiana (JOINT FAO/WHO/OIE, 2007; Borsoi, 2015).

3.2.1 - *Salmonella* spp.

Salmonella é um micro-organismo pertencente à família Enterobacteriaceae. São bacilos Gram negativos, pequenos, anaeróbios facultativos, mesófilos, com temperatura ótima de crescimento entre 35°C a 37°C. São relativamente resistentes ao calor e substâncias químicas, porém não sobrevivem à temperatura de 55°C por uma hora ou em 60°C por 15 a 20 minutos. Produzem ácido e gás a partir da glicose e outros carboidratos e, geralmente, não utilizam lactose e sacarose. Assim como outras bactérias patogênicas, as salmonelas possuem fimbrias, que consistem em apêndices de membrana mais curtos que os flagelos. A principal função das fimbrias é superar a barreira de repulsão eletrostática inicial que existe entre uma célula e o substrato (Corpe, 1980; Jay, 2005).

O gênero *Salmonella* pode ser dividido em duas espécies distintas, *S. enterica* e *S. bongori*, sendo as salmonelas entéricas subdivididas em seis subespécies onde encontram-se cerca de 99,5% dos sorovares mais frequentemente isolados. As salmonelas também podem ser divididas de acordo com a especificidade do hospedeiro e características clínicas da infecção, podendo-se

considerar, então, três categorias: *Salmonella* spp. altamente adaptadas ao homem (incluindo os sorotipos Typhi e Paratyphi A, B, C, agentes da febre tifoide e paratifoide, respectivamente), *Salmonella* spp. adaptadas aos animais (sorotipos Dublin, Cholerasuis, Pullorum e Gallinarum) e *Salmonella* spp. zoonóticas, que atingem indiscriminadamente tanto homens como animais, sendo responsável por gastroenterite e patógenos veiculados por alimentos (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Senftenberg* e *S. Hadar*) (Lax et al., 1995; Guibourdenche, 2010).

Salmonelas resistem meses no ambiente, mas são sensíveis à luz solar e aos desinfetantes mais usados, tais como fenóis, clorados e iodados. São bactérias móveis, excetuando-se Salmonelas específicas das aves (*S. Pullorum*, causadora da pulorose e *S. Gallinarum*, causadora do tifo aviário) (Oliveira, 1995).

A relativa resistência que a salmonela apresenta à dessecação, congelamento, salmoura e defumação, explica porque este micro-organismo sobrevive em muitas classes de alimentos, representando um risco potencial para o consumidor. Portanto, sendo a principal via de transmissão a cadeia alimentar, a presença de *Salmonella* spp. em animais, criados com objetivo comercial, aponta este micro-organismo como o mais incidente e relevante agente etiológico de enteroinfecções (Humphrey, 2000; Jay, 2005).

A infecção humana por *Salmonella* spp., em alguns casos, pode ser severa e fatal, porém, a maior parte das infecções resulta em gastroenterite não complicada, podendo a terapia com antimicrobianos prolongar o estado de portador e resultar em resistência antimicrobiana no indivíduo tratado. A virulência da Salmonela é multifatorial, incluindo mobilidade, habilidade de penetrar e replicar nas células epiteliais, resistência à ação do complemento, produção de entero, cito e endotoxinas, sendo desconhecido o exato papel de cada um, para a manifestação da doença (Angulo et al., 1999; Libby et al. 2000; Oliveira et al. 2000).

Nas aves, a capacidade de transmissão transovariana e horizontal da Salmonela para ovos resultou em ampla disseminação e persistência desses micro-organismos na indústria avícola. Logo, a contaminação de produtos originados desses animais, como carne e ovos para consumo, pode ocorrer devido às infecções intestinais e sistêmicas das aves, por meio do abate e processamento da carcaça, do contato com as superfícies contaminadas e da manipulação inadequada durante o preparo desses alimentos, sendo um fator importante de contaminação cruzada. A incidência e a quantidade desses micro-organismos irá variar de acordo com as condições de manejo durante a criação, os cuidados higiênicos durante a manipulação, além de outros fatores como o tipo de alimento contaminado, a dose infectante, o sorovar de salmonela envolvido e a idade e imunidade do hospedeiro. (Okamura et al. 2001; Borsoi et al. 2011; Camargo, 2013).

Em relatório divulgado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) referente a doenças veiculadas por alimentos nos Estados Unidos, no ano de 2012, a *Salmonella* spp. foi o agente patogênico mais incidente, estando relacionado a 7.800 casos que levaram a 2.284 internações, de um total de 19.531 casos confirmados (CDC, 2013; Moreira, 2014).

Um dos primeiros relatos de Salmonela em aves no Brasil ocorreu em 1990, sendo relatado por pesquisadores da Universidade de São Paulo (Ferreira et al., 1990; Camargo, 2013).

Peresi et al. (1998), analisando possíveis causas de surtos de salmonelose notificados no período de julho de 1993 a junho de 1997 na região noroeste do Estado de São Paulo, verificaram que em 22 (95,7%) dos 23 surtos registrados, a Salmonela foi veiculada por alimentos que continham ovos em sua composição. Os autores relataram que o consumo de alimentos à base de ovos crus foi responsável por 20 desses surtos (87,0%), enquanto a cocção insuficiente de ovos inteiros e o consumo de alimento cozido (nhoque) foi a causa dos outros dois surtos (8,7%). Ao analisar 12 amostras de ovos que foram utilizados para elaboração dos alimentos envolvidos nestes surtos, em cinco amostras (41,7%) foram isoladas linhagens de *Salmonella* spp.

Oliveira e Silva (2000) detectaram a presença de *S. Enteritidis* em 9,6% das cascas e 3,2% das gemas de ovos coletados no comércio varejista de Campinas (SP), no período de janeiro a março de 1995. Porém, Baú et al. (2001), analisando amostras de ovos produzidos em granjas e em pequenas propriedades da cidade de Pelotas (RS), não encontraram nenhuma amostra positiva para salmonela nas cascas e no conteúdo desses ovos.

Da mesma forma, Silva et al. (2004) analisaram as cascas e os conteúdos de ovos de diversos fornecedores comercializados em Maceió (AL) e não encontraram amostras positivas para *Salmonella* spp.

Klein (2010), pesquisando *Salmonella* spp. em 1.152 ovos armazenados em temperatura ambiente e sob refrigeração, de diferentes distribuidoras do Estado de Minas Gerais, também não encontrou nenhuma amostra positiva para este micro-organismo.

Da mesma maneira, Figueiredo et. al (2012), avaliando o efeito da aplicação de óleo mineral sobre a casca de ovos e a utilização de embalagem plástica analisaram 1.920 ovos de consumo armazenados por até 125 dias sob refrigeração também não encontraram amostras positiva para *Salmonella* spp.

Menezes (2013), caracterizou microbiologicamente os produtos de origem avícola produzidos em Minas Gerais, provenientes de cinco regiões distintas do estado. As análises de 672 amostras de ovos *in natura*, demonstraram baixas contagens de todos os micro-organismos pesquisados e também ausência de *Salmonella* spp.

No Brasil, dados divulgados no relatório do PREBAF, em 2012, indicaram uma prevalência média de 3,03% em relação a *Salmonella* spp. Esse estudo foi conduzido no período de agosto de 2004 a julho de 2006, quando foram analisadas 2.710 unidades amostrais de carcaças congeladas de frango comercializadas, provenientes de 13 Estados e do 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). Um total de 250 cepas foram submetidas à análise de caracterização antigênica, chegando-se a 18 sorovares 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 cepas caracterizadas como *Salmonella* spp. (5,2%).

Ainda no Brasil, a Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS) divulgou dados epidemiológicos referentes às enfermidades veiculadas por alimentos notificadas entre 2000 e 2013, em que o agente patogênico de maior prevalência foi a *Salmonella* spp., relacionada a 1522 casos. Ovos e produtos à base de ovos ocuparam o segundo lugar dentre as categorias de alimentos envolvidos nos surtos. A carne de frango, processados e miúdos foram a sétima categoria relacionada. Entretanto é importante salientar a subnotificação destas enfermidades, revelada pelos índices citados, sendo uma questão relevante que pode mascarar a realidade no país (BRASIL, 2013; Moreira, 2014).

Por todas as considerações acerca do gênero *Salmonella* spp., é de extrema importância a verificação da incidência deste patógeno em matrizes alimentares, bem como a identificação do perfil de resistência aos antimicrobianos, de forma a contribuir para uma melhor compreensão dos riscos aos quais os consumidores estão submetidos (Moreira, 2014).

3.2.2 – *Enterococcus* spp.

Os micro-organismos do gênero *Enterococcus* spp. caracterizam-se por serem cocos Gram-positivos que podem apresentar-se sozinhos, aos pares, ou ainda na forma de pequenas cadeias. São anaeróbios facultativos podendo crescer em temperaturas entre 10 e 45°C, tendo seu ótimo a 35°C. Crescem em meios contendo elevadas concentrações de NaCl e 40% de sais biliares e podem resistir a amplas variações de pH e temperaturas como a de 60°C por até 30 minutos (Jay, 2006).

Enterococcus spp. são bactérias amplamente distribuídas na natureza sendo encontrados no solo, alimentos e água, fazendo parte, também, da microbiota dos trato 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).

Desde a virada do século XX, *Enterococos* spp. tem sido reconhecido como patógeno humano em potencial. A partir de 1912, este gênero passou a ser associado a uma série de doenças como endocardites, infecções dentárias, abdominais, do trato urinário, feridas (principalmente durante a Primeira Guerra Mundial), sepsis puerperale e osteomielite. É importante ressaltar que a importância dos enterococos como agentes etiológicos de infecções hospitalares é bem documentada, sendo, portanto, difícil estabelecer a fonte de infecção, já que este micro-organismo pode ter como origem a autoinfecção (Dunne & Wang, 1997; McDonald *et al.*, 1997).

Em 1984, nos EUA, o “*National Nosocomial Infection Surveillance System*” (NNISS) classificou os enterococos como o terceiro agente causador de infecção hospitalar mais comum, passando para o segundo lugar no período de 1986 a 1989. *E. faecalis* é a espécie predominante no homem, embora alguns indivíduos em alguns países apresentem como espécie predominante o *E. faecium* (Devriese *et al.*, 1995).

Mundt (1986), detectou a presença de *E. faecalis* em diversos alimentos e demonstrou que nem sempre a presença do mesmo está associada com a contaminação fecal. 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) possibilita sua presença em qualquer alimento de origem animal ou alimentos processados. Isto significa que estas bactérias versáteis podem ser encontradas em qualquer ponto do fluxograma de produção de diversos tipos de alimentos (Prebaf, 2012).

Os enterococos tem apresentado significativa importância na tecnologia do processamento de alimentos. Estes micro-organismos, por se caracterizarem como linhagens homofermentativas produtoras de ácido láctico, proporcionam tanto o sabor ácido característico de produtos fermentados, como também atuam no processo de maturação e enriquecimento do sabor, produzindo características organolépticas únicas e específicas. Adicionalmente, podem ser utilizados como culturas “starters”, ou iniciadoras, e como probióticos. Algumas linhagens de enterococos ainda podem produzir substâncias antimicrobianas, conferindo aos produtos maturados melhor qualidade sanitária (Charteris, 1998; Franz *et al.*, 2003; Girrafa *et. Al.*, 2004; Gama, 2008)

No entanto, diversos estudos têm demonstrado que alimentos comercializados em todo o mundo, principalmente os de origem animal, podem tornar-se reservatórios de micro-organismos resistentes e, dessa forma, contribuir na propagação da resistência antimicrobiana à população humana via cadeia alimentar. Os enterococos resistentes à antibióticos têm sido detectados em carnes e produtos derivados, leites e produtos lácteos derivados, dentre outros tipos de alimentos destinados ao consumo humano (Bertrand *et al.* 2000; Dzidic *et al.* 2008).

Em 2012, no Brasil, o relatório do PREBAF descreveu a análise de 2.710 unidades amostrais de carcaças congeladas de frango comercializadas, das quais 98,7% obtiveram resultados positivos para o gênero *Enterococcus* spp. No total, 8.188 colônias foram isoladas e submetidas a identificação da espécie, com posterior análise do perfil de resistência. Entre as diferentes espécies já descritas no gênero, 12 delas puderam ser identificadas entre as colônias caracterizadas. Contudo, observou-se uma predominância de quatro espécies, uniformemente distribuídas entre cinco regiões: *E. faecalis* (61,4%), *E. gallinarum* (28,7%), *E. casseliflavus* (5,06%) e *E. faecium* (2,2%) (Prebaf, 2012).

3.3 – Resistência antimicrobiana

Segundo a OMS, a resistência microbiana pode ser conceituada como a habilidade de um micro-organismo de continuar a multiplicar-se ou persistir na presença de níveis terapêuticos de determinado agente antimicrobiano, garantindo a sua sobrevivência e a proliferação da linhagem, condição normalmente limitante para os indivíduos sensíveis desta população (Prebaf, 2012; WHO, 2016).

Dentre os mecanismos bacterianos que podem contribuir para o desenvolvimento da resistência, destacam-se:

- I. Mudanças na permeabilidade da parede celular bacteriana, restringindo o acesso do agente antimicrobiano ao alvo;
- II. Modificação do alvo de ligação do agente antimicrobiano;
- III. Aumento da atividade das bombas de efluxo ativas gerais ou específicas;
- IV. Inativação ou degradação enzimática do antimicrobiano;
- V. Aquisição de uma via metabólica alternativa àquela inibida pelo antimicrobiano;

A resistência bacteriana é um processo evolutivo, portanto outros mecanismos ainda desconhecidos podem estar envolvidos e ainda podem vir a ser descobertos (Boerlin et al., 2010; Campos, 2013; Lopes, 2014).

A resistência microbiana pode ser classificada como natural ou intrínseca e adquirida. A resistência natural decorre de um fator inerente, estrutural ou funcional, associado aos micro-organismos da espécie, ao gênero ou grande grupo, e está baseada em genes presentes no cromossomo que, tipicamente, não são transferíveis. Bacilos Gram-negativos (*Escherichia coli*, *Proteus* spp.) resistentes à penicilina G, são um exemplo: essas bactérias sintetizam enzimas que clivam esse antibiótico, denominadas beta-lactamases, e possuem envoltórios que dificultam o acesso da penicilina ao seu alvo molecular. Já a resistência adquirida é resultante de alterações no genoma bacteriano, conseqüentes de uma mutação ou da aquisição de genes exógenos, normalmente ausentes nas bactérias da espécie em questão. Um dos maiores exemplos de resistência adquirida foi observado nos enterococos resistentes à vancomicina, objeto de grande

preocupação na área da saúde. (Monroe et al., 2000; Palermo-Neto & Titze-de-Almeida, 2002; Alekshun et al., 2007).

