

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
CURSO DE MESTRADO EM TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

GERMANA CONRADO DE SOUZA

**DETECÇÃO DE BETALACTAMASES DE ESPECTRO EXPANDIDO (ESBL) EM
CEPAS DE COLIFORMES ISOLADAS DE CARNE DE FRANGO
COMERCIALIZADA NA CIDADE DE FORTALEZA, CEARÁ.**

FORTALEZA

2007

GERMANA CONRADO DE SOUZA

**DETECÇÃO DE BETALACTAMASES DE ESPECTRO EXPANDIDO (ESBL) EM
CEPAS DE COLIFORMES ISOLADAS DE CARNE DE FRANGO
COMERCIALIZADA NA CIDADE DE FORTALEZA, CEARÁ.**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Everardo Albuquerque Menezes.

FORTALEZA

2007

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Ana Cristina Azevedo U. Melo CRB-3/572

S715d Souza, Germana Conrado de

Detecção de betalactamases de espectro expandido (ESBL) em cepas de coliformes isoladas de carne de frango comercializada na cidade de Fortaleza, Ceará / Germana Conrado de Souza .

118 f., il. color., enc.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

Área de Concentração :Microbiologia dos Alimentos

Orientador: Prof. Dr. Everardo Albuquerque Menezes

1. Coliformes 2. Antimicrobianos 3. Betalactamases I.Menezes, Everardo Albuquerque (orient.) II.Universidade Federal do Ceará – Pós-Graduação em tecnologia de Alimentos III. Título

CDD 664

GERMANA CONRADO DE SOUZA

**DETECÇÃO DE BETALACTAMASES DE ESPECTRO EXPANDIDO (ESBL) EM
CEPAS DE COLIFORMES ISOLADAS DE CARNE DE FRANGO
COMERCIALIZADA NA CIDADE DE FORTALEZA, CEARÁ.**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Alimentos.

Aprovada em 24 de agosto de 2007.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Everardo Albuquerque Menezes (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Benedito de Brito Cardoso (Membro)
Faculdade de Tecnologia CENTEC- Limoeiro do Norte

Prof^ª. Dr^ª. Bernadette Dora Gombossy de Melo Franco (Membro)
Universidade de São Paulo - USP

Dedico esta vitória

*“ A Deus que me deu força e determinação
na realização deste trabalho,
aos meus pais, irmãos
e amigos.”*

AGRADECIMENTOS

Embora uma dissertação seja, pela sua finalidade acadêmica, um trabalho individual, há contributos de natureza diversa que não podem nem devem deixar de ser realçados. Por essa razão, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

Primeiramente a Deus por todas as bênçãos que me concedeu, que muitas pessoas chamam de sorte ou de coincidência.

Aos meus pais, Ponciano Fidelis de Sousa e Valda Conrado de Souza, que sempre me apoiaram em cada etapa da minha vida, me ajudando, me incentivando em tudo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Everardo Albuquerque Menezes, pela amizade, orientação e incentivo fundamental para a realização deste trabalho.

Aos professores Dr. Benedito de Brito Cardoso e Dra. Patrícia Maria Pontes Thé pelas excelentes sugestões por ocasião do Exame de Qualificação.

A todos os professores, funcionários e alunos do Mestrado em Tecnologia de Alimentos, e todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desta dissertação, dando-me força, incentivo e principalmente, acreditando ser possível trabalhar o tema escolhido.

Ao Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia pela contribuição com os materiais utilizados.

Ao secretário do curso de mestrado em Tecnologia de Alimentos, Paulo José Mendes de Alencar pela sua maneira gentil de nos atender.

Ao colega e amigo, Francisco Afrânio Cunha, por sua disposição em separar um pouco do seu escasso tempo para me transmitir sua experiência, que foi de grande importância para a conclusão deste trabalho.

À Lia Nascimento Amorim, José Gadelha Lima Neto e Karla Pimenta Soares pela dedicação e disponibilidade no apoio ao desenvolvimento deste trabalho.

À Francilda Rodrigues Guimarães, pela contribuição na realização do trabalho e pelo companheirismo.

Agradeço também, a Faculdade de Tecnologia CENTEC, por ter permitido o meu afastamento, entendendo as razões que me levaram a fazer esta solicitação para realização deste trabalho.

A meus amigos que, de uma forma ou outra, contribuíram com sua amizade e com sugestões efetivas para realização deste trabalho, gostaria de expressar minha profunda gratidão.

À FUNCAP pelo fornecimento da bolsa de estudos que garantiu o sustento financeiro necessário à realização desta dissertação de mestrado.

A algumas outras pessoas não citadas que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse possível.

“ De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos começando, a certeza de que é preciso continuar e a certeza de que podemos ser interrompidos antes de terminar. Fazer da interrupção um novo caminho, fazer da queda um passo de dança, do sonho uma ponte e da procura um encontro... Fica o desejo de boa sorte... Fica a vontade que lutas e venças.”

Fernando Sabino

RESUMO

A cadeia produtiva do frango de corte depende da biossegurança e da qualidade dos produtos que são ofertados à população, visto ser essa a fonte de proteína mais acessível e barata. O intenso processamento de produtos avícolas necessita de constantes averiguações a respeito da sua qualidade microbiológica. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar as condições microbiológicas e de realizar o teste de susceptibilidade antimicrobiana e detecção de bactérias produtoras de ESBL das cepas de microrganismos isoladas das amostras coletadas. No período de abril a novembro de 2006 foram coletadas 80 amostras de carne de frango resfriada e congelada comercializada na cidade de Fortaleza, Ceará. O protocolo microbiológico incluiu a contagem de bactérias aeróbias mesófilas, determinação do NMP de coliformes a 35 °C e a 45 °C, de acordo com a RDC n° 12 de 02 de janeiro de 2001 da ANVISA. Para o teste de susceptibilidade antimicrobianos foi utilizada a técnica de difusão em placas segundo KIRBY-BAUER e CLSI, para detecção de cepas produtoras de ESBL. Os antibióticos usados foram: amicacina (30µg), ampicilina (10µg), ciprofloxacina (05µg), ceftazidima (30µg), estreptomicina (10µg), doxiciclina (30µg), gentamicina (10µg), imipenem (10µg), sulfonamida (300µg) e sulfametoxazol/trimetoprim (25µg). Das 80 amostras analisadas, a contagem de mesófilos variou de $<1,0 \times 10$ UFC/g a $6,3 \times 10^5$ UFC/g, 34 (43%) das amostras foram positivas para coliformes a 35 °C e 17 (21%) para coliformes a 45 °C. Quanto ao teste de susceptibilidade antimicrobiana, o maior percentual de resistência encontrado nas 11 cepas de *Escherichia coli* foi à doxiciclina (91%); 27% das cepas foram 100% sensíveis a amicacina, gentamicina e imipenem. Das 22 cepas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas, a maior resistência foi à ampicilina (94,5%); maior sensibilidade a gentamicina, sulfametoxazol/trimetoprim e amicacina, 94,5%, 94,5% e 90%, respectivamente. Das 19 cepas de *Enterobacter aerogenes*, 90,1% foram resistentes a ampicilina e 95,4% apresentaram sensibilidade a ciprofloxacina. Das 11 cepas de *Escherichia coli*, 22 de *Klebsiella pneumoniae* e 19 de *Enterobacter aerogenes*, apenas 4, 9 e 5 cepas apresentaram o fenótipo produtor de ESBL, respectivamente, e destas somente 3 (33%) das cepas de *Klebsiella pneumoniae* e 3 (60%) das cepas de *Enterobacter aerogenes* foram confirmadas como produtoras de ESBL. Foi possível constatar que a carne de frango apresentaram falhas em relação a qualidade microbiológica, como demonstrado pela presença de elevado número de bactérias aeróbias mesófilas, coliformes a 35 °C e coliformes a 45 °C, sinalizando para o risco potencial de ocorrência de DTA, inclusive por microrganismos multi-resistentes à antimicrobianos e produtores de ESBL. A implementação de um sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), envolvendo todas as etapas do processamento, pode constituir uma medida eficaz para a melhoria da qualidade e segurança do produto.

Palavras-chave: carne de frango, resistência antimicrobiana, ESBL.