É importante destacar, ainda, que a resistência a certos agentes antimicrobianos pode ocorrer em decorrência a uma seleção cruzada ou co-seleção. A seleção cruzada refere-se à presença de um único gene de resistência ou mutação que confere tal característica a dois ou mais grupos de antimicrobianos que, em geral, pertencem à mesma classe. Já a co-seleção deve-se à existência de genes distintos ou mutações na mesma cepa bacteriana, conferindo resistência à diferentes classes de antimicrobianos (Guardabassi & Kruse 2010).

3.3.1 – *Salmonella* spp. e resistência aos antimicrobianos

Os perfis de resistência geralmente refletem o tempo que uma droga está em uso e a reversão desta característica associada ao seu desuso. Com isso, o surgimento e a disseminação de cepas de *Salmonella* spp. resistentes aos antimicrobianos, particularmente aquelas resistentes à múltiplas drogas, representa um dos maiores problemas de saúde pública (Aarestrup, 2004).

Considerando que a principal via de transmissão de *Salmonella* spp. está na ingestão de alimentos contaminados, a presença dessa bactéria em animais, criados com objetivo comercial de produzir alimentos, contribui para que esse micro-organismo seja considerado como um dos mais frequentes e relevantes agentes causadores de enfermidades entéricas (WHO, 1997; Prebaf, 2012).

Ilustrando esse cenário tem-se, por exemplo, o uso frequente, por muitos anos, da ampicilina, assim como o trimetoprim-sulfametoxazol e o clorafenicol, que foram drogas de escolha para o tratamento de infecções severas causadas por *Salmonella*. Posteriormente, o aumento da taxa de resistência a esses agentes comprometeu significativamente a sua eficiência. Assim, as cefalosporinas de espectro expandido e as fluoroquinolonas passaram a ser utilizadas em tratamentos, por suas propriedades farmacodinâmicas, associado ao baixo nível de resistência da salmonela. Entretanto, relatos de surtos ou casos e infecções por cepas resistentes já foram registrados na literatura (Dunne et al., 2000; Ângulo et al., 2000; Fey et al., 2000; Winokur et al., 2000; Olsen et al., 2001; Chiappini et al., 2002).

De fato, a terapia antimicrobiana se faz na prática, muitas vezes, de modo indiscriminado, sendo os níveis e extensão da resistência influenciados pelas práticas de uso destes fármacos no homem e nos animais, conforme a região geográfica. Nos EUA, entre os dez sorovares de *Salmonella* mais comumente isolados de infecções em humanos, oito foram cepas com resistência a cinco ou mais drogas antimicrobianas. Essa característica já foi observada, principalmente, entre os sorovares Typhimurium, Heidelberg e Newport (CDC, 2004).

Na Europa, o monitoramento da resistência antimicrobiana em dez países durante cinco anos, revelou um aumento na ocorrência de resistência de *Salmonelas* não-tifóides isoladas em casos de infecção humana. Os isolados comumente apresentaram resistência às sulfonamidas, tetraciclina, ampicilina e estreptomicina, além de um aumento significativo no número de cepas resistentes (Meakins et al. 2008).

Como abordagem da evolução histórica da resistência aos antimicrobianos, no Brasil as 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 Costa *et al.* (1967) e Hofer *et al.* (1974) demonstraram um aumento dessa sensibilidade, até que a partir dos anos 80, estudos realizados em diferentes regiões do país em cepas de origem humana, alimentar, animal e ambiental, revelaram a resistência simples ou múltipla em *Salmonella* spp., bem como capacidade de transferência dessas características genéticas.

Fernandes et al. (2003) avaliaram 105 cepas de *S. Enteritidis* de origem humana (fezes, sangue e urina) e não humana (alimentos à base de ovos implicados em surtos de salmonelose, amostras de frango e de dejetos), isoladas no período de 1975 a 1995 no Estado de São Paulo. Eles concluíram que 66,7% das cepas foram sensíveis aos agentes antimicrobianos testados, sendo que as cepas resistentes a uma única droga (24,8%) eram originadas majoritariamente de material humano e as multirresistentes (8,5%) de pacientes hospitalizados. Com base nestas observações, os autores afirmaram que, a despeito da baixa incidência de resistência observada, parece ser crucial um ativo monitoramento da resistência, especialmente para *S. Enteritidis*, pelas implicações para a saúde pública e uma potencial disseminação de clones resistentes.

No Brasil, os dados do PREBAF (2012) apontaram para 98 perfis de multirresistência (acima de duas classes de antimicrobianos) em 76,8% das cepas caracterizadas como *Salmonella* spp., isoladas de carcaças de frango congeladas (total 250). Os agentes antimicrobianos foram escolhidos de acordo com sua utilização em humanos e animais, sendo as análises realizadas conforme o perfil de suscetibilidade dos micro-organismos a seis classes de antimicrobianos, totalizando 18 fármacos. Um dado preocupante encontrado foi o perfil de *S. Enteritidis* que apresentou 91,8% de resistência para três ou mais classes de antimicrobianos testados. Salientou-se também a importância do sorovar Heidelberg resistente às cefalosporinas, incluindo as de terceira geração, utilizadas no tratamento de salmonelose invasiva no homem e como uso terapêutico ou profilático em animais de produção (BRASIL, 2008; Moreira, 2014).

3.3.2 – *Enterococcus* spp. e resistência bacteriana

A propagação zoonótica de resistência antimicrobiana de estirpes de enterococos tem se tornado uma preocupação em saúde pública, uma vez que as principais classes de antimicrobianos

utilizadas em animais apresentam análogos usados na medicina humana e, portanto, podem ser capazes de induzir resistência cruzada (Hammerum et al., 2004; Boerlin et al., 2010; Zou et al., 2011).

Enterococcus spp. são intrinsicamente resistentes às penicilinas semissintéticas e ao sulfametoxazol-trimetropim, além de apresentar resistência adquirida ao clorafenicol, eritromicina, altos níveis de aminoglicosídeos, glicopeptídeos, tetraciclinas fluoroquinolonas e vancomicinas (Murray, 1990; Kayser, 2003; Rice et al 2003; Prebaf, 2012; WHO, 2014).

O elevado nível de resistência aos aminoglicosídeos dos enterococos pode ser adquirido por meio de três mecanismos distintos: alteração do sítio-alvo no ribossomo e interferência no transporte do antibiótico, por meio de mutação no cromossomo, e modificação enzimática do antibiótico, este geralmente mediado por plasmídeo (Couvarlin, et. al, 1980; Leclercq et al., 1992).

Um outro exemplo relevante de resistência adquirida foi observado nos enterococos resistentes à vancomicina, objeto de grande preocupação na área da saúde. Enterococos resistentes à vancomicina (VRE) não eram reconhecidos até 1988. Posteriormente, embora muito se tenha estudado sobre a epidemiologia do VRE, 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. Múltiplos genes estão envolvidos na geração da resistência à vancomicina e seis fenótipos são descritos: VanA, VanB, VanC, VanD, VanE e VanG, sendo relacionados a diferentes ligases e sítios-alvos da vancomicina na parede celular dos enterococos. O problema se agrava quando há associação do uso de medicamentos e, conseqüentemente, de resistência entre os antimicrobianos, particularmente entre os isolados VRE. Nesse grupo, a resistência associada entre opções terapêuticas para infecções graves, incluem a ampicilina, altas concentrações de aminoglicosídeos e linezolida (Frieden et al., 1993; Campos 2013).

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, et.al., 1995 Apud Prebaf 2012).

No Brasil, existem poucos estudos com o objetivo de avaliar a presença do VRE fora do ambiente hospitalar. No período de 1996 a 1997, foram publicadas avaliações de perfil de sensibilidade aos glicopeptídeos, de enterococos isolados de aves comerciais em aviários

próximos a cidade de São Paulo. A suscetibilidade à avoparcina, teicoplanina e vancomicina foi determinada em 217 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 produtos de origem animal sugere que a transmissão para o homem por esta via possa ocorrer. Porém provas conclusivas ainda não foram obtidas (Witte & Klare, 1995; Leme et al., 2000).

A alta prevalência de casos envolve a resistência não só à vancomicina, mas a outros antimicrobianos, o que torna a terapêutica ainda mais limitada. Deste modo as infecções causadas por *Enterococcus* spp. conferem grande ameaça à saúde pública, principalmente pela dificuldade da erradicação das mesmas a partir do uso de antimicrobianos, uma vez que estes micro-organismos podem apresentar elevados níveis de multirresistência. Cauwers et. al. (2007), por exemplo, concluíram que o uso da tetraciclina em frangos pode co-selecionar resistência aos macrolídeos e lincosamidas. O autor ainda considerou a presença dos genes de resistência antimicrobiana em *Enterococcus* spp., um risco à saúde pública com potencial transferência para outros micro-organismos patogênicos (Kobayashi et al., 2011; Campos, 2013).

Conceição et al. (2011) verificaram a evolução da resistência aos antimicrobianos entre isolados clínicos de enterococos de cerca de 1.000 pacientes internados em um hospital brasileiro. Segundo os autores a incidência de contaminação por *E. faecium* aumentou significativamente de 0,3% em 2006 para 2,3% em 2009. Outro dado importante foi o aumento na taxa de VRE de 2,5% para 15,5%, sendo a maioria pertencente à mesma espécie, que também apresentou resistência à ampicilina e quinolonas.

Em 2012 o PREBAF relatou, após a análise de 2.710 unidades amostrais de carcaças congeladas de frango, o isolamento de colônias de *Enterococcus* spp., sendo avaliadas 262 amostras positivas para este micro-organismo, quanto ao perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. Os antibióticos testados foram: vancomicina, teicoplanina, ampicilina, tetraciclina, ciprofloxacina, eritromicina, cloranfenicol, linezolida, quinupristina-dalfopristina, gentamicina e estreptomina. Foi verificado certo grau de resistência aos antimicrobianos avaliados, com exceção da ampicilina que apresentou 100% de sensibilidade. Destaca-se que 1% das colônias isoladas foram resistentes à vancomicina (VRE) e 24% classificadas como de resistência intermediária, sendo estes representados pelas espécies *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*. Tais resultados têm grande importância na medicina humana, uma vez que corroboram a prática de um monitoramento, visto que este gênero bacteriano pode estar associado à disseminação da resistência por meio de alimentos de origem animal.

3.3.3 – Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos por Disco-difusão

O *Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI* (antigo NCCLS) é uma organização internacional interdisciplinar, educacional e de desenvolvimento, sem fins lucrativos, que promove o desenvolvimento e uso de normas, padrões e diretrizes consensuais voluntárias na comunidade de atenção à saúde. O Subcomitê para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana do CLSI é constituído por representantes da área da saúde, dos governos e da indústria, incluindo laboratórios de microbiologia, agências governamentais, provedores de atenção à saúde e educadores, além de algumas indústrias farmacêuticas e de microbiologia diagnóstica. Usando o processo de consenso do CLSI, o subcomitê desenvolve normas/padrões que promovem testes de sensibilidade antimicrobiana acurados e relatórios apropriados (CLSI, 2012).

Diversos métodos laboratoriais podem ser empregados para predizer a sensibilidade *in vitro* de bactérias aos agentes antimicrobianos. Tais procedimentos são indicados para qualquer organismo responsável por um processo infeccioso que exija terapia antimicrobiana, quando é impossível predizer a sensibilidade desse organismo, mesmo conhecendo a sua identificação e, com maior frequência, quando se acredita que o organismo causador pertence a uma espécie capaz de apresentar resistência aos agentes antimicrobianos normalmente usados. Os testes de sensibilidade também são importantes nos estudos da epidemiologia da resistência e na avaliação de novos agentes antimicrobianos (ANVISA, 2003).

Atualmente o CLSI recomenda e padroniza, para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana, o método de disco-difusão, para o qual foram desenvolvidos padrões de interpretação apoiados por dados laboratoriais e clínicos. O documento ainda contempla a preparação das placas de ágar, as condições do teste (incluindo o preparo e tamanho do inóculo, o tempo de incubação e a temperatura), a interpretação dos resultados, dos procedimentos de controle de qualidade e as limitações do método de disco-difusão. No Brasil, a ANVISA comprou os direitos autorais, na Língua Portuguesa, do manual do CLSI e suas atualizações e disponibiliza acesso gratuito ao manual, diminuindo custos laboratoriais e garantindo resultados mais precisos, pois padroniza as técnicas de pesquisa e análise (CLSI, 2012).

Os testes de disco-difusão baseados apenas na presença ou ausência de um halo de inibição, sem consideração do tamanho do halo, não são aceitáveis. Só podem ser obtidos resultados confiáveis com testes de disco-difusão que usam o princípio de metodologia padronizada e medidas do diâmetro do halo de inibição correlacionados às concentrações inibitórias mínimas (CIMs) com cepas reconhecidamente sensíveis e resistentes a diversos agentes antimicrobianos (ANVISA, 2003).

3.4 – Identificação e classificação de micro-organismos

Para esclarecer algum fato ou aplicação que tenha o envolvimento de micro-organismos, é necessário identifica-los ou, ao menos classificá-los. Em princípio, as técnicas para a classificação e identificação de micro-organismos devem seguir alguns aspectos gerais tais como uma capacidade de identificação universal, ter um baixo custo de operação, apresentar um rápido processo de transferência de informações, propiciar o compartilhamento das informações através de bancos de dados que devem ser acessíveis e passíveis de atualizações regularmente e possibilitar a identificação desses em diferentes fontes (Assis et al., 2011).

A identificação de micro-organismos isolados de amostras clínicas tem sido, tradicionalmente, realizada por exames macroscópicos e microscópicos da morfologia das colônias, além de caracterização clássica por ensaios bioquímicos. Embora ainda sejam considerados como padrão-ouro para a identificação, estes métodos, podem ser trabalhosos, necessitando de longos períodos de incubação e uma mão-de-obra técnica e experiente, além produzir reações com possíveis interpretações subjetivas (Theel, 2013; Mayo Clinic, 2013).