ABSTRACT

The poultry processing industry depends on the biosafety and quality of the products offered to the population, and is the cheapest and more affordable source of proteins. The intensive production process of poultry products requires constant microbiological controls. This study was aimed to assess the microbiological conditions of this product and to perform an antimicrobial susceptibility test and the screening of ESBL-producing bacteria on the strains isolated from the collected samples. Between April and November 2006, 80 samples of fresh and frozen poultry meat marketed in the city of Fortaleza were collected. The microbiological protocol included an aerobic mesophile bacterial count, and the determination of the coliform MPN at 35°C and 45°C, according to the ANVISA (National Sanitary Surveillance Agency) resolution RDC 12 of January 02, 2001. The susceptibility test was carried out according to the disk diffusion technique (KIRBY-BAUER), and the screening for ESBL-producing strains was performed by CLSI. The used antibiotics were amikacine (30µg), ampicillin (10µg), ciprofloxacin (5µg), ceftazidime (30µg), streptomycin (10µg), doxycycline (30µg), gentamicin (10µg), imipenem (10µg), sulphonamide (300µg) and sulfamethoxazol/trimetroprim (25µg). The mesophile bacterial count in the 80 tested strains ranged from $<1.0 \times 10$ CFU/g to 6.3×10 CFU/g. 34 (43%) of the samples were positive for coliforms at 35°C and 17 (21%) for coliforms at 45°C. In the 11 *E. coli* strains, the highest resistance was found against doxycycline (91%), while 27% of the strains were 100% sensitive to amikacin, gentamicin and imipenem. Within the 22 *Klebsiella pneumoniae* isolated strains, the highest resistance was against ampicillin (94.5%), with the highest sensitivity to gentamicin, sulfamethoxazol/trimetroprim and amikacin (94.5%, 94.5%, and 90%, respectively). Of the 19 *Enterobacter aerogenes* strains, 90.1% were resistant to ampicillin and 95.4% showed to be sensitive to ciprofloxacin. Of the 11 strains of *Escherichia coli*, 22 of *Klebsiella pneumoniae* and 19 of *Enterobacter aerogenes*, only 4, 9 and 5 strains, respectively, showed to have an ESBL-producing phenotype, and only 3 (33%) of the *K. pneumoniae* strains and 3 (60%) of the *E. aerogenes* strains were confirmed as being ESBL producers. We verified the poultry meat to be microbiologically flawed, as shown by the high number of mesophile aerobic bacteria and coliforms grown at 35°C and at 45°C, being a warning sign for the occurrence of DTA, even by microorganisms resistant to multiple antibiotics and ESBL producers. The implementation of a Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) system involving all the processing stages can be an effective measure in order to improve the quality and safety of this product.

Key words: Poultry meat, antimicrobial resistance, ESBL.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Percentual de amostras de carne de frango resfriada e congelada comercializada na cidade de Fortaleza, Ceará em relação à contagem de bactérias aeróbias mesófilas.....	62
FIGURA 2 -	Percentual de amostras de carne de frango resfriada e congelada comercializada na cidade de Fortaleza, Ceará em relação a coliformes a 35°C.....	63
FIGURA 3 -	Percentual de amostras fora e dentro dos padrões para coliformes a 45°C encontrados em carne de frango resfriada e congelada comercializada na cidade de Fortaleza, Ceará.....	64
FIGURA 4 -	Prevalência das espécies de coliformes isoladas de amostras de carne de frango resfriada e congelada comercializada na cidade de Fortaleza, Ceará.....	64
FIGURA 5 -	Resistência a antibióticos de cepas de <i>Escherichia coli</i> isoladas de carne de frango resfriada e congelada comercializada na cidade de Fortaleza, Ceará.....	66
FIGURA 6 -	Resistência a antibióticos de cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> isoladas de carne de frango resfriada e congelada comercializada na cidade de Fortaleza, Ceará.....	68
FIGURA 7 -	Resistência a antibióticos de cepas de <i>Enterobacter aerogenes</i> isoladas de carne de frango resfriada e congelada comercializada na cidade de Fortaleza, Ceará.....	70
FIGURA 8 -	Percentual de cepas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtoras de ESBL.....	71
FIGURA 9 -	Percentual de cepas de <i>Enterobacter aerogenes</i> produtoras de ESBL.....	71
FIGURA 10-	Coliformes produtores de ESBL.....	72

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Perfil de resistência e sensibilidade a antimicrobianos encontrado nas cepas de <i>Escherichia coli</i> analisadas.....	65
TABELA 2 -	Perfil de resistência e sensibilidade a antimicrobianos encontrado nas cepas de <i>klebsiella pneumoniae</i> analisadas.....	67
TABELA 3 -	Perfil de resistência e sensibilidade a antimicrobianos encontrado nas cepas de <i>Enterobacter aerogenes</i> analisadas.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABEF -	Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frangos
AP -	Água Salina Peptonada
APPCC -	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
BPF -	Boas Práticas de Fabricação
CL -	Caldo Lactosado
CLSI -	Clinical Laboratories Standards Institute
CTI -	Centros de Tratamento Intensivo
DTA -	Doenças Transmitidas por Alimentos
EC -	Caldo <i>Escherichia coli</i>
EMB	Agar Eosina Azul de Metileno
ESBL -	Betalactamases de Espectro Expandido
FIOCRUZ -	Fundação Oswaldo Cruz
HACCP -	Hazard Analysis and Critical Control Point System
HE -	Agar Hektoen
ICMSF -	International Commission on Microbiological Specification for Foods
LIA -	Agar Lisina Ferro
MC -	Agar MacConkey
MH -	Ágar Mueller-Hinton
NMP -	Número Mais Provável
PCA -	Agar Padrão para Contagem
PIB -	Produto Interno Bruto
PICU -	Unidades Pediátricas de Cuidado Intensivo
POP -	Procedimentos Operacionais Padronizados
SC -	Caldo Selenito Cistina
TSA -	Agar Trypticase de Soja
TSI -	Agar Tríplice Açúcar Ferro
TT -	Caldo Tetratoato
UAN -	Unidade de Alimentação e Nutrição
UBA -	União Brasileira de Avicultura
UFC -	Unidades Formadora de Colônias
VB -	Caldo Verde Brilhante 2%
VM -	Prova de Vermelho de Metila
VP -	Prova de Voges-Proskauer
XLD -	Agar Xilose Lisina Desoxicolato

SUMÁRIO

RESUMO	07
ABSTRACT	08
LISTA DE FIGURAS	09
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
1- INTRODUÇÃO	15
2- REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1- Produção, comercialização e consumo de carne de frango	18
2.2- Microbiota da carne de frango	22
2.2.1- Bactérias aeróbias mesófilas	23
2.2.2- Coliformes a 35°C e Coliformes a 45°C	24
2.2.3- <i>Salmonella</i>	26
2.2.4- <i>Staphylococcus aureus</i>	31
2.2.5- <i>Aeromonas</i>	32
2.2.6- <i>Campylobacter</i>	34
2.3- Segurança Alimentar dos produtos avícolas	35
2.4- Pontos Críticos de Controle na contaminação das carcaças	38
2.5- Betalactamases de Espectro Expandido (ESBL)	41
2.5.1- Origem e Evolução.....	41
2.5.2- Caracterização, susceptibilidade e características bioquímicas.....	42
2.5.3- Tipos de ESBL	43
2.5.4- Significado clínico da detecção de ESBL.....	43
2.5.5- Ocorrência, distribuição e disseminação das ESBL.....	44

2.5.6- Fatores de risco	46
2.5.7- Medidas de Controle	46
2.6- Resistência Bacteriana	47
2.7- Agentes antimicrobianos na avicultura	50
3- OBJETIVOS.....	53
3.1- Objetivo geral	53
3.2- Objetivos específicos	53
4- MATERIAL E MÉTODOS	54
4.1- Obtenção das amostras.....	54
4.1.1- Preparo das amostras	54
4.2- Análises microbiológicas	55
4.2.1- Contagem Padrão em Placas	55
4.2.2- Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 35°C	56
4.2.3- Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 45°C	56
4.3- Identificação das cepas bacterianas	57
4.3.1- Prova do Citrato de Simmons	57
4.3.2- Prova do Vermelho de Metila (VM)	58
4.3.3- Prova do Voges-Proskauer (VP)	58
4.3.4- Prova de descarboxilação da lisina.....	58
4.3.5- Prova de H ₂ S, indol e motilidade.....	59
4.3.6- Prova da fenilalanina.....	59
4.3.7- Prova de hidrólise da uréia.....	59
4.4- Testes de Sensibilidade a Antibióticos	60
4.5- Testes para detecção de ESBL	60
4.5.1- Detecção de cepas produtoras de ESBL	60
4.5.2- Confirmação de cepas produtoras de ESBL	61
5- RESULTADOS	62