Estes problemas foram solucionados, em grande parte, com o advento de plataformas de testes bioquímicos automatizados e, mais tarde, com o desenvolvimento de técnicas de sequenciamento de DNA molecular, baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR). Embora confiável e com uma otimização no tempo de resposta, em comparação com os métodos convencionais de identificação, a análise molecular permanece associada a um custo significativamente mais elevado, e requer profissionais experientes para garantir o sucesso da análise. Esses fatores em conjunto ainda podem limitar a implementação de uma rotina de análises por meio de métodos de diagnóstico molecular em grandes hospitais e laboratórios de referência (Theel, 2013; Mayo Clinic, 2013).

Nesse contexto, considerando a necessidade crescente de entendimento dos mecanismos envolvidos em patologias, informações sobre as diferenças proteicas entre tecidos e/ou fluidos corporais normais e alterados, foram aprimoradas e desenvolvidas novas técnicas de análises, em paralelo aos dados derivados do genoma e aos dados clínicos. Dentre elas destaca-se o processo então definido como proteômica (Wilkins, 1997; Barbosa, 2012).

3.6.1 – Proteômica: metodologias e aplicações

O termo proteômica refere-se ao estudo do conjunto de proteínas, responsáveis direta ou indiretamente pelo controle de todos, ou quase todos, os processos biológicos. Como definido por Valledor e Jorin (2011), a proteômica estuda de forma descritiva e quantitativa desde o conjunto de proteínas de uma organela subcelular até aquelas de um ecossistema, suas variações na população, as mudanças em resposta a um ambiente ou decorrentes do desenvolvimento normal ou alterado e modificações e interações com outras proteínas.

Muitas das técnicas empregadas em proteômica envolvem diferentes metodologias que podem ser combinadas, envolvendo a separação e a extração eficiente de proteínas e peptídeos, com a prévia redução da complexidade de algumas amostras, seguida da análise dos dados. É nesse contexto, que a Espectrometria de Massas (EM) tornou-se um bom exemplo, sendo eficiente na emissão de resultados e com uma relativa diminuição dos custos, ao contrário de outros métodos convencionais (Assis et al., 2011; Babosa, 2012).

3.6.2 – Princípios básicos de espectrometria de massas

Essencialmente, a EM é um método analítico tradicionalmente utilizado para elucidar a composição ou a estrutura molecular de uma amostra desconhecida, a partir da formação de íons em fase gasosa, com ou sem fragmentação. Esta caracterização é realizada inteiramente pelo instrumento de espectrometria de massas, baseada na aquisição e análise dos valores da massa (m) e da carga (z) das moléculas individuais da amostra ionizada (Theel, 2013; Mayo Clinic, 2013).

O equipamento normalmente utilizado compreende uma fonte de ionização, um ou mais analisadores de massas e um detector. O primeiro componente é utilizado para gerar íons peptídicos ou proteicos, geralmente transferindo prótons (H^+) para as moléculas, sem alterar sua estrutura química. O íon é então acelerado por um campo elétrico e separado de acordo o valor da relação massa/carga (m/z) no analisador de massas, ou com um valor m/z previamente determinado e fragmentado. Finalmente, os íons passam pelo detector, que está conectado a um computador com programas para análise de dados (Barbosa et. al., 2012).

Dentre os métodos de ionização utilizados na EM, a Ionização/Dessorção à Laser Assistida por Matriz (MALDI) destaca-se como uma técnica com uma plataforma molecular automatizada, que permite a análise de biomoléculas (biopolímeros tais como o DNA, proteínas, peptídeos e açúcares), além de grandes moléculas orgânicas (tais como polímeros, dendrímeros e outras macromoléculas), que tendem a ser frágeis e se fragmentam quando são ionizadas por outros métodos convencionais. É também considerado um método rápido, simples e relativamente barato para a identificação de micro-organismos (Barbosa et. al, 2012).

No MALDI, os peptídeos são co-cristalizados com uma matriz orgânica, geralmente ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico. Após bombardeamento por laser, a matriz sublima e seus íons transferem a carga para os analitos, resultando na formação de íons peptídicos. A massa molecular dos íons é então avaliada por um analisador, após a passagem por uma câmara de vácuo (Barbosa et. al, 2012).

Dentre os tipos mais comuns de analisadores destacam-se os quadrupolos (Qs), os íon-traps (IT), o Fourier-transform ion cyclotron resonance (FT-ICR), o orbitrap, e o *Time Of Flight* (TOF). Os Qs apresentam um conjunto de quatro eletrodos em bastão e funcionam como uma

espécie de filtros de massas. Entre esses eletrodos, um campo elétrico assegura que somente íons de uma determinada razão m/z sigam a trajetória ao detector sendo os demais desviados (Barbosa et. al, 2012).

Os analisadores do tipo IT filtram e aprisionam os íons de interesse em um campo elétrico tridimensional, que são gradualmente liberados em ordem crescente de m/z . Já os FT-ICRs assemelham-se aos IT, porém com um campo magnético adicional, que força aos íons um movimento circular, com ciclos de alta frequência, determinando então a razão m/z a partir desse movimento específico. Nos *orbitrap*, também caracterizados como um tipo de analisador IT, os íons oscilam ao longo e ao redor de um eletrodo em forma de espiral. A frequência dessa oscilação será proporcional a raiz quadrada da razão m/z sendo determinada com alta precisão (Zaluzec, 1995; May, 2011; Barbosa et. al., 2012).

Finalmente, nos analisadores TOF, os íons formados são acelerados por um potencial entre dois eletrodos e atravessam um tubo de vácuo com velocidade inversamente proporcional a sua massa. À medida que os íons emergem do analisador de massa TOF, colidem com o detector de íons, que mede a carga e o tempo para o impacto (o tempo decorrido entre a ionização e a detecção é utilizado para derivar o valor m/z) (Barbosa et. al., 2012).

Em síntese, após a passagem pelo analisador, os íons em fase gasosa seguem para o detector que converte o sinal da passagem do íon em sinal analógico, que é lido e interpretado por uma estação de trabalho. O resultado final é um gráfico de m/z versus intensidade (contagem de íons), comumente referido como “espectro MS”. Os sinais gerados são comparados com informações disponíveis em bancos de dados, o que permite identificar a proteína de interesse (Wollnik, 1993; Barbosa et. al., 2012; Mayo Clinic, 2013).

Os equipamentos que combinam fontes de ionização do tipo MALDI com analisadores do tipo TOF (MALDI-TOF), têm apresentado grande aplicação em laboratórios, sendo utilizado em análises clínicas, além da aplicabilidade no âmbito ambiental, alimentício e industrial, demonstrando grande utilidade em qualquer setor que exija controle microbiológico. Esta metodologia vem emergindo como método preferencial de escolha para a análise e identificação de polipéptidos grandes e até mesmo de micro-organismos (Marvin et al., 2003; Hsieh et al., 2008; Theel, 2013; Mayo Clinic, 2013).

3.6.3 – MALDI-TOF no laboratório de microbiologia

Segundo a Mayo Clinic Laboratories (2013), a técnica EM MALDI-TOF alterou drasticamente o fluxo de trabalho tradicional, além dos processos de isolamento, em seus laboratórios de microbiologia. A análise foi incorporada em muitas de suas rotinas a partir de colônias de bactérias e leveduras isoladas, sendo as amostras clínicas ainda cultivadas em meios sólidos e observadas para o crescimento.

Após o cultivo, uma colônia suficientemente visível, poderá ser isolada e posteriormente preparada para o processamento em EM MALDI-TOF. A quantidade de material necessária para tal análise é mínima, sendo uma única colônia suficiente para a identificação completa. Com uma alça de inoculação pequena, a colônia é removida e depositada no poço da placa-alvo, onde, dependendo do design do fabricante, pode acomodar, pelo menos, 24 amostras.

Para liberar as proteínas intracelulares necessárias para a análise, ácido fórmico é adicionado a cada amostra, diretamente na placa-alvo, para a perfuração das células intactas. Essa mistura é então armazenada até a sua secagem completa. A matriz química é posteriormente adicionada e, também submetida à secagem. Este processo é referido como o método de preparo direto sobre placa à base de ácido e, dependendo da umidade do ambiente, tem um tempo total de preparação de 10 a 20 minutos para 24 amostras. Notavelmente, alguns organismos potencialmente perigosos (Espécies de *Brucella* e *Francisella*, por exemplo) não são processados utilizando este método, para evitar sua dispersão em aerossol e minimizar o risco de possíveis infecções no ambiente; tais agentes são, portanto, preparados usando um processo de extração em tubo. A seguir, a placa-alvo é colocada no espectrômetro de massa, sendo as etapas posteriores de processamento de análise inteiramente automatizadas (Fig.6) (Theel, 2013; Mayo Clinic, 2013).

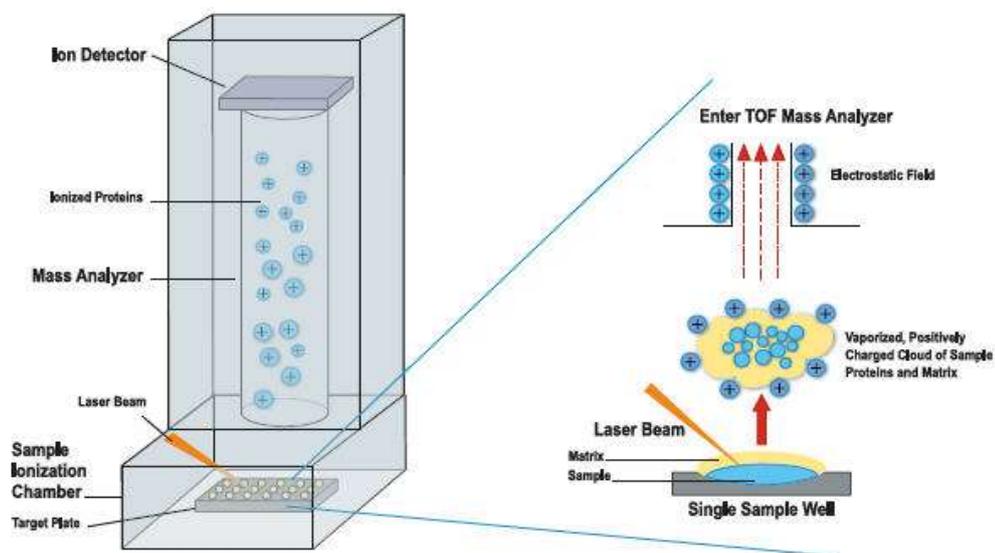


Figura 6. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight Process (Mayo Clinic, 2013)

Segundo a literatura, a preferência pela tecnologia EM MALDI-TOF em relação aos métodos tradicionais de diagnóstico, se deve à capacidade deste sistema em identificar um grande número de isolados desconhecidos em um intervalo de tempo significativamente reduzido, utilizando uma menor quantidade de recursos laboratoriais (por exemplo, meios bioquímicos). Além disso, a biblioteca espectral fornecida pelos fabricantes é, atualmente, uma importante base de dados. Apesar de restrita apenas aos usuários consumidores do equipamento escolhido, esta biblioteca pode ser suplementada com espectros de referência a partir de isolados clínicos

caracterizados pelos laboratórios cadastrados, permitindo ao usuário expandir a base de dados juntamente com atualizações de rotina da biblioteca fornecida (Dhiman, 2011; Saffert, 2011; Theel 2012; Mayo Clinic, 2013).

4 – Material e métodos

A criação das aves foi realizada na Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa (FEPHB) da Escola de Veterinária da UFMG (EV/UFMG) e as análises microbiológicas (pesquisa de *Salmonella* spp. e *Enterococcus* spp.) das cascas dos ovos e o antibiograma (resistência bacteriana) foram realizadas no Laboratório de Segurança Microbiológica de Alimentos (LSMA) do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA) e no Aquacen, Laboratório Oficial Central do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), sediado na Escola de Veterinária da UFMG.

4.1 – Obtenção das amostras

As aves, utilizadas no experimento, foram alojadas em galpão de postura convencional e foram submetidas a um manejo semelhante aos usados nas criações comerciais. Foram utilizadas 450 galinhas de postura (90 por tratamento), da linhagem Hy-line, com 90 semanas de idade, alojadas em gaiolas (três aves por gaiola), recebendo água e ração à vontade.

Para avaliar a o perfil de resistência bacteriana aos medicamentos, foram utilizados quatro compostos de diferentes classes, que foram adicionados à ração das aves. As classes utilizadas foram: tetraciclina (oxitetraciclina e doxiciclina), lincosamidas (lincomicina) e quinolonas (enrofloxacina), todos adquiridos no comércio varejista. As rações foram produzidas na fábrica da própria fazenda e os medicamentos foram adicionados à ração e homogeneizados com o auxílio de um misturador em “y”.

4.2- Tratamentos

Os tratamentos, definidos de acordo com o medicamento administrado à ração das aves, foram os seguintes:

- A- Grupo controle: ração sem antibiótico;
- B- Ração contendo oxitetraciclina;
- C- Ração contendo lincomicina;
- D- Ração contendo doxiciclina
- E- Ração contendo; enrofloxacina

As dosagens dos antimicrobianos usados no experimento "in vivo" foram calculadas com base nas informações presentes na bula destes medicamentos, resultando nas seguintes

concentrações: 82430 g/ton de oxitetraciclina; 79000 g/ton de lincomicina; 37920 g/ton de doxiciclina e; 37920 g/ton de enrofloxacina, na ração.

O período experimental total foi de 26 dias. No dia zero a ração oferecida para todas as aves não continha nenhum medicamento. Após a coleta de todos os ovos do dia zero, foi introduzida a ração contendo medicamento para os quatro grupos tratados.

O período total de tratamento foi de cinco dias e, após esse período, a ração sem adição de medicamento voltou a ser oferecida para todas as aves. De cada tratamento, foram coletados 60 ovos, nos dias zero, três, seis, 15 e 25. Os ovos coletados de todos os grupos foram identificados individualmente de acordo com o tratamento e a data da coleta.

Para cada dia de avaliação, foram coletadas seis amostras (repetições), constituídas por um pool de cinco ovos cada, para análise de *Salmonella* spp. e seis amostras (repetições), constituídas por um pool de cinco ovos cada, para análise de *Enterococcus* spp.

4.3 - Análises microbiológicas:

Para pesquisa de *Salmonella* spp. cada repetição analisada foi composta por um pool de cinco ovos, em casca, que foram lavados com 225 mL de solução salina peptonada estéril a 1%. Posteriormente, estas soluções foram mantidas em repouso por 1h e, em seguida, foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas à 35±1°C. Após a incubação das amostras, alíquotas de 0,1mL desta solução foram pipetadas para tubos contendo 10mL de caldo de enriquecimento seletivo específico (Caldo Rappaport, contendo verde malaquita e cloreto de magnésio que, associados ao binômio tempo/temperatura ideal, atuam como agentes seletivos da microbiota acompanhante, além da presença de peptona de farinha de soja estimular o crescimento de *Salmonella* spp.), e incubados por mais 24h em banho-maria a uma temperatura de 41,5°C. A partir do caldo seletivo, após esse período, o sobrenadante foi estriado, com auxílio de uma alça descartável, sobre a superfície previamente seca de placas estéreis contendo ágar Rambach e incubado em estufas por mais 24h a 35±1°C. No ágar Rambach, a diferenciação entre *Salmonella* e outros micro-organismos é promovida pela presença de propilenoglicol e também de um cromógeno que evidencia a hidrólise da beta-galactosidase. Após a leitura dos resultados e caracterização, as colônias isoladas foram repicadas, estriadas em placas estéreis contendo ágar sangue e incubadas em estufas por mais 24h a 35±1°C, resultando em colônias mais puras e homogêneas para posterior análise proteômica. Como controle de qualidade do meio de isolamento e análise proteômica foram utilizadas cepas de *Salmonella enteritidis* ATCC 14028 (controle positivo).

Para a pesquisa de *Enterococcus* spp. cada repetição analisada foi composta por um pool de cinco ovos, em casca, que foram lavados com 225 mL de solução salina estéril a 1%. Após a

lavagem estas soluções foram mantidas em repouso por 1h e, em seguida, foram incubadas em estufa bacteriológica por 24 horas à 35±1°C. Posteriormente, considerando o lavado (225 mL) como diluição inicial (10⁻¹), 1 mL das amostras foram submetidas a diluições seriadas, em tubos contendo 9 mL de solução salina 0,1% estéril. Em seguida 0,1 mL de cada uma das seguintes diluições: 10⁻⁵; 10⁻⁶; 10⁻⁷ foi inoculado, e espalhado com auxílio de alça de Drigalski estéril, por toda a superfície seca em placas estéreis contendo ágar Enterococcosel (o ágar contém esculina e sais biliares incorporados ao meio tornando-o seletivo para micro-organismos Bile-Esculina positivos. A hidrólise da esculina no meio resulta na formação de glicose e esculetina. A esculetina reage com íons férricos - fornecidos pelo composto inorgânico do meio; o citrato férrico - formando um complexo negro). As placas foram incubadas e invertidas, em estufa bacteriológica por 24h a 35±1°C. Após esse período realizou-se a leitura dos resultados, incluindo a contagem e seleção de colônias típicas para serem estriadas em placas estéreis contendo ágar sangue, e, então, incubadas em estufas por mais 24h a 35±1°C, resultando em colônias mais puras e homogêneas para posterior análise proteômica. Como controle de qualidade do meio de isolamento e análise proteômica foram utilizadas cepas *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 (controle positivo).

4.4 - Execução de Testes de Disco-Difusão:

Os testes de resistência aos antimicrobianos foram baseados e adaptados conforme a metodologia descrita no documento M100-S22 do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2012), sendo as respectivas classificações de perfil de resistência, realizadas de acordo com a disponibilidade dos dados e interpretações descritos por Charteris et. al. (1998), que estabeleceu padrões para o grupo de bactérias ácido-láticas (no qual encontra-se inserido o gênero *Enterococcus* spp., conforme descrito na revisão bibliográfica), organizados de acordo com as classes de antimicrobianos (Tabela 1).

Após o isolamento e cultivo em placas contendo ágar-sangue as colônias foram transferidas, com o auxílio de uma alça descartável, para tubos de poliestireno transparente contendo 2 mL de solução fisiológica (0,85%) estéril. A suspensão bacteriana foi então ajustada a uma turbidez correspondente a 0,5 na escala de McFarland. Em seguida, alíquotas de 0,1mL desta solução foram pipetadas, inoculadas e espalhadas, com auxílio de alça de Drigalski estéril, por toda a superfície estéril do ágar Mueller-Hinton (Oxoid), a fim de assegurar a distribuição uniforme do inócuo.

Foram selecionados para o teste, discos contendo concentrações de cinco agentes antimicrobianos, determinados conforme a disponibilidade no mercado, representando as principais classes de antimicrobianos: tetraciclina (tetraciclina), lincosamidas (lincomicina), quinolonas (enrofloxacina) e aminoglicosídeos (neomicina). Os discos foram colocados na

superfície da placa contendo ágar Mueller-Hinton, com auxílio de pinças micro dente-de-rato estéreis (uma para cada agente), devidamente pressionados de encontro a placa, de maneira a assegurar contato completo com a superfície do ágar. Os discos foram distribuídos por igual, de maneira que a distância de centro para centro não exceda 24mm. As placas foram incubadas, invertidas, em uma estufa, a $35\pm 1^\circ\text{C}$ por 24h.

Após a incubação foram avaliadas a presença dos possíveis halos de inibição resultantes, quanto a uniformidade da circunferência, sendo também observado a presença de um tapete confluyente de crescimento microbiano. Os diâmetros dos halos de inibição total foram mensurados utilizando um paquímetro, incluindo o diâmetro do disco e finalmente classificados como sensíveis, de resistência intermediária ou resistente. Para esta análise também foram utilizadas placas contendo cepas *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 (controle positivo).

Tabela 1. Parâmetros para perfil de resistência para o grupo de bactérias ácido-láticas de acordo com as classes de antimicrobianos.

Discos	Concentração (μg):	Diâmetros (mm):		
		R (Resistente)	I (Intermediário)	S (Sensível)
Tetraciclina	30 μg	≤ 14	15 - 18	≥ 19
Lincosamidas	2 μg	≤ 8	9 - 11	≥ 12
Quinolonas	5 μg	≤ 13	14 - 18	≥ 19
Aminoglicosídeos	30 μg	≤ 13	14 - 17	≥ 18

Fonte: Adaptado de Charteris et. al., 1998

4.5 – Análise Proteômica

A análise proteômica foi realizada no Aquacen, Laboratório Oficial Central do Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), sediado na Escola de Veterinária da UFMG, utilizando o aparelho Microflex™ MALDI-TOF -MS da Bruker Daltonics (Fig. 7) e banco de dados correspondente. A matriz utilizada foi a α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid suitable for MALDI-TOF MS (Sigma-Aldrich®).



Figura 7. Aparelho Microflex™ MALDI-TOF -MS da Bruker Daltonics

4.6 - Delineamento experimental:

O ensaio das análises foi conduzido no delineamento experimental inteiramente ao acaso em parcelas subdivididas, sendo as parcelas representadas pelo grupo controle e grupos de galinhas tratadas com os diferentes antimicrobianos (doxiciclina, lincomicina, oxitetraciclina e enrofloxacina) e as subparcelas os dias de coleta dos ovos (zero, três, seis, 15 e 25 dias). Para cada tratamento foram utilizadas seis repetições compostas por um pool de cinco ovos cada (5 tratamentos x 6 repetições x 5 dias de coleta) por micro-organismo pesquisado.

As contagens de *Enterococcus* spp. provenientes das cascas dos ovos de cada tratamento foram transformadas em logaritmo (Log_{10}) e os resultados encontrados foram comparados pelos testes de Kruskal Wallis e Friedman em nível de significância de 5%. Para as análises estatísticas foi utilizado o programa estatístico © Infostat Statistics Base ver. 2016.

Para a pesquisa de *Salmonella* spp. os resultados foram analisados por meio de estatística descritiva.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG em 09 de dezembro de 2015 (número de aprovação: 400/2015).

5 – Resultados e Discussão

5.1 – Isolamento e contagem de *Enterococcus* spp. na casca dos ovos

Os resultados da pesquisa de *Enterococcus* spp. nos ovos provenientes das poedeiras tratadas com os antimicrobianos: oxitetraciclina, doxiciclina, lincomicina e enrofloxacina, demonstraram que este micro-organismo está presente na casca dos ovos. Das 150 amostras analisadas, 97,32% apresentaram contagem para *Enterococcus* spp., sendo confirmados para o gênero por meio das análises de proteômica. Este resultado, ainda, corrobora a seletividade do meio de cultura utilizado, o ágar Enterococcosel, cuja formulação padrão é voltada para o isolamento de enterococos. Este meio apresenta duas peptonas em sua composição, que fornecem os nutrientes. Os micro-organismos hidrolisam a esculina, também presente, em esculina e glucose. A esculina resultante, reage com um sal de ferro (citrato férrico), que funciona como um indicador, produzindo um complexo castanho ou preto (fig. 8). A presença de Oxgall serve para inibir outras bactérias gram-positivas que não os enterococos (BD, 2013).

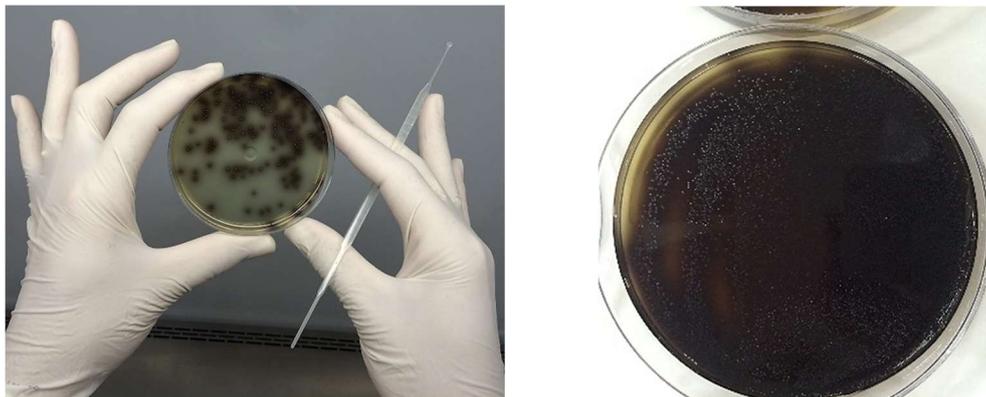


Figura 8 - Crescimento de *Enterococcus* spp. em ágar Enterococcosel em diferentes diluições

Os resultados da contagem de *Enterococcus* spp. estão representados na Tabela 2.

Não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) na contagem de *Enterococcus* spp. entre os tratamentos. No entanto, ao comparar os períodos, em cada parcela, percebe-se uma alteração no número de enterococos isolados, caracterizada por um discreto aumento na contagem a partir dos dias posteriores ao dia zero, em todos os tratamentos. Provavelmente, no dia zero havia uma maior diversidade da microbiota ambiental presente, supondo a ação de um efeito de exclusão competitiva, que pode ter influenciando a contagem final dos micro-organismos isolados naquele dia. Posteriormente, a presença dos antimicrobianos na dieta, pode ter favorecido a manutenção das espécies mais aptas, dentre eles o *Enterococcus* spp., resultando em um “aumento” da contagem, em relação ao dia zero.

Tabela 2. Resultados (UFC/mL) das contagens de *Enterococcus* spp. isolados das amostras de lavado de casca de ovo

Tratamentos	Mediana				
	Dia 0	Dia 3	Dia 6	Dia 15	Dia 25
Controle	$3,15 \times 10^7$ A	$1,96 \times 10^8$ AB	$2,55 \times 10^8$ B	$2,94 \times 10^8$ AB	$8,20 \times 10^7$ B
Oxitetraciclina	$3,85 \times 10^7$ A	$2,50 \times 10^8$ B	$1,27 \times 10^8$ B	$1,56 \times 10^8$ AB	$3,25 \times 10^8$ B
Doxiciclina	$1,43 \times 10^7$ A	$2,50 \times 10^8$ C	$2,06 \times 10^8$ ABC	$1,79 \times 10^8$ C	$3,85 \times 10^6$ AB
Lincomicina	$6,65 \times 10^7$ A	$2,50 \times 10^8$ AB	$1,57 \times 10^9$ B	$1,66 \times 10^8$ AB	$3,15 \times 10^8$ AB
Enrofloxacina	$1,95 \times 10^7$ A	$2,5 \times 10^8$ C	$8,15 \times 10^7$ AB	$1,70 \times 10^8$ BC	$2,90 \times 10^8$ C
Total	$2,05 \times 10^7$ A	$2,50 \times 10^8$ B	$2,08 \times 10^8$ B	$1,70 \times 10^8$ B	$2,30 \times 10^8$ B

Medianas, seguidas por letras distintas, na linha, são significativamente diferentes ($p > 0,05$).
 Medianas comparadas pelos testes de Kruskal Wallis e Friedman - © Infostat Statistics Base ver. 2016

Enterococcus spp. tem sido proposto como indicador de contaminação fecal em água ou de processamento inadequado dos alimentos. A presença do gênero *Enterococcus* spp. na microbiota do trato gastrointestinal de animais explica a sua ocorrência na superfície da casca do ovo, uma vez que tal gênero bacteriano tem grande capacidade de sobrevivência sendo resistente à variações de temperatura, mudanças no pH e altas concentrações de sal. Além disso é capaz de sobreviver por longos períodos fora do ambiente intestinal do hospedeiro, apresentando sobrevivência maior em relação aos enteropatógenos no solo, vegetais e em alimentos (Franco, 2003).

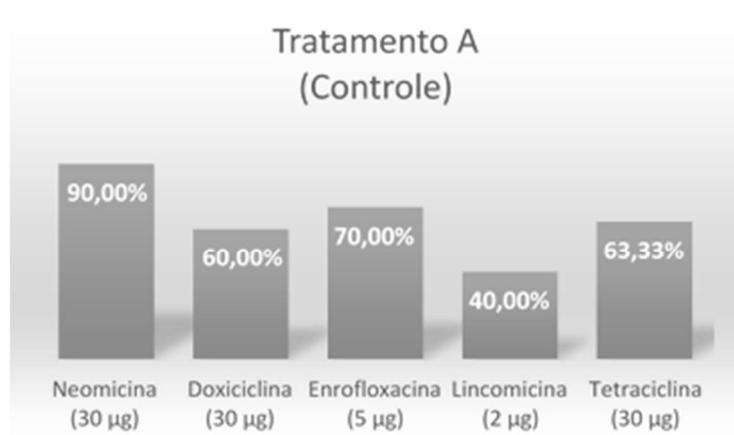
Entretanto, mais do que um indicador da presença de patógenos que podem ser transmitidos, o gênero *Enterococcus* spp. tem assumido importância por serem reservatórios de genes de resistência que podem chegar até a população humana por meio da cadeia alimentar. Não há um parâmetro proposto para enterococos em ovos na legislação brasileira, porém os resultados encontrados no presente estudo demonstraram a prevalência destes, resistentes no ambiente, antes do tratamento com os antimicrobianos nos animais.