5.1- Contagem Padrão em Placas	62
5.2- Determinação do NMP de coliformes a 35 °C e coliformes a 45 °C	62
5.3- Identificação das cepas	64
5.4- Testes de Sensibilidade a Antibióticos	65
5.4.1- <i>Escherichia coli</i>	65
5.4.2- <i>Klebsiella pneumoniae</i>	67
5.4.3- <i>Enterobacter aerogenes</i>	68
5.5- Detecção de cepas produtoras de ESBL	70
6- DISCUSSÃO	73
6.1- Contagem Padrão em Placas	73
6.2- Determinação do NMP de coliformes a 35 °C e coliformes a 45 °C	75
6.3-Testes de Sensibilidade a Antibióticos	77
6.4- Detecção de cepas produtoras de ESBL	82
7- CONCLUSÃO	87
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
ANEXOS	111

1- INTRODUÇÃO

O Brasil está consolidado pela alta produtividade da atividade agropecuária, dentro da qual a avicultura vem se destacando no cenário internacional. Qualidade e baixos custos são fatores que colocam o Brasil como o 3º maior produtor e maior exportador de frangos do mundo. O estado do Paraná é o maior produtor de frangos (18,6% da produção nacional) e o oeste paranaense é responsável por 47% da produção do estado (1,13 milhões de aves/dia) (ABEF, 2007).

O consumo de carne de aves tem aumentado notoriamente em todo o mundo, em virtude de fatores como a imagem saudável do produto associada pelo seu baixo teor de gordura e alto teor de proteína, disponibilidade crescente de produtos processados à base de carne e seu baixo preço. No comércio brasileiro, as carcaças podem ser encontradas na forma resfriada e congelada. O resfriamento não inviabiliza a presença de bactérias como as do gênero *Salmonella* (PEREIRA *et al.*, 2003).

Como geralmente as condições higiênico-sanitárias no abate de animais, comercialização e consumo das carnes em nosso meio são precários, verifica-se a presença de microrganismos patogênicos, principalmente *Salmonella* em carnes e produtos cárneos, o que constitui um sério risco para a saúde do consumidor, uma vez que estes microrganismos são potenciais causadores de toxinfecções alimentares.

Normalmente, as carcaças de aves contaminadas com *Salmonella* sp apresentam pequenos números de bactérias (<100 UFC/carcaças de ave), a menos que haja um abuso de temperatura, ocorrendo, como conseqüência, uma intensa multiplicação (SIQUEIRA, 1995).

A presença deste gênero, ainda que detectada através de uma única Unidade Formadora de Colônia, em alimento é totalmente inadmissível (SILVA,

2006). Os alimentos mais comumente envolvidos são carne moída, lingüiça e carne de aves (PARDI *et al.*, 1995).

É reconhecido mundialmente que os alimentos de origem animal são os mais importantes na cadeia que envolve as doenças de origem alimentar. Se pudermos identificar esses agentes nos alimentos sob estudo, teremos subsídios para elaborar medidas de controle e prevenir sua distribuição no produto final e, conseqüentemente, impedir sua ingestão pela população, diminuindo o risco de doença e de eliminação ao meio ambiente (DELAZARI, 1998).

A avaliação microbiológica dos alimentos é assunto de interesse, desde o início da microbiologia como ciência. Esta avaliação constitui-se em um dos parâmetros mais importantes para se determinar a qualidade e a sanidade dos alimentos, e é igualmente importante para verificar se padrões e especificações microbiológicas nacionais e internacionais estão sendo atendidas adequadamente (KONEMAN *et al.*, 2006).

As betalactamases de espectro expandido (ESBL) são encontradas mais freqüentemente em algumas espécies de bactérias Gram negativas, principalmente em amostras de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Trata-se de potente enzima mediada por genes localizados em plasmídios e, portanto, com maior facilidade de se disseminar rapidamente para outras enterobactérias, como por exemplo, *Enterobacter spp*, *Serratia spp*, *Proteus spp*, *Citrobacter spp*, *Salmonella spp* e outras. A prevalência da produção de ESBL entre os bacilos Gram negativos varia nos diversos países e também dentro de cada localização geográfica, possivelmente devido ao uso maior ou menor, ou mesmo indiscriminado, de determinados antimicrobianos. No Brasil, estudos recentes demonstram que a produção de ESBL por cepas de *Klebsiella pneumoniae* está ao redor de 40% enquanto que para *Escherichia coli* a taxa é de aproximadamente 8% (FRANCISCO & JEA, 2006).

Atualmente, as ESBL representam o maior grupo de betalactamases estudado mundialmente e têm sido motivo de extensivas investigações

microbiológicas, bioquímicas, genéticas e epidemiológicas (PELCZAR JR. *et al.*, 1996).

A produção de betalactamases de espectro expandido (ESBL) tem sido descrita como um importante mecanismo de resistência a beta-lactâmicos em espécies da Família *Enterobacteriaceae*, e seu achado constitui um dado clínico relevante (FRANCISCO & JEA, 2006).

A detecção laboratorial de produtores de ESBL é importante para uma terapêutica adequada e na implementação de medidas necessárias para evitar a disseminação destes patógenos. As ESBL são enzimas que inativam os beta-lactâmicos, exceto carbapenemas e cefamicinas (REIS *et al.*, 1998).

Portanto, este trabalho visa à execução de análises microbiológicas, testes de sensibilidade a antibióticos, detecção e confirmação de cepas produtoras de ESBL em carne de frango comercializada na cidade de Fortaleza, Ceará, para avaliar a qualidade da carne oferecida aos consumidores.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Produção, comercialização e consumo de carne de frango

A moderna indústria de frangos de corte surgiu somente por volta de 1940 e a carne de frango passou, então, a ser produzida em grandes quantidades. A carne de frango serve como matéria-prima para a produção de diversos alimentos devido ao seu baixo custo e sua excelente qualidade nutricional, entre outros aspectos. Os produtos de carne de frango podem ser encontrados em pedaços, como ingredientes de outros alimentos, na forma de patês, carcaças resfriadas ou congeladas, demonstrando a versatilidade desse alimento que vem por tanto tempo fazendo parte da alimentação humana (CHARLES, 2006).

As vantagens do consumo de carne de frango são muitas. Além de ser uma excelente fonte de proteínas de fácil digestão e alta qualidade biológica, apresenta baixo teor de gorduras compostas por ácidos graxos assimiláveis, é rica em vitaminas, é um produto de fácil aquisição e aceitável por todas as camadas sociais (FIGUEIREDO, 2006).

A demanda mundial de carne de frango aumentou e a produção brasileira acompanhou o crescimento. O crescimento do setor avícola também demonstra mudanças nos hábitos alimentares da população. Este aumento do mercado de carne de aves é significativo desde 1990. De acordo com a Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frangos (ABEF), em 1993, o consumo brasileiro de carne de frango foi de 17,87 kg/habitante (ABEF, 2006b). Já em 2005, este consumo foi de 33,34 kg/habitante demonstrando o aumento da opção pela carne de frango por parte dos brasileiros. O aumento desse consumo pode ser explicado pelo fato da carne de frango apresentar preços mais baixos do que as demais, pelos seus diversos produtos derivados, pelas suas boas características nutricionais, por não haver restrições religiosas ao seu consumo, bem como pela sua forma de produção flexível e relativamente fácil devido ao ciclo curto e intensificado da sua produção (ABEF, 2006a; SILVA, 2006).

Nos EUA, o consumo de carne de frango também é crescente, conforme demonstram as pesquisas do Departamento de Agricultura deste país. Acredita-se que a expansão do consumo continuará em 2006 com a expectativa de atingir 39,2 kg "per capita". Entretanto, a produção interna de carne de frango dos EUA manter-se-á em índices inferiores, favorecendo o Brasil que é um país exportador (ABEF, 2006b).