5.2 – Perfil de resistência de *Enterococcus* spp.

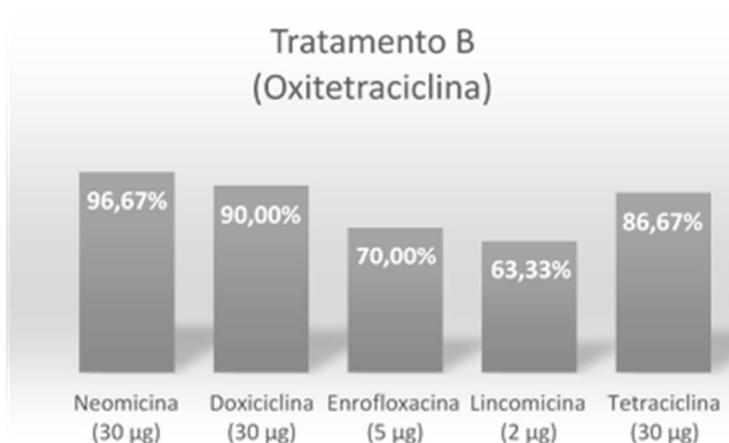
No presente estudo, a avaliação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, pelo teste de disco-difusão, demonstrou a ocorrência de resistência às quatro classes de antimicrobianos testadas: tetraciclina, lincosamidas, quinolonas e aminoglicosídeos.

De acordo com as dietas administradas nesse experimento, não foram observadas diferenças significativas na ocorrência de resistência entre as cepas do gênero *Enterococcus* spp. isoladas, quando comparadas ao grupo controle. Todos os isolados demonstraram resistência, no ensaio de antibiograma, a, pelo menos, um dos antimicrobianos testados, durante todos os períodos, em todos os tratamentos incluindo o dia zero, quando não houve adição de antimicrobiano na ração. A prevalência da resistência antimicrobiana avaliada, de acordo com as dietas, em todo o período do ensaio, está representada na fig. 9.

Figura 9 - Prevalência de resistência antimicrobiana entre os isolados de Enterococcus spp. submetidos à diferentes dietas (tratamentos).



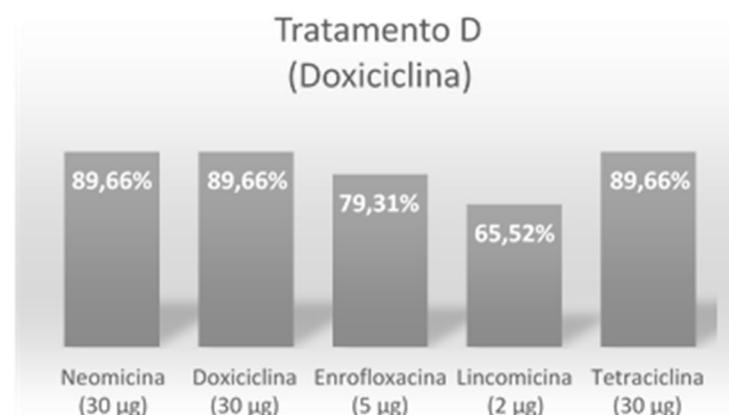
Controle: sem adição de antimicrobianos na ração.



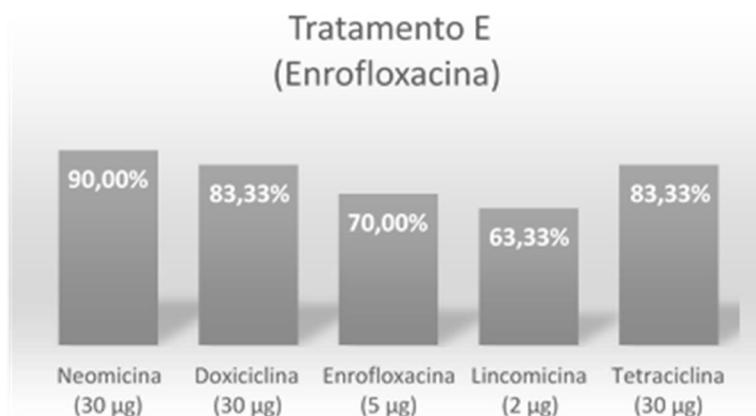
Ração contendo oxitetraciclina



Ração contendo Lincomicina



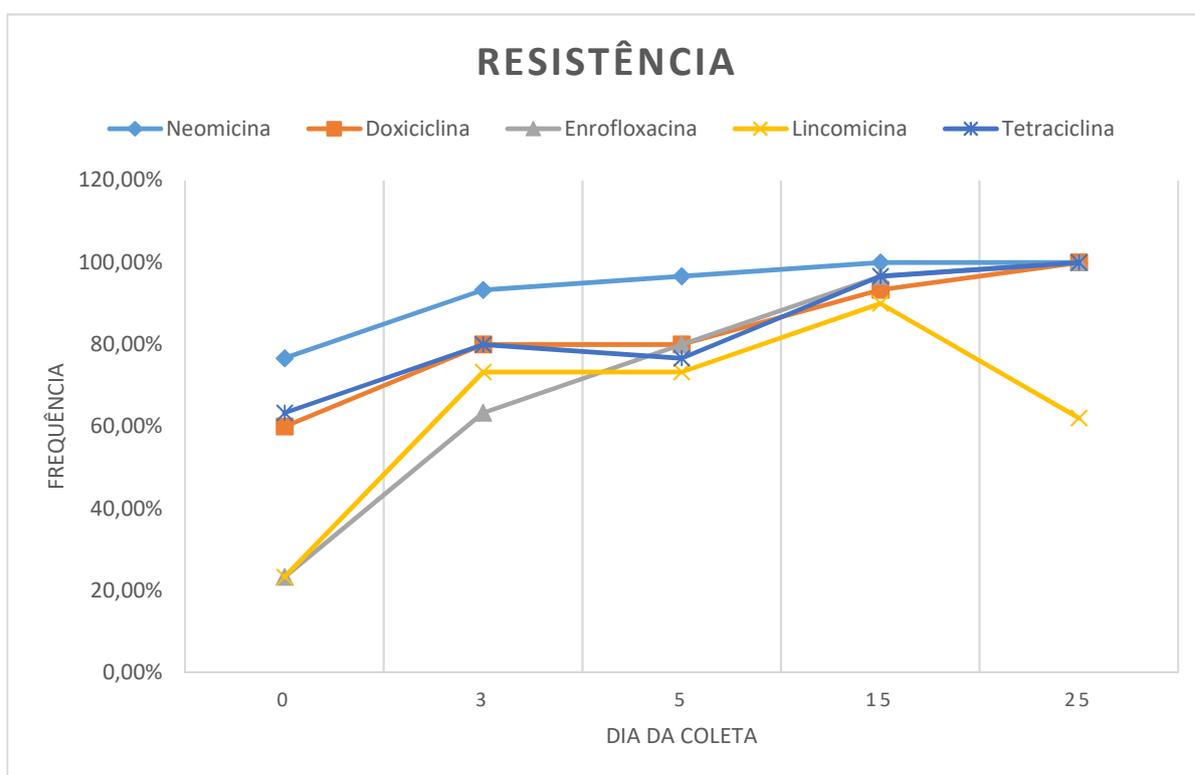
Ração contendo Doxiciclina



Ração contendo enrofloxacina

A resistência de *Enterococcus* spp., aos antimicrobianos testados neste experimento, corrobora a ocorrência de uma manutenção de pressão seletiva por meio do uso de diferentes medicamentos ou outras substâncias na indústria avícola, além do uso terapêutico em humanos e animais. Isso porque a resistência está relacionada aos genes cuja expressão é condicionada pelo meio contendo o antimicrobiano. Os micro-organismos mais aptos às condições ambientais e dos hospedeiros (auxiliados pela colonização intestinal, multiplicação e exclusão competitiva), contribuem para a persistência da resistência, como um reservatório de isolados não suscetíveis. A fig. 10 demonstra a tendência de seleção de micro-organismos resistentes ao longo de todo o período.

Figura 10 - Resistência antimicrobiana entre os isolados de *Enterococcus* spp. ao longo do experimento.



Este resultado sugere, também, que a resistência a certos agentes antimicrobianos pode se submeter a uma seleção cruzada ou co-seleção. A seleção cruzada refere-se à presença de um único gene de resistência ou mutação que confere tal característica a dois ou mais grupos de antimicrobianos que, em geral, pertencem à mesma classe. Já a co-seleção deve-se a existência de genes distintos ou mutações na mesma cepa bacteriana, conferindo resistência à diferentes classes de antimicrobianos (Guardabassi e Kruze 2010).

O uso de fármacos na produção animal intensiva (bovinos, suínos e aves) representa a principal via de entrada de antimicrobianos no ambiente. Esta contaminação pode ocorrer por meio da eliminação de produtos do metabolismo animal (excreção) e, eventualmente, sendo

disseminados de forma indireta no ambiente ou liberados diretamente nas águas superficiais, onde uma carga elevada de resíduos de antibióticos pode acumular-se nos sedimentos, com potencial de alteração dos solos, tanto aquáticos quanto terrestres (Boxall et al., 2003).

A quantidade de antibióticos excretada varia conforme o tipo de substância, a dosagem, a espécie e a idade animal, entre outros fatores (Kemper, 2008). Uma vez no solo, a lixiviação, o escoamento superficial e a erosão podem transportar adiante esses resíduos (Hirsch et al., 1999). A disposição final desses efluentes nos cursos d'água ou o aproveitamento agrícola do efluente ou do lodo como fertilizantes orgânicos, representam importante fonte de exposição à ampla gama de fármacos de uso humano e, ou, animal (Giger et al., 2003; Kim et al., 2007)

A presença do composto antimicrobiano no ambiente atua como mecanismo seletivo, suprimindo os mecanismos suscetíveis e permitindo o crescimento de micro-organismos resistentes aos fármacos. Como consequência dessa pressão seletiva, ao longo de décadas, um amplo espectro de cepas multirresistentes e seus genes de resistência tem-se disseminado.

É importante ressaltar, como outra forma de prevalência de resistência microbiana no ambiente, a relevância e a possibilidade de formação de biofilmes formados por enterococos, principalmente devido a sua resistência à ação dos antibióticos, quando nessa configuração (Mohamed et al., 2007). Existem poucos relatos na literatura. No entanto alguns estudos sustentam a ocorrência de formação de biofilme, destacando a prevalência de *E. faecalis* como o principal formador quando comparado a outras espécies (Arciola et al., 2008; Gomes et al. 2008).

Os fenótipos de resistência encontrados no presente estudo estão de acordo com os observados por diversos autores. *Enterococcus* spp. resistentes à tetraciclina, eritromicina e ciprofloxacina já foram isolados de aves em Portugal (Costa et al., 2007)

A resistência adquirida contra macrolídeos e lincosamidas tem sido frequentemente relatada em enterococos isolados de humanos e animais, por meio de diferentes mecanismos como a modificação do alvo, o efluxo ativo e a inativação enzimática (Cauwerts et al., 2007). A resistência às Lincosamidas é considerada como sendo uma característica intrínseca do enterococos, devido à presença do gene *erm* (B) que medeia a resistência também para macrolídeos (Maasjost et al. 2015). Diversos estudos em aves domésticas em todo o mundo, assim como este, reforçam este fato, sendo a resistência mais frequentemente observada entre *E. faecalis* e *faecium* em relação a Lincomicina e tetraciclina (Yoshimura, 2000; Diarra, 2010; EFSA, 2010; Tremblay et al. 2011).

Han et al. (2011), analisaram 1500 amostras de isolados de enterococos obtidas a partir de fezes de humanos e de animais, destinado a produção de alimentos para o consumo humano, e encontraram um elevado nível de resistência aos aminoglicosídeos. No mesmo estudo, os autores

recomendam a restrição dessa classe antimicrobiana na produção animal, principalmente em aves e suínos, para o controle da disseminação das resistências encontradas.

As fluoroquinolonas atualmente comercializadas para uso em medicina veterinária são tipicamente bem absorvidas após a administração oral, apresentam grande distribuição e penetram em, praticamente, todas as células e tecidos do organismo. No entanto, há o estabelecimento de resistência de forma relativamente rápida em patógenos, tornando o seu uso uma desvantagem. A resistência às fluoroquinolonas desenvolve-se por modificação, diminuição da permeabilidade, efluxo ou proteção do alvo, podendo tais mecanismos ocorrerem simultaneamente na mesma célula, induzindo um grau de resistência muito elevado (Walker e Dowling, 2010).

A resistência adquirida às tetraciclinas está disseminada entre as bactérias e micoplasmas o que tem reduzido consideravelmente a utilidade destes antimicrobianos. Diversos análogos de tetraciclinas estão atualmente disponíveis no Brasil para uso oral: o cloridrato e o fosfato de tetraciclina, a oxitetraciclina, a doxiciclina e a minociclina. A maioria dos micro-organismos resistentes à tetraciclina pode carrear um ou mais genes de resistência (Cauwerts et al., 2006; Kazimierzack et al., 2009). Roberts et al. (2003) verificaram que a resistência à tetraciclina foi um dos fenótipos mais frequentes, encontrados em 65% dos enterococos isolados de amostras clínicas.

Corrêa et al (2005) compararam a resistência antimicrobiana de enterococos isolados de fezes de suínos arraçoados e não arraçoados com tetraciclina e eritromicina e, observaram uma maior porcentagem de cepas resistentes e multirresistentes. Tal efeito foi relacionado à dieta fornecida aos animais. Aarestrup et al., (2000) observaram 95% dos isolados resistentes a tetraciclina e 85% a eritromicina em *E. faecalis* e *faecium* isolados de humanos, suínos e aves.

5.3 - Isolamento e contagem de *Salmonella* spp.

Não foram isolados micro-organismos do gênero *Salmonella* spp. das cascas dos ovos. No entanto, constatou-se, por meio de análise proteômica, a ocorrência de isolamento de diversos micro-organismos de diferentes gêneros e espécies.

Da mesma maneira, no Brasil, a ausência de *Salmonella* spp. em ovos foi observada por outros autores. Baú et al. (2001), ao analisarem 46 amostras de ovos produzidos em granjas e 48 amostras de ovos produzidos em pequenas propriedades, comercializados em supermercados e feiras livres da cidade de Pelotas (RS), não encontraram nenhum resultado positivo para salmonela.

Silva et al. (2004), em Maceió (AL) também não encontraram amostra positiva para *Salmonella* spp. nas cascas e nos conteúdos de ovos de diversos fornecedores distintos. Klein (2010), ao avaliar a qualidade microbiológica de ovos provenientes das três principais

distribuidoras do Estado de Minas Gerais, também não observou a presença de *Salmonella* spp. Figueiredo et al. (2013) não observaram a presença de *Salmonella* spp. em ovos armazenados em temperatura ambiente e sob refrigeração. Menezes (2013) analisou 672 amostras de ovos in natura produzidos em Minas Gerais, coletados pelo serviço de inspeção estadual e federal e também obteve como resultado a ausência de *Salmonella* spp.

Apesar da ausência de isolamento de *Salmonella* spp. proveniente da casca dos ovos analisados, no presente estudo, constatou-se, por meio de análise proteômica, a ocorrência de isolamento de diversos micro-organismos de diferentes gêneros e espécies como *Citrobacter fecundii*, *Cronobacter sakazakii*, *Cupriavidus gelardi*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter cowanii*, *Enterobacter cloacae*, *Erwinia* sp., *Escherichia coli*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia vulneris*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, *Leclercia adecarboxylata*, *Pantoea dispersa*, *Pantoea gaviniae*, *Pectobacterium cypripedii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fulva*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas otitidis*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas stutzeri*, *Serratia marcescens* e *Stenotrophomonas maltophilia*. As principais características conhecidas desses micro-organismos estão representadas no Quadro 2.

De acordo com a literatura bactérias e fungos são os principais micro-organismos responsáveis pelas alterações físico/químicas observadas no ovo após a postura. Entre os gêneros bacterianos mais envolvidos na deterioração desse alimento estão *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Serratia*, *Enterobacter* e *Flavobacterium* (Aragon-Alegro et al., 2005). Os principais patógenos associados na contaminação do ovo são *Salmonella thyphimurium*, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella Pullorum*, *Staphylococcus*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica* (Stringhini, 2008).

Bezerra (1995) observou que ovos de consumo examinados apresentaram contaminação por *Pseudomonas* sp. (mais frequente), *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* e *Escherichia coli* (isolada em todos os ovos independente da procedência). Adesiyun et al. (2006) realizaram análises microbiológicas em ovos coletados de mercados e granjas locais e observaram a presença de diferentes espécies de bactérias sendo *Enterobacter* spp. (3,3%), *Proteus* spp. (2,2%), *Klebsiella* spp. (1,6%), *Serratia* spp. (1,6%), *Pseudomonas* spp. (1,1%), *Citrobacter* spp. (0,5%), *Acinetobacter* spp. (0,5%), *Alcaligenes* spp. (0,5%) e outras enterobactérias (6,0%).

Existem poucos trabalhos sobre a ocorrência de resistência de micro-organismos isolados da casca do ovo, que possam servir de parâmetro para avaliar o comportamento desses fármacos no ambiente de produção. São poucos os estudos realizados, principalmente no Brasil, incluindo aqueles de monitoramento, em escala de campo. É, portanto, fundamental que a pesquisa nacional

e mundial concentre mais esforços, investigando detalhadamente a presença (monitoramento), o comportamento e o possível impacto desses compostos ao homem e ao ambiente.

Quadro 2. – Micro-organismos isolados de amostras de lavado de casca de ovos provenientes da criação de aves realizada na FEPHB da EV/UFMG.

Micro-organismo:	Principais características:
<i>Citrobater fecundii</i>	É um coliforme total que além de ser encontrado nas fezes também pode ser detectado em água tratada que apresente grande concentração de nutrientes.
<i>Cromobacter sakazakii</i>	Em lactentes pode causar bacteremia, meningite e enterocolite necrosante, com taxas de mortalidade elevadas (40-80 %) (CDC, 2002). Algumas infecções neonatais têm sido associadas com o uso de fórmula em pó para lactentes com algumas estirpes capazes de sobreviver em um estado de dessecação durante mais de dois anos
<i>Cupriavidus gelardi</i>	Informações ainda desconhecidas.
<i>Enterobacter aerogenes</i>	Anaeróbio facultativo, prospera em ambientes com pouco ou nenhum oxigênio, tais como esgotos, solo e fezes. Associados a casos de bacteremia, osteomielite, pneumonia e septicemia, além de infecções do trato gastrointestinal, trato respiratório, trato urinário e na pele.
<i>Enterobacter amnigenus</i>	Podem ser isoladas a partir da água ou como contaminantes do trato respiratório, ferida, sangue e fezes. Podem causar septicemia e outras infecções.
<i>Enterobacter asburiae,</i>	Isolados a partir de urina, fezes, fontes respiratórias, feridas em humanos. O significado clínico ainda não é conhecido.
<i>Enterobacter cawani,</i>	Tipicamente encontrado no solo, água e esgoto.
<i>Enterobacter cloacae</i>	Encontrados no ambiente (frutas e vegetais). Comensais da pele humana. São patógenos nosocomiais, que podem causar uma variedade de infecções, tais como a bacteremia, a infecção do trato respiratório inferior, infecções da pele e dos tecidos moles, infecções do trato urinário, endocardite, infecções intra-abdominais, artrite séptica, osteomielite, e infecções oftálmicas. Podem afetar idosos e jovens imunocomprometidos, resultando em casos de hospitalização prolongada na unidade de terapia intensiva.
<i>Erwinia sp.</i>	Associado a vegetais, como um agente saprófito e patogênico. Raramente são isolados de seres humanos.
<i>Escherichia coli</i>	Comensais que raramente causam doenças em hospedeiros saudáveis. No entanto, alguns clones adquiriram atributos de virulência específicos, que conferem a estas bactérias maior capacidade de se adaptar a novos nichos e, dessa maneira, causar um amplo espectro de doenças, dentre elas as diarreias, as infecções do trato urinário e as meningites.
<i>Escherichia hermannii</i>	Encontrado, geralmente nas feridas e fezes de animais. É principalmente um patógeno oportunista. Doenças relatadas incluem septicemia, conjuntivite purulenta, lesões periodontais, infecções cerebrais neonatais, meningite e infecção da ferida.

<i>Escherichia vulneris</i>	Pode colonizar no trato respiratório, trato genital, fezes, e do trato urinário de humanos e outros animais. É frequentemente associada com feridas, principalmente feridas abertas. Raramente tem sido associado a alguns casos de meningite.
<i>Klebsiella oxytoca</i> ,	Comumente referidos como ubíquos e oportunistas na natureza. São patógenos importantes, causadores de uma forma de pneumonia.
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Pode causar pneumonia, embora seja mais comum a sua implicação em infecções hospitalares (aparelho urinário e feridas), em particular indivíduos imunocomprometidos.
<i>Klebsiella variicola</i>	Patógeno gram-negativo causador de um amplo espectro de infecções hospitalares (trato urinário, trato respiratório, intra-abdominal, meningite e abscesso hepático piogênico). A mortalidade em infecção invasiva é elevada, variando entre 17,5 e 23 % (Meatherall et al. 2009; Donnarumma et al. 2011).
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	Agente patogênico humano raramente relatado. Pode afetar indivíduos imunocomprometidos, principalmente nas infecções polimicrobianas.
<i>Pantoea dispersa</i>	Presente em solo, vegetais e água. Raramente causa infecções em seres humanos. No entanto, existem relatos de infecção de recém-nascidos com sepsis de início precoce (Mehtar, 2013).
<i>Pantoea gaviniae</i>	Isolado a partir de fórmula infantil e do seu ambiente de produção. Ainda pouco conhecido.
<i>Pectobacterium cyripedii</i>	Associado à vegetais.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Encontrado em solos e ambientes hostis. É um patogênico oportunista importante causador de infecções hospitalares. Há relatos de resistência natural a um grande número de antibióticos e antissépticos.
<i>Pseudomonas fulva</i>	Associado à vegetais, principalmente cereais.
<i>Pseudomonas luteola</i>	Patógeno oportunista, pode causar bacteremia, meningite, endocardite de válvula protética, peritonite em seres humanos e animais. As infecções associadas a material estranho são altamente resistentes (como próteses infectadas)
<i>Pseudomonas otitidis</i>	É uma bactéria Gram-negativa isolada a partir de pacientes com infecções otíticas.
<i>Pseudomonas putida</i>	Comumente encontrada no solo ou ambientes aquáticos.
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Presente no ambiente atua como desnitrificante. Existem relatos de isolamento como agente patogênico oportunista dos seres humanos.
<i>Serratia marcescens</i>	Ocasionalmente patogênica, causadora de infecções hospitalares e urinárias. Geralmente é resistente a maioria dos antibióticos conhecidos.
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	É uma bactéria incomum, causadora de infecção em humanos, podendo afetar principalmente imunocomprometidos. Encontrada em ambientes aquosos, solo e plantas. Causadora de infecções nosocomiais consideradas de difícil de tratamento.

6– Conclusões

Os resultados da pesquisa de *Enterococcus* spp. e de *Salmonella* spp. na casca de ovos demonstraram que micro-organismos do gênero *Enterococcus* spp. estão presentes e em alta frequência, ao contrário de *Salmonella* spp. que não foi isolada de nenhuma amostra.

A avaliação do perfil de sensibilidade dos micro-organismos do gênero *Enterococcus* spp. isolados da casca dos ovos, demonstrou a existência de resistência bacteriana às quatro classes de antimicrobianos testadas: tetraciclinas, lincosamidas, quinolonas e aminoglicosídeos independentemente do tratamento das aves.

7– Referências Bibliográficas

2002/657/EC: Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, Official J. L221 (2002) 8

ABPA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL, *Relatório Anual* 2015. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais>

ADESIYUN, A.; OFFIAH, N.; LASHLEY, V.; SEEPERSADSINGH, N.; RODRIGO, S.; GEORGES, K. *Prevalence of antimicrobial residues in table eggs in Trinidad*. Journal of Food Protection, v.68, p.1501-1505, 2006.

ALBUQUERQUE R. *Antimicrobianos como promotores de crescimento* In: João Palermo N., Spinosa H.S. & Górnica S.L. (Eds), *Farmacologia Aplicada à Avicultura*. São Paulo Roca, 2005. p.149-159

ALEKSHUN, Michael N.; LEVY, Stuart B. *Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance*. Cell, v. 128, n. 6, 2007 p. 1037-1050.

ALIMENTARIUS, Codex. (CAC/RCP 61-2005). Code of Practice to Minimize and Contain Antimicrobial Resistance 2005.

ANGULO, F. J. et al. *Significance and sources of antimicrobial-resistant nontyphoidal Salmonella infections in humans in the United States: the need for prudent use of antimicrobial agents, including restricted use of fluoroquinolones, in food animals*. In: Agriculture's Role In Managing Antimicrobial Resistance Conference, 1999, Canada. In. *Annals Of The Agriculture's Role In Managing Antimicrobial Resistance Conference*, Canada, 1999, P. 14-28.

ANGULO, F. J. et al. *Origins and consequences of antimicrobial-resistant nontyphoidal Salmonella: implications for the use of fluoroquinolones in food animals*. Microbial Drug Resistance, v. 6, n. 1, 2000, p. 77-83,.

ANVISA, *Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada – Revisão do NCCLS*, 2006. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

ARAGON-ALEGRO, L. C., SOUZA, K. D. O., Sobrinho, P. D. S. C., Landgraf, M., & Destro, M. T. (2005). *Avaliação da qualidade microbiológica de ovo integral pasteurizado produzido com e sem a etapa de lavagem no processamento*. Ciência e Tecnologia de alimentos, 25(3), 618-622.

ARCIOLA, C. R. et al. *Strong biofilm production, antibiotic multi-resistance and high gelE expression in epidemic clones of Enterococcus faecalis from orthopaedic implant infections*. Biomaterials, v. 29, n. 5, 2008, p. 580-586.

ARESTRUP, Frank M.; HASMAN, Henrik. *Susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substances used for disinfection*. Veterinary microbiology, v. 100, n. 1, 2004, p. 83-89.

ARESTRUP, Frank Muller et al. *Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark*. Diagnostic microbiology and infectious disease, v. 37, n. 2, p. 127-137, 2000.

ASSIS, D. M., JULIANO, L., & JULIANO, M. A. *A espectrometria de massas aplicada na classificação e identificação de microorganismos* [http://dx. doi. org/10.5892/rurv. 2011.92. 344355](http://dx.doi.org/10.5892/rurv.2011.92.344355). Revista da Universidade Vale do Rio Verde, 9(2), 2001, p 344-355.

BARBOSA, E. B. et al. *Proteomics: methodologies and applications to the study of human diseases*. Revista da Associação Médica Brasileira, v. 58, n. 3, 2012, p. 366-375.

BATES J., JORDENS Z., SELKON J.B. *Evidence for an animal origin of vancomycin-resistant enterococci*. Lancet. 1993 Aug 21;342(8869): p 490–491.

BAÚ, A. C.; CARVALHAL, J. B.; ALEIXO, J. A. G. *Prevalência de Salmonella em produtos de frango e ovos de galinha comercializados em Pelotas, RS, Brasil*. Ciência Rural, v. 31, n. 2, p. 303-307, 2001.

BD Enterococcosel Agar - *Instruções de utilização – meios em placas prontos a usar* PA-254019.06 Rev.: April 2013 PA-254019.06 -

BELLAVER, C. *O uso de micro ingredientes (aditivos) na formulação de dietas para suínos e suas implicações na produção e na segurança alimentar*. Faculdade de Ciências Veterinárias da Universidade de Buenos Aires, Universidade Nacional de Rio Cuarto e Embrapa Suínos e Aves. In: Congresso Mercosur De Producción Porcina, Buenos Aires, 2000, p. 93-108.