No Brasil, a cadeia produtiva de carne de frango é uma das mais importantes da agropecuária. Nesta cadeia, podem-se incluir todos os itens do sistema de produção, processamento, mercado atacadista e varejista, ou seja, além das granjas, a genética, a nutrição, a sanidade, os equipamentos, a assistência técnica, os laboratórios de diagnóstico, as cooperativas de crédito, as plantas de abate e processamento, os sistemas de transporte e comercialização, demonstrando que a avicultura de corte de porte empresarial é importante para a geração de renda, emprego e divisas no país (FIGUEIREDO, 2006).

Em 1998, a avicultura brasileira começava a se destacar, dentro das cadeias agro-alimentares, como a de maior eficiência no mundo (SILVA & DUARTE, 2002). Neste ano, o valor do produto interno bruto (PIB) da avicultura de corte no varejo foi de R\$ 3,12 bilhões com ração, R\$1,08 bilhões com salários, R\$ 339 milhões com impostos indiretos e R\$ 100 milhões com pesquisa e desenvolvimento superando o PIB da avicultura de postura (FIGUEIREDO, 2006).

A tecnologia existente no Brasil é bastante avançada e capaz de melhorar sobremaneira a produção avícola nacional. Há espaço para produção de carne em quase todas as regiões do país e o produto apresenta-se competitivo em qualquer mercado. A indústria de frango supriu o aumento da demanda interna e das exportações, por meio do aprimoramento tecnológico da produção, evidenciado pela adoção de algumas medidas, como a constante seleção genética das aves, o que ocasionou o rápido crescimento e uma melhor conversão alimentar das mesmas, além do controle profilático de doenças, responsáveis pelos principais problemas econômicos (UBA, 2006).

A cadeia de produção de carne de frango remunera relativamente bem o trabalho e a produção, contribuindo para o desenvolvimento econômico e social do país. A dimensão e a organização da cadeia de carne de frango do Brasil fizeram com que no ano de 1998, o país se tornasse o terceiro produtor e exportador mundial de carne de frango atingindo 4,7 milhões de toneladas, inferior apenas aos EUA e à China (ABEF, 2006a; FIGUEIREDO, 2006).

Em 1999, a produção mundial de aves elevou-se em quase 3%, continuando a expandir-se de forma mais rápida do que qualquer outro tipo de carne. O aumento foi de aproximadamente 10% no Brasil que, juntamente com os EUA e a China, respondia por mais da metade da produção mundial de aves (BROWN, 2006).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação, de 1991 a 2001, o plantel mundial de aves cresceu, aproximadamente, 36%, enquanto que o de bovinos e o de suínos apresentou um crescimento bem inferior, de 3% e 5%, respectivamente. A produção de carne de aves existe em todos os continentes desde as criações nas granjas até o processamento nas indústrias, sendo que a carne de frango representa mais de 90% do comércio de carne de aves no mundo. O Brasil, os EUA, a China e a União Européia são os principais exportadores de carne de frango. A China, a Rússia, o Japão, a Arábia Saudita e o México encontram-se como os maiores compradores. A produção brasileira de frangos de corte é um dos maiores sucessos do competitivo setor do agronegócio, tornando o Brasil um dos principais países no comércio internacional de carne de frango devido aos investimentos para a obtenção de alta qualidade nos seus produtos. O produto brasileiro possui uma qualidade capaz de atender aos exigentes mercados japonês e europeu, que compram desde cortes até os produtos industrializados. Além disto, o Brasil vende frango inteiro para o Oriente Médio, atendendo também as exigências de procedimentos Islâmicos como o abate Halal (SILVA, 2004; SILVA, 2006).

Os últimos dados da ABEF demonstram que, em 2005, o consumo de carne de frango no mercado interno alcançou 5,9 milhões de toneladas ficando em torno de 33 kg/habitante e que o volume de exportação alcançou a 1,9 milhões de

toneladas (ABEF, 2006b). O Brasil, em 2005, atingiu uma produção de 7,8 milhões de toneladas, o setor avícola apresentou um crescimento de 4,34% e foram abatidos no país 3,71 bilhões de frangos. O número de países compradores da carne de frango brasileira neste ano já era de 122, sendo que 1,92 milhões de toneladas de frangos inteiros e cortes e 37,7 mil toneladas de produtos processados foram exportados neste mesmo ano (UBA, 2006; ABEF, 2006a).

Segundo a União Brasileira de Avicultura (UBA), o setor avícola é o terceiro maior exportador de alimentos do Brasil (UBA, 2006). As estimativas de produção para 2004 foram de 8,4 milhões de toneladas de carne de frango superando em 10,5% a produção de 2003. As exportações brasileiras de frango, em 2004, apresentaram um aumento de aproximadamente 46%, totalizando 2,49 milhões de toneladas. Nesse mesmo ano, a produção avícola cresceu principalmente devido ao aumento do volume de alojamento de matrizes, o que criou condições para o aumento da produção. A projeção para 2007 é de 8,8 milhões de toneladas, 5% a mais do que a produção de carne de frango prevista para 2006 (UBA, 2006; ROCHA, 2007).

A qualidade e a competitividade do produto brasileiro são confirmadas pelo aumento no consumo interno e no volume de carne exportada (ABEF, 2006b). O otimismo do setor que confia no contínuo crescimento do Brasil prevê que o consumo no mercado interno, em 2007, também será favorecido (ROCHA, 2007). Países como a Tailândia, um dos principais afetados pela influenza aviária ou gripe aviária, estão se voltando aos seus mercados internos devido ao embargo de vários países aos seus produtos. Como a Ásia ainda se recupera dos problemas ocasionados pela gripe das aves, o Brasil beneficiou-se disso em 2005, por ser livre dessa doença, e o crescimento da produção do país ter sido sustentado pela contínua demanda internacional (ROCHA, 2007). Alguns estudos relatam que o índice de crescimento demográfico será maior em países que possuem um baixo consumo de carne de aves, por sua vez aumentando a demanda por estas carnes, o que é de grande valor para países exportadores como o Brasil (SILVA, 2006).

A disponibilidade da produção de grãos condiciona a produção de proteínas de origem animal. Nas próximas duas décadas, estima-se um aumento de

30% da demanda mundial de carne. Pelo seu potencial, o Brasil é o país com maior possibilidade de ser o provedor das necessidades mundiais de produtos avícolas no futuro (SCHORR, 2002). A boa qualidade da avicultura brasileira é o resultado do processo de integração bem estruturado entre a indústria e os produtores avícolas (SILVA, 2004).

A globalização da economia é responsável pela necessidade de melhorar as tecnologias utilizadas nas atividades avícolas, pois a competitividade no setor é muito grande e o consumidor, cada vez mais exigente, requer a presença de produtos de alta qualidade. Ao mesmo tempo, com a globalização, a qualidade dos alimentos passou a ser uma questão estratégica primordial nas negociações entre os países, pois constitui razão direta dos lucros ou prejuízos no comércio internacional de alimentos. Isto pode ser observado no nosso dia-a-dia, quando lemos nos jornais notícias da suspensão da compra de determinado alimento por um país, devido à não satisfação de pré-requisitos qualitativos à entrada do mesmo em outros mercados. Não há dúvidas: a qualidade dos produtos alimentícios se tornou instrumento poderoso da guerra comercial entre países que entram em disputa por maior acesso de seus produtos à economia global. Nesse sentido, as disputas do Brasil, como um dos maiores produtores de alimentos em termos mundiais, na Organização Mundial do Comércio, com economias da dimensão da norte-americana e da chinesa não deixa margem a dúvidas (QUEVEDO, 2007; SILVA, 2006).

2.2- Microbiota da carne de frango

A microbiota inicial da carne de frango é muito variada, a maioria dos microorganismos que alteram a carne fresca refrigerada são bactérias psicrotólicas dos gêneros *Pseudomonas* e *Moraxella/Acinetobacter*, estando também presentes espécies anaeróbias facultativas como enterobactérias psicrotólicas *Aeromonas* sp, *Shewanella putrefacins* e microrganismos gram-positivos como *Lactobacillus* sp e *Brochorix thermosphaca*. Na carne de aves podem ser isoladas bactérias mesófilas produtoras de toxinfecções alimentares como *Salmonella* sp, *Clostridium botulinum*,

Clostridium perfringens, *Campylobacter* sp, *Escherichia coli* enterohemorrágica e ainda *Listeria monocytogenes* (SILVA, 1998).