BERTRAND, X. et al. *Common PFGE patterns in antibiotic-resistant Enterococcus faecalis from humans and cheeses*. Food microbiology, v. 17, n. 5, 2000, p. 543-551.

BEZERRA, R. *Recuperação e pesquisa de Samonella spp. E detecção de anticorpos em ovos comerciais de galinha Gallu gallus (Linnaeus, 1758)*. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo1995. 59 f. 1995.

BLANCHFLOWER W. J., MCCRACKEN, R. J., HAGGAN, A. S., KENNEDY, D. G. *Confirmatory assay for determination of tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline, and its isomers in muscle and kidney using liquid chromatography - mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, v.692, 1997, p.351 - 360

BOARD, R. G.; FULLER, R. *Microbiology of the avian egg*. London: Chapman & Hall, 1994. 181 p.

BOERLIN, P.; WHITE, D.G. *Resistência antimicrobiana e sua epidemiologia*. In: GIGUÉRE, S.; PRESCOTT, J.F.; BAGGOT, J.D.; WALKER, R.D.; DOWLING, P.M. *Terapia Antimicrobiana em Medicina Veterinária*, 4ª edição, São Paulo: Roca, 2010.

BONDI, M. C., MARAZUELA, M. D., HERRANZ, S., RODRIGUEZ, E. N. *an overview of sample preparation producers for LC-MS multiclass antibiotic determination in environmental and food samples*, Analical Bioanalytical Chemistry v.395, 2009, p.921-946.

BORSOI, A., & PALERMO-NETO, J. *Uso de antimicrobianos na postura comercial. Problema de saúde aviária ou de saúde pública?* Conference: XIII CONGRESSO APA PRODUÇÃO E COMERCIALIZAÇÃO DE OVOS, At Ribeirão Preto/ São Paulo, Maio 2015.

BOXALL, Alistair BA et al. *Peer reviewed: are veterinary medicines causing environmental risks?*. Environmental science & technology, v. 37, n. 15, 2003, p. 286A-294^a.

BRASIL, *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 9, DE 27 DE JUNHO DE 2003 - Proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol, nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos*. Diário Oficial da União, de 30 de julho de 2003 – ver legenda da tabela

BRASIL. *Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 26, de 9 de julho de 2009. Regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário*. Diário Oficial da União, de 10 de julho de 2009

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos* [online], 2013.

CAC/RPC. *Code of hygienic practice for eggs and egg products*. 2007. Disponível em: http://www.codexalimentarius.org/input/.../CXP_015e.pdf.

CALDEIRA, L. G. P., Caçado, S. d. V., Teixeira, L. V., Martins, N. R. d. S., Oliveira, A. M. G. d., & Rezende, C. P. *Pesquisa de resíduos de antimicrobianos em ovos e validação de método multirresíduos qualitativo e confirmatório por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas sequencial*. Universidade Federal de Minas Gerais. 2012.

CAMARGO, J. C. C.. *Presença de cepas de Salmonella spp. resistentes aos antimicrobianos criticamente importantes usados na produção de aves comerciais no Brasil*. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013. Disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10133/tde-12092014-083405/>

CAMPOS, T. *Resistência antimicrobiana de Enterococcus sp. isolados de carcaças suínas na etapa de pré-resfriamento*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. 2013. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/75665/000891853.pdf?sequence=1>

CAUWERTS, K. *Cloacal Lactobacillus isolates from broilers often display resistance toward tetracycline antibiotics*. Microbiology Drug Resistance v.12, n.4, 2006, p.284-288

CAUWERTS, K.; DECOSTR E, A., DEGRAEF, E.M.; HAESEBROUCK, F.; PASMANS, F. *High prevalence of tetracycline resistance in Enterococcus isolates from broilers carrying the erm(B) gene*. Avian Pathology, v. 36, n.5, 2007, p.395 - 399.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC, *Multistate Outbreak of Human Salmonella Infections Linked to Live Poultry (Final Update)*, [online], 2013. Disponível em: <http://www.cdc.gov/Salmonella/live-poultry-04-13/index.html>

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. *National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria (NARMS): Human Isolates Final Report, 2006*. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC, 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC et al. *Outbreak of Salmonella serotype Enteritidis infections associated with raw almonds--United States and Canada, 2003-2004*. MMWR. Morbidity and mortality weekly report, v. 53, n. 22, 2004, p. 484.

CHARTERIS, William P. et al. *Antibiotic susceptibility of potentially probiotic Lactobacillus species*. Journal of Food Protection®, v. 61, n. 12, 1998, p. 1636-1643.

CHIAPPINI, Elena et al. *Results of a 5-year prospective surveillance study of antibiotic resistance among Salmonella enterica isolates and ceftriaxone therapy among children hospitalized for acute diarrhea*. Clinical therapeutics, v. 24, n. 10, 2002, p. 1585-1594.

CISALPINO E. *Sensibilidade das salmonelas aos antibióticos*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, 1957.

CLSI *Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty Second Informational supplement*, CLSI/ M1 00 -S22, volume 32, nº 3, 2012.

COMPANYÓ, R., GRANADOS, M., GUITERAS, J., PRAT, M. D. *Antibiotics in food: legislation and validation of analytical methods*. Analical Bioanalytical Chemistry, v.395, 2009, p.877 - 891

CONCEIÇÃO, N., OLIVEIRA, C. D. C. H. B., SILVA, P. R. D., ÁVILA, B. G. M., OLIVEIRA, A. G. D.. *Trends in antimicrobial resistance among clinical isolates of enterococci in a Brazilian tertiary hospital: a 4-year study*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 44(2), 2011, p 177-181.

CORPE, W.A. G. BITTON AND K.C. MARSHAL (EDS), JOHN WILEY & SONS. *Microbial surface components involved in adsorption of microorganisms onto surfaces*. In: *Adsorption of microorganisms to surfaces*., Inc, New York, USA, 1980, p.105-144.

- CORRÊA, A.A.; FUENTEFRIA, D.B. E CORÇÃO G. *Resistência a antimicrobianos em enterococos isolados de amostras de fezes de suínos*. Acta Scientiae Veterinariae, 33(2): 2005, p 155-159..
- COSTA GA, HOFER E, CARVALHO MDL. BROOKING C. *Sensibilidade aos antibióticos e quimioterápicos de enterobactérias isoladas de processos diarreicos infantis*. Bol. Inst. P.m. Univ. Brasil; 21: 1961, p 131-138.
- COSTA, P.M.; OLIVEIRA, M.; BICA, A.; VAZ PIRES, P.; BERNARDO, F. *Antimicrobial resistance in Enterococcus spp. and Escherichia coli from poultry feed and feed ingredients*. Veterinary Microbiology . v.120, p.122 -131, 2007.
- COURVALIN, P.; CARLIER, C.; COLLATZ, E. *Plasmid-mediated resistance to aminocyclitol antibiotics in group D streptococci*. Journal of bacteriology, v. 143, n. 2, 1980, p. 541-551.
- DEVRIESE, L. A. et al. *Identification of Enterococcus species isolated from foods of animal origin*. International journal of food microbiology, v. 26, n. 2, 1995, p. 187-197.
- DHIMAN N, HALL L, WOHLFIEL SL, et al: *Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast*. J Clin Microbiol Apr;49(4): 2011, p 1614-1616
- DIARRA, M. S. et al. *Distribution of antimicrobial resistance and virulence genes in Enterococcus spp. and characterization of isolates from broiler chickens*. Applied and environmental microbiology, v. 76, n. 24, p. 2010, p 8033-8043.
- DOYLE, M. E. *veterinary Drug Residues in Processed Meats – Potential Health Risk (A Review of the Scientific Literature)*. 2006. Disponível em http://fri.wisc.edu/docs/pdf/FRIBrief_VetDrgRes.pdf
- DUNNE, E. F. et al. *Emergence of domestically acquired ceftriaxone-resistant Salmonella infections associated with AmpC β -lactamase*. Jama, v. 284, n. 24, 2000, p. 3151-3156.
- DUNNE, W. M.; WANG, Wei. *Clonal dissemination and colony morphotype variation of vancomycin-resistant Enterococcus faecium isolates in metropolitan Detroit, Michigan*. Journal of clinical microbiology, v. 35, n. 2, 1997, p. 388-392.
- DŽIDIĆ, S.; ŠUŠKOVIĆ, J.; KOS, B. *Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspects*. Food Technology and Biotechnology, v. 46, n. 1, 2008, p. 11-21.
- EUROPEAN COMMISSION (EEC) *regulamento n. 1831/2003*. Jornal Oficial da União Europeia, 22 set 2003[online]. Disponível em: <http://europa.eu>.
- EUROPEAN COMMISSION (EEC) *regulamento n° 2377/90 do conselho de 26 de junho de 1990 prevê um processo comunitário para o estabelecimento de limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal* (JO L 224 de 18.8.1990, p. 1)
- EUROPEAN Union *summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2010*. EFSA J., v.10, 2012, p 2598. Disponível em: <www.efsa.europa.eu/efsajournal>.
- FAO/WHO. *Updating the principles and methods of risk assessment: MRL for pesticides and veterinary drugs*. Roma, 2006, 45pp. Disponível em: http://www.gencat.cat/salut/acsa/html/ca/dir1351/dd16211/bilthoven_2005.pdf
- FERNANDES, S. A. et al. *Phenotypic and molecular characterization of Salmonella Enteritidis strains isolated in São Paulo, Brazil*. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, v. 45, n. 2, 2003, p. 59-63 .
- FERREIRA, A. J. P. et al. *Infecção natural e experimental por Salmonella enteritidis em pintos*. In: Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas; Campinas, SP. Anais... São Paulo. 1990. p. 171.
- FEY, P. D. et al. *Ceftriaxone-resistant Salmonella infection acquired by a child from cattle*. New England Journal of medicine, v. 342, n. 17, 2000, p. 1242-1249.
- FIGUEIREDO, T. C. et al. *Quality of commercial eggs submitted to different storage conditions*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 63, n. 3, 2012, p. 712-720,.
- FRANCO, B.D.G.M. *Microbiologia dos Alimentos*, 2ª edição - São Paulo: Atheneu, 2003.

- FRANZ, Charles MAP et al. Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *International journal of food microbiology*, v. 88, n. 2, 2003, p. 105-122.
- FRIEDEN, T. R. et al. *Emergence of vancomycin-resistant enterococci in New York City*. *The Lancet*, v. 342, n. 8863, 1993, p. 76-79.
- FURTADO, G. H. C. et al. *Incidência de Enterococcus resistente à vancomicina em hospital universitário no Brasil*. *Revista de Saúde Pública*, v. 39, n. 1, 2005, p. 41-46.
- GAMA, B. A. *Análise da resistência antimicrobiana e de genes de virulência de Enterococcus spp.* Tese de Doutorado. Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul. 2008.
- GIGER, W. et al. *Occurrence and fate of antibiotics as trace contaminants in wastewaters, sewage sludges, and surface waters*. *CHIMIA International Journal for Chemistry*, v. 57, n. 9, 2003, p. 485-491.
- GIRAFFA, G. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 28, n. 2, 2004, p. 251-260.
- GOETTING, V.; LEE, K. A.; TELL, L. A. *Pharmacokinetics of veterinary drugs in laying hens and residues in eggs: a review of the literature*. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, v. 34, n. 6, p. 521-556, 2011.
- GOMES, B. C. et al. *Prevalence and characterization of Enterococcus spp. isolated from Brazilian foods*. *Food Microbiology*, v. 25, n. 5, 2008, p. 668-675.
- GÓRNIAK, S.L; BERNARDI M.M. *Farmacologia Aplicada a Medicina Veterinária*. 5 ed Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. p 409 – 441.
- GUARDABASSI, L.; KRUSE, H. *Princípios da Utilização Prudente e racional de antimicrobianos em animais*. Guia de antimicrobianos em Veterinária, 2010, p. 17-30.
- GUIBOURDENCHE, M. et al. *Supplement 2003 e 2007 (N. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme*. *Research in Microbiology*, n. 161, 2010 p. 26-29.
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. *Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes*. *Química Nova*, v. 3, n. 3, p.667 - 679, 2010.
- GUSTAFSON, R.H.; BOWEN, R.E. (1997), *Antibiotic use in animal agriculture*. *Journal of Applied Microbiology*, 83: 1997, p 531–541. doi:10.1046/j.1365-2672..00280.x
- HAMMERUM, A. M. et al. *A vancomycin-resistant Enterococcus faecium isolate from a Danish healthy volunteer, detected 7 years after the ban of avoparcin, is possibly related to pig isolates*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 53, n. 3, 2004, p. 547-549.
- HAN, D. et al. *The occurrence of virulence traits among high-level aminoglycosides resistant Enterococcus isolates obtained from feces of humans, animals, and birds in South Korea*. *International journal of food microbiology*, v. 144, n. 3, 2011, p. 387-392.
- HIRSCH, R. et al. *Occurrence of antibiotics in the aquatic environment*. *Science of the Total Environment*, v. 225, n. 1, 1999, p. 109-118.
- HOFER E, VICENTE M.M.A, COLNAGO E.J. *Atividade "in vitro" da ampicilina e tetraciclina sobre amostras de Salmonella h, m, hi*. *Rev Soc Bras Med Troo* 197.7:7:99-105.
- HOFF, R. *Análise de resíduos de sulfonamidas em alimentos por eletroforese capilar e espectrometria de massas*. 134p. Dissertação de mestrado em Biologia Celular e Molecular – Centro de Biotecnologia do estado do Rio Grande do Sul, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul 2008.
- HSIEH, S. Y., TSENG, C. L., LEE, Y. S., KUO, A. J., SUN, C. F., LIN, Y. H., & CHEN, J. K.. *Highly efficient classification and identification of human pathogenic bacteria by MALDI-TOF MS*. *Molecular & cellular proteomics*, 7(2), 2008, p 448-456.
- HUMPHREY, Tom. *Public-health aspects of Salmonella infection. Salmonella in domestic animals*, v. 1, 2000, p. 245-263.

- ITO, N. M. K. et al. *Antimicrobianos: usos preventivos e curativos em avicultura*. Farmacologia Aplicada a Avicultura. Roca. São Paulo, v. 1, 2005, p. 115-147.
- JAY. J.M. *Microbiologia de Alimentos*. Las Vegas. Editora Artmed. 6 ed. 2005. 711p.
- JOINT FAO/WHO CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Codex alimentarius. Food & Agriculture Org., 1994.
- JOINT FAO/WHO/OIE *Expert Meeting on Critically Important Antimicrobials: report of the FAO/WHO/OIE Expert Meeting*, FAO Headquarters, Rome, 26-30 November, 2007
- KAYSER, F.H. *Safety aspects of enterococci from the medical point of view*. International Journal Food Microbiology. N 88: 2003, p 255-262.
- KAZIMIERCZAK, K. A.; SCOTT, K.P.; KELLY, D.; AMINOV, R.I. *Tetracycline resistome of the organic pig gut*. *Applied Environmental Microbiology*, v.75, n.6, 2009, p.1717 - 1722.
- KEMPER, N. *Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment*. Ecological indicators, v. 8, n. 1, 2008, p. 1-13.
- KHARDORI, Nancy. *Antibiotics - past, present, and future*. Medical Clinics of North America, v. 90, n. 6, 2006, p. 1049-1076.
- KIM, S.; AGA, D. S. *Potential ecological and human health impacts of antibiotics and antibiotic-resistant bacteria from wastewater treatment plants*. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, v. 10, n. 8, 2007, p. 559-573.
- KINSELLA, Brian et al. *Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis*. Journal of Chromatography A, v. 1216, n. 46, 2009, p. 7977-8015.
- KLARE I, HEIER H, CLAUS H, WITTE W. *Environmental strains of Enterococcus faecium with inducible high-level resistance to glycopeptides*. FEMS Microbiol. Lett. Jan 1;106(1): 1993, p 23–29
- KLEIN, R. W. T. *Avaliação da qualidade interna de ovos de consumo submetidos a diferentes condições de armazenamento*. 48f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.
- KOBAYASHI, C. C. B. A. et al. *Associated antimicrobial resistance in Enterococcus spp. clinical isolates*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 44, n. 3, 2011, p. 344-348.
- LAX, A. J. et al. *Current perspectives in salmonellosis*. British Veterinary Journal, v. 151, n. 4, 1995, p. 351-377.
- LECLERCQ, R. et al. *Vancomycin resistance gene vanC is specific to Enterococcus gallinarum*. Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 36, n. 9, 1992, p. 2005-2008.
- LEME, I. L. et al. *Glycopeptides susceptibility among enterococci isolated from a poultry farm in São Paulo, Brazil (1996/1997)*. Brazilian Journal of Microbiology, v. 31, n. 1, 2000, p. 53-57.
- LIBBY, S.n J. et al. *The Salmonella virulence plasmid spv genes are required for cytopathology in human monocyte-derived macrophages*. Cellular microbiology, v. 2, n. 1, 2000, p. 49-58.
- LOPES, G. V. *Caracterização de determinantes de resistência a antimicrobianos em isolados de Salmonella enterica subsp. enterica provenientes da cadeia produtiva de suínos no sul do Brasil*. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária 2014. Disponível em: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/95139/000917832.pdf?sequence=1>
- LOT, L.R.T.; BROEK, L.V.D.; MONTEBELLO, P.C.B.; CARVALHO, T.B. de. *Mercado de ovos: panorama do setor e perspectivas*. XLIII Congresso da Sober. “Instituições, Eficiência, Gestão e Contratos no Sistema Agroindustrial”, anais, Ribeirão Preto, 24 a 27 de julho de 2005.
- MAASJOST, J. et al. *Antimicrobial Susceptibility Patterns of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium Isolated from Poultry Flocks in Germany*. Avian diseases, v. 59, n. 1, 2015, p. 143-148.
- MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. *Microbiologia de Brock*. 10º Edição. São Paulo: Prentice Hall, 2004. 608 p.

- MARVIN, L. F., ROBERTS, M. A., & FAY, L. B.. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clinica chimica acta*, 337(1), 2003, p 11-21.
- MAYO CLINIC, Foundation for Medical Education and Research. *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the Identification of Bacterial and Yeast Isolates* S. Theel, 2013.
- MCDONALD, L. C. et al. *Vancomycin-resistant enterococci outside the health-care setting: prevalence, sources, and public health implications*. *Emerging infectious diseases*, v. 3, n. 3, 1997, p. 311.
- MEAKINS, S. et al. *Antimicrobial drug resistance in human nontyphoidal Salmonella isolates in Europe 2000-2004: a report from the Enter-net International Surveillance Network*. *Microbial Drug Resistance*, v. 14, n. 1, 2008, p. 31-35.
- MENEZES, L. D. M. *Caracterização microbiológica de ovos de consumo e de carcaças de frangos produzidos no Estado de Minas Gerais*. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais. 2013.
- MOHAMED, J. A.; HUANG, D. B. *Biofilm formation by enterococci*. *Journal of medical microbiology*, v. 56, n. 12, 2007, p. 1581-1588.
- MONROE, S.; POLK, R. *Antimicrobial use and bacterial resistance*. *Current opinion in microbiology*, v. 3, n. 5, 2000, p. 496-501.
- MOREIRA, N. M. et al. *Identificação e perfil de suscetibilidade de Salmonella sp. isoladas de carcaças de frango comercializadas em distritos de Goiânia*. 2014
- MUNDT, J. O. *Enterococci*. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Edited by P. H. A. Sneath, N. S., Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt. Baltimore: Williams and Wilkins. vol. 2, 1986, p. 1063.
- MURRAY, B.E. *The life and times of Enterococcus*. *Clinical Microbiology*, V.3, 1990, p. 46 – 65.
- OKAMURA, M. et al. *Differences among six Salmonella serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens*. *Avian diseases*, 2001, p. 61-69.
- OLIVEIRA, D. D.; SILVA, E. N. *Salmonella em ovos comerciais: ocorrência, condições de armazenamento e desinfecção da casca*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.52, n.6, 2000, p. 655-661
- OLIVEIRA, S.J. *Guia Bacteriológico Prático: Microbiologia Veterinária*. Ed. Da Ulbra: Canoas, RS, 142p, 1995.
- OLIVEIRA, V. L.; TAHAM, T. *Pesquisa de Salmonella spp. em ovos comercializados na região do Distrito Federal*. *Cadernos de Pós-Graduação da FAZU*, v. 2, 2012.
- OLSEN, S. J. et al. *The changing epidemiology of Salmonella: trends in serotypes isolated from humans in the United States, 1987–1997*. *Journal of Infectious Diseases*, v. 183, n. 5, 2001, p. 753-761,.
- OMIJA, B.; MITEMA, E. S.; MAITHO, T. E. *Oxytetracycline residue levels in chicken eggs after oral administration of medicated drinking water to laying chickens*. *Food Additives & Contaminants*, v. 11, n. 6, 1994, p. 641-647,.
- PALERMO-NETO, J. E TITZE-DE-ALMEIDA, R. *Antimicrobianos como aditivos em animais de produção*. In: Spinosa, H.S., Górnjak, S.L. e Bernardi, M.M.: *Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária*. 3ª ed., Guanabara Koogan. São Paulo, 2002, p. 558-573.
- PALERMO-NETO, J.; SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L. *Farmacologia aplicada à avicultura: Boas Práticas no Manejo de Medicamentos*. Editora Roca Ltda., 2005.
- PAMvet-PR. *Medicamentos Veterinários Utilizados na Avicultura de Postura no Estado do Paraná 2005*. Disponível em: <http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/vigilancia%20sanitaria/relatorio%20avicultra.pdf>
- PASCHOAL, J.A. R. et al. *Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos*. *Química Nova*, v. 31, n. 5, 2008, p. 1190-1198.
- PATURKAR, A. M.; WASKAR, V. S.; MOKAL, K. V.; ZENDE, R. J.: *Antimicrobial drug residues in meat and their public health significance - a review*. *Indian Journal of Animal Sciences* 75(9): 2005, p 1103-1111
- PERESI, J. T. M. et al. *Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por Salmonella Enteritidis*. *Revista de Saúde Pública*, v. 32, n. 5, out. 1998, p. 1-12.

POSYNIAK, A.; MITROWSKA, K. *Analytical procedure for the determination of fluoroquinolones in animal muscles*. Bull Vet. Inst. Pulawy, v. 52, 2008, p. 427-430.

PREBAF. *Relatório do Monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializa das no Brasil*. 2012 disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/73f1990042e128fdb2e4bf348b3626d1/Relat%C3%B3rioPrebaf-vers%C3%A3ofinal-mar2012.pdf?MOD=AJPERES>

RICE, L.B.; SAHM, D.; BONOMO, R.A. *Mechanisms of resistance to antimicrobial agents*. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; JORGENSEN, J.H.; PFALLER, M.A. YOLKEN, R.H., editors. Manual of Clinical Microbiology. Washington DC: ASM Press: 2003, p. 1074-101.

ROBERTS, M.C.; MONCLA, B.J.; HILLIER, S.H. *characterization of unusual tetracycline - resistant gram - positive bacteria*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.35, n.12, 2003, p.155 1557.

SAFFERT RT, CUNNINGHAM SA, IHDE SM, et al: *Comparison of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometer to BD Phoenix automated microbiology system for identification of gram-negative bacilli*. J Clín. Microbiol. 2011

SANTANA, E. S. et al. *Uso de antibióticos e quimioterápicos na avicultura*. Centro Científico Conhecer. 2011. Disponível em: <http://www.conhecer.org.br/enciclop/2011a/agrarias/uso%20de%20antibioticos.pdf>.

SANTOS, I. C. A.; SOUSA, R. V.; SANTANA, G. C. *Princípios da antibioticoterapia em medicina veterinária*. Boletim Técnico da Universidade Federal de Lavras 38, 2001, p 5 - 42. Disponível em: http://www.editora.ufla.br/BolTecnico/pdf/bol_38.pdf

SESTI, L. A.; ITO, N. M. K. *Fisiopatologia do sistema reprodutor*. In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. Doença das aves. Campinas: FACTA, 2000, p. 102, 105, 107.

SILVA, M. C. D.; RAMALHO, L.; FIGUEIREDO, E. T. *Salmonella spp. em ovos e carcaças de frango in natura comercializadas em Maceió*, AL. Higiene Alimentar., v. 18, 2004, p. 80-84.

SPINOSA, H.S.; ITO, N.M.K.; MIYAJI, C.I. *Antimicrobianos: Considerações Gerais*. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M.. Farmacologia Aplicada à Medicina veterinária. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2011, p.409-441

SPISSO, B. F.; PEREIRA, M. U.; FERREIRA, R. G.; et al. *Pilot survey of hen eggs consumed in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil, for polyether ionophores, macrolides and lincosamides residues*. Food Additives and Contaminants B. v. 3, n. 4, 2010, p.212 – 219.

STRINGHINI, M. L. F. et al. *perfil socioeconômico e microbiológico de manipuladores e qualidade de ovos de granjas de produção comercial. Influência da Contaminação Experimental por Pseudomonas aeruginosa sobre a Qualidade de Ovos Não-Lavados e Lavados*. 2008.

TEIXEIRA, L. M. and Facklam, R. R. *Enterococcus*. In: *Manual of Clinical Microbiology* (Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Pfaller, M.A., and Tenover, H. Y., eds.), 8th edn, ASM, Washington, DC, 2003, p. 623-635.

TÉO, C.R.P.A & DE OLIVEIRA, T.C.R.M. *Salmonella spp.: o ovo como veículo de transmissão e as implicações da resistência antimicrobiana para a saúde pública*. Semina: Ciências Agrárias, v. 26, n. 2, 2005, p. 195-210.

THEEL E. S. *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the Identification of Bacterial and Yeast Isolates*. 2013

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. *Microbiologia*. 10.ed. Porto Alegre: Artmed, 2012, p 934.

TREMBLAY, Cindy-Love et al. *Multiple-antibiotic resistance of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium from cecal contents in broiler chicken and turkey flocks slaughtered in Canada and plasmid localization of tetO and ermB genes*. Journal of Food Protection®, v. 74, n. 10, 2011, p. 1639-1648.

VALLEDOR L, JORRIN J. *Back to the basics: maximizing the information obtained by quantitative two dimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate experimental design and statistical analyses*. J Proteomics.;74(1): 2011 p 1-18

WALKER, R.D.; DOWLING, P.M. Fluoroquinolonas. In: GIGUÉRE, S.; PRESCOTT, J.F.; BAGGOT, J.D.; WALKER, R.D.; DOWLING, P.M. *Terapia Antimicrobiana em Medicina Veterinária*, 4ª edição, São Paulo: Roca, 2010.

WALSH, C.; *Antibiotics: Actions, Origins, Resistance*, ASM Press: Washington, 2003.

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.

WILKINS, M. R.; WILLIAMS, K. L.; APPEL, R. D.; HOCHSTRASSER, D. *Proteome research: new frontiers in functional genomics*. Germany: Springer-Verlag, 1997, p 243.

WINOKUR, P. L. et al. *Animal and human multidrug-resistant, cephalosporin-resistant Salmonella isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC β -lactamase*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 44, n. 10, 2000, p. 2777-2783.

WITTE, W.; KLARE, I. *Glycopeptide-resistant Enterococcus faecium outside hospitals: a commentary*. *Microbial Drug Resistance*, v. 1, n. 3, 1995, p. 259-263.

WOLLNIK H. TOF-MS. *Mass Spectrom Rev*. 12(1): 1993; p 89-114.

YOSHIMURA, H. et al. *Antimicrobial susceptibilities of enterococci isolated from faeces of broiler and layer chickens*. *Letters in applied microbiology*, v. 31, n. 6, 2000, p. 427-432.

ZALUZEC EJ, GAGE DA, WATSON JT. *Matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry: applications in peptide and protein characterization*. *Protein Expr. Purif*. 6(2): 1995; p 109-23.

ZOU, L K.; WANG, H N.; ZENG, B.; LI, J N.; LI, X T.; ZHANG, A Y.; ZHOU, Y S.; YANG, X.; XU, C W.; XIA, Q. *Erythromycin resistance and virulence genes in Enterococcus faecalis from swine in China*. *New Microbiologica* v.34, 2011, p.73 80.

ZURHELLE, Georg et al. *Metabolites of oxytetracycline, tetracycline, and chlortetracycline and their distribution in egg white, egg yolk, and hen plasma*. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 48, n. 12, 2000, p. 6392-6396.