O mecanismo de contaminação da carcaça de aves, durante o processamento, envolve inicialmente a retenção das bactérias numa camada líquida sobre a pele, para que essa camada de microrganismos possa aderir-se convenientemente. A carga microbiana das carcaças de frango e seus derivados são representados por uma microbiota oriunda, principalmente, das aves vivas e, outra parte, incorporada em qualquer uma das etapas do abate ou do processamento. A microbiota da ave viva se encontra essencialmente na superfície externa, espaço interdigital e tegumentos cutâneos, no trato digestivo e, em menor grau, no aparelho respiratório (BOULOS, 1999).

2.2.1- Bactérias aeróbias mesófilas

As bactérias aeróbias mesófilas são constituídas por espécies de *Enterobacteriaceae*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Streptococcus* etc. A contagem padrão em placa (PCA) tem sido usada como indicador da qualidade higiênica dos alimentos, fornecendo também idéia sobre seu tempo útil de conservação (SILVA *et al.*, 1997). Sua presença em grande número indica matéria-prima excessivamente contaminada, limpeza e desinfecção de superfícies inadequadas, higiene insuficiente na produção e condições inapropriadas de tempo e temperatura durante a produção ou conservação dos alimentos (SIQUEIRA, 1995).

A maioria dos microrganismos que se encontra nas aves vivas são os aeróbios mesófilos, e poucos conseguem se desenvolver em temperaturas inferiores a 7° C. Mesmo que os patógenos estejam ausentes e que não tenham ocorrido alterações nas condições sensoriais do alimento, um número elevado de microrganismos indica que o alimento é insalubre, com exceção dos alimentos fermentados (CARDOSO *et al.*, 2005).

2.2.2- Coliformes a 35 °C e Coliformes a 45 °C

A presença de coliformes nos alimentos é de grande importância para a indicação de contaminação durante o processo de fabricação ou mesmo pós-processamento. Segundo FRANCO & LANDGRAF (1996) os microrganismos indicadores são grupos ou espécies que, quando presentes em um alimento, podem fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial de um alimento, além de poder indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento.

Em geral as bactérias do grupo coliformes são prejudiciais para os alimentos, onde sua presença determina inutilidade dos mesmos (FRAZIER, 1976).

A maioria dos coliformes são encontrados no meio ambiente, essas bactérias possuem limitada relevância higiênica, devido ao fato de os coliformes serem destruídos com certa facilidade pelo calor, sua contagem pode ser útil em testes de contaminações pós-processamento. (FORSYTHE, 2002).

O grupo de coliformes é constituído de uma microbiota grandemente associada a carne de aves. Dentre elas, a *Escherichia coli* normalmente alcança populações de 10^2 UFC/g da carcaça sob condições normais de obtenção (DELAZARI, 1998).

A *Escherichia coli* faz parte da microbiota entérica de mamíferos e aves, é uma bactéria Gram negativa, pertencente a família *Enterobacteriaceae*, atuando como um anaeróbio facultativo, pois possui metabolismo respiratório e fermentativo; a maioria das espécies é móvel, possuindo flagelos peritríqueos (FERREIRA & KNOBL, 2000).

Os principais agentes de infecções intestinais entre outros se encontram as enterobactérias, destacando-se como um microorganismo de interesse em alimentos a *Escherichia coli* O157:H7. Sua designação surgiu inicialmente em 1982,

após ter sido implicada como agente etiológico da colite hemorrágica (NASCIMENTO & STAMFORD, 2000).

Bactérias que pertencem ao grupo coliforme têm como habitat o trato intestinal do homem e de outros animais (PARDI *et al.*, 1995; SILVA & JUNQUEIRA, 1995; WANDERZANT & SPLITSTOESSER, 1996) e espécies dos gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* podem persistir por longos períodos e se multiplicarem em ambientes não fecais (SIQUEIRA, 1995). Essas bactérias são prejudiciais para os alimentos, onde sua presença determina inutilidade dos mesmos (FRAZIER, 1976). *E. coli* é o mais importante indicador de contaminação fecal (VANDERZANT & SPLITSTOESSER, 1996), embora possa ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não fecais (SILVA & JUNQUEIRA, 1995).

O grupo dos coliformes totais inclui todas as bactérias na forma de bastonetes gram-negativos, não esporogênicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 a 48 horas a 35°C. Esta definição é a mesma para o grupo de coliformes fecais, porém, restringindo-se aos membros capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 horas a 44,5-45,5°C (SILVA & JUNQUEIRA, 1995; SILVA *et al.*, 1997).

O índice de coliformes totais avalia as condições higiênicas e o de coliformes fecais é empregado como indicador de contaminação fecal e avalia as condições higiênico-sanitárias deficientes, visto presumir-se que a população deste grupo é constituída de uma alta proporção de *E. coli* (SIQUEIRA, 1995).

Segundo SIQUEIRA (1995) o índice de coliformes fecais é utilizado como indicador de contaminação fecal, ou seja, de condições higiênico-sanitárias, visto que a população deste grupo é constituída de uma alta proporção de *Escherichia coli*, que tem seu habitat exclusivo no trato intestinal do homem e animais. Além disso, indicam condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento, e altas contagens podem significar contaminação pós-processamento, limpezas e sanificações deficientes, tratamentos térmicos ineficientes.

A presença de Coliformes totais e *Escherichia coli* em alimentos processados segundo SILVA *et al.* (1997) é considerada uma indicação útil de contaminação pós-sanitização ou pós-processo, evidencialmente práticas de higiene e sanificação aquém dos padrões requeridos para o processamento de alimentos.

2.2.3- *Salmonella*

A denominação *Salmonella* sp compreende bacilos Gram negativos não produtores de esporos anaeróbios, produtores de gás a partir de glicose (exceto *S. typhi*) e que são capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono. A maioria é móvel, através de flagelos, exceção feita à *S. pullorum* e à *S. gallinarium*, que são imóveis (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Inúmeros surtos de infecção alimentar por *Salmonella* são conhecidos, envolvendo os mais variados tipos de alimentos, principalmente os de origem animal. Os alimentos que comumente servem de veículo da salmonelose ao homem são os ovos, a carne de aves e outros tipos de carnes e seus derivados (JAY, 2000).

Atualmente, *Salmonella* é um dos microrganismos mais frequentemente envolvidos em casos de doenças de origem alimentar em diversos países, inclusive o Brasil, apesar da dificuldade de uma real avaliação em nosso país, uma vez que notificação de doenças por alimentos não é obrigatória (PICCOLO *et al.*, 1992). Dados publicados nos Estados Unidos, Canadá e Japão indicam que os relatos de ocorrência de salmoneloses de origem alimentar aumentam a cada ano, enquanto na Inglaterra e países vizinhos 90% dos casos são causados pela referida bactéria (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Salmonella sp está amplamente distribuída na natureza, sendo o trato intestinal do homem e de animais o principal habitat natural. Entre os animais, as aves são as mais significativas, pois são portadoras assintomáticas, excretando continuamente *Salmonella* sp por meio das fezes. Animais, nestas condições,

causam contaminações cruzadas de grande importância nos abatedouros, assim como a sua manipulação inadequada ou qualquer outra falha que venha ocorrer durante o processamento. Os sintomas de salmonelose caracterizam-se por diarreia, febre, dores abdominais e vômitos (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

A ocorrência e a quantidade de *Salmonella* presente na carne variam de acordo com as condições de manejo durante a criação e com os cuidados higiênicos nas operações de abate dos animais e posterior manipulação das carcaças. Apesar dos avanços tecnológicos, a carne de frango ainda é passível de contaminação bacteriana, especialmente por microrganismos do gênero *Salmonella* que se encontram albergados no trato intestinal podendo contaminar as carcaças bem como outros produtos caso o processo de abate não seja realizado com cuidados higiênicos (CARVALHO & CORTEZ, 2005).

Apesar do aparecimento de novos microrganismos no cenário das enfermidades transmitidas por alimentos, a *Salmonella* ainda ocupa lugar de destaque nas estatísticas epidemiológicas. Em levantamento realizado no Reino Unido no período de 1992 a 1998, ocorreram 4.012 surtos de doenças infecciosas intestinais; a incidência deste microrganismo foi responsável por 22% destes surtos. Na América Latina, *Salmonella* sp foi a segunda maior causa de infecções veiculadas por alimentos no período de 1995 a 1998 (SANTOS *et al.*, 2003a).

No período entre 1985 e 1996, GELLI *et al.* (1998) verificaram que das cepas de *Salmonella* isoladas no estado de São Paulo, 34% eram provenientes de carnes vermelhas e derivados, 31,5% originadas de aves e derivados e 10,6% encontradas em ovos e derivados. As demais estavam presentes em diferentes alimentos.

Em um levantamento realizado pelo PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE DO REINO UNIDO (2007) no período de 1992 a 1998, do total de 4012 surtos de doenças infecciosas intestinais ocorridas na Inglaterra e País de Gales, *Salmonella* sp foi o mais freqüente microrganismo incriminado, sendo responsável por 879 (22%) surtos.

O gênero *Salmonella* inclui vários sorotipos patogênicos para o homem e animais. Este gênero pertence à família das *Enterobacteriaceas* e as principais fontes de infecção são fezes humanas e de animais (FRANCO & LANDGRAF, 1996). Os sorotipos mais associadas às infecções alimentares são *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium*. Até 15 anos atrás as estatísticas mostram que a frequência de isolamentos de *Salmonella enteritidis* em humanos em vários países, raramente ultrapassou 5% do total das salmonelas implicadas em casos clínicos. A partir da segunda metade dos anos 80 a casuística aumentou de forma alarmante. A Argentina registrou 150 surtos em humanos entre 1986 e 1993 e no Brasil a frequência de achados de *Salmonella enteritidis* no início dos anos 90 pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) também reflete um crescimento (REIS *et al.*, 1994).

A *Salmonella enteritidis* é o segundo sorotipo mais comumente encontrado em alimentos. Nos últimos anos, tem-se observado um aumento da incidência de salmonelose causada por *S. enteritidis*, envolvendo ovos e produtos a base de ovos. Esse sorotipo tem a peculiaridade de colonizar o canal ovopositor das galinhas, causando a contaminação da gema durante a formação do ovo (LANDGRAF & FRANCO, 1996). É hoje em alguns países o principal sorotipo isolado de produtos avícolas e amostras clínicas de pacientes com gastroenterites devido a surtos alimentares (CAPITA *et al.*, 2000; OLSEN *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2003b). Nas últimas duas décadas este sorotipo representou de 0,4-1% de todos os sorotipos isolados de infecção humana, mas a partir de 1993, passou a ser isolado com maior frequência, alcançando em 1996, 55% das cepas de materiais humanos e 32,7% daqueles de origem não humana (OLSEN *et al.*, 2003; TAVECHIO *et al.*, 2002).

No Brasil até o início de 1990, a *Salmonella enteritidis* era apenas mais uma salmonela raramente responsável por toxinfecções alimentares (TAUNAY *et al.*, 1996). A partir de 1993 houve uma explosão da ocorrência de *Salmonella enteritidis* em humanos (TAVECHIO, 1996). Nos anos de 1994 e 1995 pesquisadores demonstraram que os produtos avícolas eram os mais contaminados por *Salmonella enteritidis* (IRINO, 1996).

A presença de *Salmonella enteritidis* no alimento não significa, necessariamente que haverá a contaminação do consumidor. No entanto, as chances de ocorrência de uma infecção alimentar aumentam, caso os alimentos não sejam manipulados corretamente. A manipulação inadequada pode favorecer a multiplicação bacteriana, aumentando o número de bactérias ingeridas (NADVORNY *et al.*, 2004).

As salmonelas que causam toxinfecções alimentares são classificadas em mais de 2000 sorotipos capazes de infectar o homem e os animais. Elas atingem os alimentos direta ou indiretamente, através dos excrementos dos animais na hora do abate, como também dos excrementos de pessoas ou água poluída. Nas cozinhas, elas podem ser transferidas dos alimentos crus para os cozidos, pela manipulação, superfícies, utensílios e outros equipamentos (DELÚ *et al.*, 2006).

Quando as salmonelas estão presentes no alimento, em geral, a quantidade é pequena em relação ao restante da microflora, por conseguinte, torna-se necessário o emprego de meios de pré-enriquecimento seletivos para melhor isolamento (ALBUQUERQUE *et al.*, 2000).

Normalmente as carcaças contaminadas com *Salmonella* sp apresentam pequenos números de bactérias (<100 UFC/carcaças de ave), a menos que haja um abuso de temperatura ocorrendo como conseqüência, uma intensa multiplicação (MEAD, 1989). A presença deste gênero ainda que detectada através de uma única unidade formadora de colônia em alimento é totalmente inadmissível (SILVA *et al.*, 1997). O Codex Alimentarius recomenda a ausência de qualquer sorovar de *Salmonella* em 25 gramas da amostra analisada (SILVA & DUARTE, 2002).

A carga microbiana de carcaças de frangos e seus derivados é representada por uma microbiota oriunda, principalmente, das aves vivas ou incorporadas em qualquer uma das fases do abate, sendo as mais críticas a escaldagem, a depenagem e a evisceração (ALMEIDA & SILVA, 1992). Estudos mostram um aumento significativo na incidência de *Salmonella* nas carcaças ao final da etapa de resfriamento, indicando que esse pode ser o ponto de maior

significância em contaminação cruzada dentro do processamento de carnes de frango (LILLARD, 1990).

KVENBERG & ARCHER (1987) afirmaram que grande parte das doenças de origem alimentar, são provocadas por *Salmonella* spp, ocasionadas pela ingestão de carnes ou produtos derivados, submetidos à cocção em temperaturas inferiores às recomendadas para destruir esse microrganismo.

A contaminação de frangos por *Salmonella* sp pode estar relacionada com a forma em que os mesmos são transportados. As aves normalmente são confinadas e aglomeradas em caixas por longas distâncias em condições inadequadas no aspecto sanitário, aumentando assim o risco de contrair infecções cruzadas por salmonelas. As operações de abate e processamento das carcaças também contribuem para a disseminação e multiplicação das salmonelas que podem ocorrer por meio da água de escaldagem, no processo de depenagem, na contaminação cruzada de equipamentos e utensílios contaminados, no manuseio inadequado durante o corte e evisceração e no acondicionamento que normalmente é realizado à temperatura ambiente até a sua comercialização (TIROLLI & COSTA, 2006).

Nos trabalhos de inspeção sanitária e controle de qualidade, é grande o interesse na avaliação do diagnóstico, controle e medidas preventivas, quer pelo risco da ocorrência nos processamentos associados ao mercado interno, quer pelas exigências dos importadores de carnes e derivados (CARDOSO *et al.*, 2000).

Portanto, é de fundamental importância a sua avaliação e o estabelecimento de medidas preventivas necessárias para evitar a contaminação por *Salmonella* sp mediante programas de controle de qualidade e segurança alimentar como as Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC).

2.2.4- *Staphylococcus aureus*

Na microbiologia de alimentos, *Staphylococcus aureus* merece destaque pela sua freqüência e devido às intoxicações alimentares causadas pelo consumo de alimentos contendo enterotoxinas termoestáveis. De acordo com BERGDOLL, (1999) as enterotoxinas estafilocócicas são proteínas de baixo peso molecular que varia de 27000 a 29000 daltons. São classificadas sorologicamente em SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED, SEE, SEG, SEH, SEI e SEJ (CARMO *et al.*, 2002). Novas enterotoxinas estão sendo estudadas como SEK (ORWIN *et al.*, 2001), SEL (ORWIN *et al.*, 2003), SEM, SEN, SEO (JAURRAD *et al.*, 2001; LOIR *et al.*, 2003) e SEU (LETERTRE *et al.*, 2003).

A contaminação de carcaças de frango tem importantes implicações para a segurança e o tempo de prateleira do produto (CAPITA *et al.*, 2001). Os microrganismos dos produtos de origem animal procedem de sua flora superficial, de suas vias respiratórias e do tubo gastrintestinal. A pele de muitos animais produtores de carne pode conter microrganismos como *Micrococcus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* beta-hemolíticos (FRAZIER & WESTHOFF, 2000).

A carne de frango (com elevado teor protéico) tem sido implicada em vários casos de intoxicação alimentar, inclusive por *Staphylococcus aureus* (SHIOZAWA *et al.*, 1980; ABU-RUWAIDA *et al.*, 1994).

Os produtos cárneos são considerados de qualidade microbiológica aceitável quando atendem critérios determinados pela legislação vigente. A Portaria nº 451/97 do Ministério da Saúde (BRASIL, 1997) estabelecia como norma para carne de aves a ausência de *Salmonella* em vinte e cinco gramas do produto. Tal Portaria foi revogada pela Resolução nº 12/01, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2001), que determina apenas a contagem de coliformes a 45°C, não considerando microrganismos importantes como *Salmonella* e *Staphylococcus aureus*.

2.2.5- *Aeromonas*

Segundo SCHOFIELD (1992) grande parte das toxinfecções alimentares é causada por espécies de bactérias que não são comumente pesquisadas durante as investigações de surtos. Entre essas bactérias estão as *Aeromonas* móveis (HANDFIELD *et al.*, 1996).

FIGURA & MARRI (1985) e KIROV (1993) afirmaram que as *Aeromonas* podem chegar aos alimentos pela água contaminada, fezes de animais que albergam a bactéria e pessoas doentes ou portadoras que manipulam alimentos. Segundo os autores, há ainda a possibilidade de contaminação das carcaças pelo conteúdo gastrointestinal no momento da evisceração.

A água é considerada habitat natural do gênero *Aeromonas* e exerce papel de extrema importância como fonte de contaminação dos alimentos de origem animal (HÄNNINEN & SIITONEN, 1995). *Aeromonas* foram isoladas de águas cloradas e não cloradas, 4,6 e 42,4%, respectivamente, conforme resultados obtidos por FUZIHARA *et al.* (1995) em pesquisa realizada no interior do Estado de São Paulo.

Diferentes estudos têm evidenciado a ocorrência de *Aeromonas sp* em alimentos de origem animal (PIN *et al.*, 1994; ROSSI JÚNIOR, 1998), e em relação à carcaça de frangos e produtos da indústria avícola podem ser citados os trabalhos de CWIKOVÁ *et al.* (1993) e NOCITI *et al.* (1999).

Pouco se conhece sobre o significado dessa bactéria em alimentos de origem animal no Brasil, principalmente sobre as fontes de contaminação e sua disseminação para a carne de frango na linha de processamento.

FIGURA & MARRI (1985) e KIROV (1993) afirmaram que as fezes de animais portadores da bactéria são importante fonte de contaminação dos alimentos, o que ressalta a possibilidade de contaminação da carcaça pelo conteúdo gastrointestinal no momento da evisceração, principalmente no sistema automatizado

de abate de aves, decorrente do rompimento do aparelho digestivo no momento da extração.

A presença de *Aeromonas* nas fezes sugere que as aves possam ser portadoras assintomáticas do microrganismo e que podem eliminar esse agente pelas fezes durante o transporte, disseminando-o nas gaiolas que normalmente são transportadas empilhadas, contaminando as penas.

Em trabalho realizado por COSTA & ROSSI JUNIOR (2002) analisando carcaças de frangos, 72% delas apresentaram contaminação por *Aeromonas*, sugerindo serem fontes de disseminação do microrganismo para a água do pré-resfriamento, a qual apresentou 80% de amostras contaminadas. O tanque de pré-resfriamento foi o local de maior isolamento de *Aeromonas*, constituindo-se em importante ponto de contaminação das carcaças que lá são imersas e saem prontas para o consumo. Esse fato foi confirmado por MAY (1974) ao analisar carcaças de frango antes e após a imersão no tanque de pré-resfriamento, e observar que após a imersão houve redução na população microbiana da superfície da carcaça, o que contribuiu para a elevação do nível de contaminação da água do tanque.

Os resultados demonstram que, independentemente do controle higiênico-sanitário adotado no abatedouro, as carcaças de frangos podem se contaminar com bactérias do gênero *Aeromonas* ainda no seu processo de obtenção. As fezes e as penas podem desempenhar papel significativo na disseminação desse microrganismo em todas as fases do abate, inclusive em carcaças resfriadas e prontas para a comercialização, o que pode determinar risco à saúde do consumidor.

2.2.6- *Campylobacter*

Campylobacter é um microrganismo Gram-negativo, geralmente de forma espiralada, não formador de esporos que causa doença no homem e em animais. A maioria das infecções humanas é causada pelo *Campylobacter jejuni*. Esse microrganismo é comum em aves, que albergam esse microrganismo sem ficarem doentes. *Campylobacter* é um microrganismo muito frágil, não suportando a desidratação e a presença de oxigênio. O congelamento reduz o número de *Campylobacter* presente nas carnes cruas (FRANCHIN *et al.*, 2005).

A maioria das infecções por *Campylobacter* possui caráter zoonótico, e os mecanismos de transmissão ocorrem por meio de contato direto com animais domésticos ou do consumo de subprodutos comestíveis de origem animal contaminada pelo microrganismo, sendo esta via de contágio considerada a mais importante. As aves constituem os maiores reservatórios do *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*, e os produtos avícolas comercializados são vistos como importante veículo de transmissão desse agente para o homem (ALTEKRUSE *et al.*, 1994)

Campylobacter jejuni e *Campylobacter coli* são amplamente isolados de animais de sangue quente, mas estão mais bem adaptados às aves, devido às condições favoráveis para suas colonizações no trato gastrintestinal (MODOLO *et al.*, 2005).

Nos últimos anos têm-se reconhecido *Campylobacter jejuni* como uma causa comum de gastroenterite e enterocolite em humanos, principalmente nos países em desenvolvimento (SALEHA *et al.*, 1998), o qual vem se destacando como um dos microrganismos emergentes de origem alimentar em diversas partes do mundo (AQUINO *et al.*, 1995).

Evidências epidemiológicas têm sugerido os produtos de origem animal, especialmente os produtos avícolas, como principal veículo para infecção humana (MACHADO *et al.*, 1994), uma vez que o trato intestinal das aves domésticas tem

sido demonstrado como o principal reservatório de *Campylobacter jejuni* (MACHADO, 1992) e que aproximadamente 30 a 100% das aves transportam este agente no intestino (DOYLE, 1988).

Campylobacter jejuni tem sido detectado a partir de fezes de frangos em 83% (GRANT *et al.*, 1980), 86,8% (JARAMILO, 1983) e 90% (BLASER *et al.*, 1980) das amostras examinadas. Desta maneira, durante o processamento de abate, as carcaças e vísceras comestíveis podem se contaminar e o agente ser detectado no produto acabado e pronto para o consumo (ALMEIDA & SERRANO, 1987; SAKUMA *et al.*, 1992; CARVALHO & COSTA, 1996; CARVALHO, 1998).

De acordo com BAILEY (1993) na granja as principais fontes de contaminação dos lotes, podem ser a ração contaminada, a transmissão horizontal e o ambiente de criação contaminado, envolvendo vetores como roedores, insetos, pássaros silvestres, animais domésticos e o homem.

2.3- Segurança Alimentar dos produtos avícolas

As doenças veiculadas por alimentos, constituem-se hoje em um dos problemas de saúde mais disseminados e uma importante causa da redução da produtividade econômica. A importância destas doenças como um problema real de saúde da população é, no geral, subestimado porque a verdadeira incidência é de difícil avaliação e a severidade das conseqüências à saúde ou à economia não são devidamente analisadas (CARDOSO *et al.*, 2005).

A importância da segurança alimentar para a saúde pública está mais do que comprovada, principalmente ao se considerar os dados atuais referentes ao surgimento e reaparecimento de diversas doenças veiculadas por alimentos. No seguimento de produtos cárneos, as exigências do mercado externo impulsionaram diversas medidas visando a qualidade do produto oferecido, o que acabou refletindo no mercado interno, tornando os consumidores mais conscientes da importância da qualidade do produto adquirido (NASCIMENTO, 2002).

A higiene dos alimentos é um tópico muito extenso, tendo como objetivo o estudo de métodos para a produção, preparo e apresentação dos alimentos com segurança e qualidade (HOBBS & ROBERTS, 1993).

Apesar de exaustivos esclarecimentos sobre higiene dos alimentos, visando à prevenção de doenças de origem alimentar, a incidência de surtos e casos esporádicos de contaminações alimentares continua a crescer. Esta situação tende a ser mais grave em países em desenvolvimento como o Brasil, onde as condições de infra-estrutura e educação sanitária são precárias (MENDONÇA, 2002).

A contaminação dos alimentos geralmente é proveniente de sua produção, por isso deve-se sempre averiguar a procedência do material e de seu processamento, e as condições em que são manipulados para sua industrialização e comercialização (DELÚ *et al.*, 2006).

Segundo HOBBS & ROBERTS (1993) aproximadamente 70% dos incidentes de toxinfecções alimentares em que o veículo alimentar é estabelecido, pratos à base de carne ou frango são os incriminados, tendo recebido por parte do consumidor muita atenção e preocupação (NASCIMENTO *et al.*, 1996). Pesquisas realizadas em vários países demonstraram que a carne de frango e a carne vermelha são as maiores causadoras de salmonelose. A carne de aves teve seu consumo aumentado nos últimos anos, quer em decorrência da elevação de preços de outras fontes protéicas de origem animal, quer em consequência da alteração dos hábitos alimentares da população (BERCHIERI JR *et al.*, 1993).

A carne, mesmo que seja obtida de animais sadios, pode ser contaminada durante os processos de abate e industrialização, bem como nos locais de comercialização, indicando necessidade de treinamento e orientações corretas de manipulação de alimentos aos pequenos produtores e comerciantes (CHESCA *et al.*, 2004).

Uma das grandes preocupações no abate de aves é a obtenção da carne desses animais com a menor quantidade possível de contaminação, devendo permanecer em níveis baixos durante todo o processamento. Os cuidados

observados em alguns estabelecimentos e indústrias muitas vezes são negligenciados e ainda podem-se encontrar estabelecimentos comerciais que vendem carne de frango em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, fornecendo ao consumidor um produto inadequado (GONÇALVES *et al.*, 1998).

A contaminação de carcaças cruas de aves não é considerada como um risco para o consumidor porque se espera que estas sejam suficientemente aquecidas antes do consumo, eliminando assim o patógeno. Mas no caso de práticas inseguras de manufatura, durante a preparação destes produtos, a sobrevivência e distribuição de *Salmonella* para outros produtos são estimuladas (DELÚ *et al.*, 2006).

É, portanto, bastante preocupante constatar que, apesar de toda evolução tecnológica nas várias fases das cadeias produtivas dos alimentos, nota-se uma ocorrência crescente das enfermidades transmitidas pelos alimentos, quer sejam causadas por contaminação proveniente do local de produção, ou na fase de processamento, comercialização, manipulação inadequada do consumidor, entre outras (RODRIGUES & SALAY, 2000).

Atualmente, o método mais recomendado para garantir a segurança de um produto alimentício denomina-se Sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC) ou Hazard Analysis and Critical Control Point System (HACCP). O APPCC é uma proposta sistematizada de identificação, determinação e controle de perigos, como meio de garantir a produção de alimentos seguros e inócuos para o consumo, cujo principal objetivo é evitar que as falhas ocorram. É um sistema preventivo de controle de qualidade, cujos princípios são aplicáveis a todas as etapas da cadeia alimentar, desde a agricultura básica e pecuária, até a utilização do alimento pelo consumidor. O sistema HACCP não é a solução de todos os problemas de segurança alimentar, sendo apenas uma ferramenta, já que se os dados gerados pela sua implantação não forem adequadamente avaliados e utilizados, o esforço será desperdiçado. No Brasil, as corporações do ramo alimentício devem adotar esse método conforme determina a portaria 1428, de 23 de novembro de 1993.

2.4- Pontos Críticos de Controle na contaminação das carcaças

A contaminação das carcaças de frango “in natura” pode ocorrer durante o abate, por contato entre aves sadias e aves contaminadas, isto é, por contaminação cruzada durante o processo e subsequente preparação das carcaças (HILTON *et al.*, 1986).

Como os alimentos *in natura* podem conter microrganismos, a preservação de alimentos requer o conhecimento de como controlar o crescimento e atividade microbiana em vários produtos alimentícios. O tipo de alimento e os métodos de processamento e estocagem podem favorecer a contaminação por certos grupos de microrganismos em detrimento de outros. Além disso, muitos gêneros alimentícios são excelente meio de cultura para os microrganismos, os quais se tiverem condições adequadas, irão se desenvolver e causar alterações nos alimentos, tanto *in natura* como industrializados (FRANCO & LANDGRAF, 1996).

A carne de aves é veículo importante de bactérias patogênicas em surtos de toxinfecções alimentares e as aves que são encaminhadas para o abate normalmente é a fonte inicial de contaminação. Em condições de pré-abate, os contaminantes estão concentrados nas vísceras, superfície da pele e penas. No entanto em função do processo industrial, a contaminação dissemina-se rapidamente entre as carcaças (LEITÃO, 2002).

Entretanto, esta carne é muito susceptível à deterioração devido ao seu elevado teor em nutrientes, alta atividade de água e pH próximo à neutralidade, fatores estes que possibilitam à proliferação e desenvolvimento dos microrganismos contaminantes, oriundos da própria ave ou de fontes externas, devendo por este motivo, ser mantida sob refrigeração ou congelamento (ICMSF, 1980).

O mecanismo de contaminação da carcaça envolve inicialmente a retenção das bactérias numa camada líquida sobre a pele. Além disso, as condições higiênico-sanitárias no abate e comercialização das carnes em nosso meio são

precárias e com isso aumenta a carga contaminante que constitui um sério risco para a saúde do consumidor (SILVA, 1998).

A incidência e a quantidade desses microrganismos presentes na carne de aves variam de acordo com condições de manejo durante a criação e com os cuidados higiênicos nas operações de abate dos animais e posterior manipulação das carcaças (FRAZIER & WESTHOFF, 2000).

Vários autores salientam a manipulação inadequada como responsável pela maioria das toxinfecções alimentares, incluindo contaminação cruzada, deficiência na higiene pessoal e dos equipamentos e pessoal infectado (GONÇALVES, 1998).

Conforme NASCIMENTO & STAMFORD (2000) a contaminação dos alimentos se dá principalmente por contato com material fecal de animais infectados ou contato com superfícies sujas contaminadas com a bactéria.

A carcaça destes animais e suas partes são potencialmente contaminadas a partir do trato intestinal e de material fecal nas patas ou nas penas. A contaminação cruzada é um problema importante e os pontos críticos incluem a depenagem, evisceração e o “chiller”. A contaminação cruzada das mãos dos trabalhadores e dos equipamentos e utensílios pode disseminar a bactéria para carcaças e partes não contaminada anteriormente, permitindo a contaminação durante os processos subseqüentes (DICKEL *et al.*, 2005).

Entretanto, deve-se ter em mente que não só o “chiller”, mas também as caixas de transporte, a depenadeira e a escaldadeira são fontes importantes de contaminação cruzada no abatedouro, pois as sujidades presentes na superfície externa das aves abrigam um número muito grande de microrganismos, com valores de 220 milhões a um bilhão por grama (DICKEL *et al.*, 2005).

As condições ideais dos frangos de corte no momento de abate devem ser conhecidas, a fim de possibilitar a produção de carne de excelente qualidade, uma vez que diversos fatores pré e pós-abate estão envolvidos na qualidade final. A

escalda, depena e evisceração são pontos importantes de contaminação cruzada no abatedouro devido à grande quantidade de microrganismos aderidos às penas, pele e patas das aves e ao rompimento de vísceras durante a evisceração (MENDES, 2001).

O tempo de jejum pré-abate é um dos pontos críticos nas operações de abate. Considera-se como material contaminante no abatedouro o alimento, fezes, bile, parede intestinal degradada, material de cama e sujidades aderidas às patas, pele e penas das aves (CARVALHO *et al.*, 2002).

Na pele, patas e penas, o patógeno contaminante mais importante é o *Staphylococcus aureus*, enquanto que no trato intestinal, a preocupação maior deve ser com *Salmonella* e *Campylobacter* (MENDES, 2001).

Dados demonstram que os agentes etiológicos são, na maioria das vezes, microrganismos, e a contaminação pode ocorrer em diversas fases do processamento do alimento. Dessa forma, são necessárias medidas de controle em todas as etapas do processamento: colheita, conservação, manipulação, transporte, armazenamento, preparo e distribuição dos alimentos (BOULOS, 1999).

Ressalta-se, portanto, a importância de Boas Práticas de Fabricação (BPF) e Procedimentos Operacionais Padronizados (POP) nos estabelecimentos, que são as bases iniciais da qualidade para programas de APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) que objetiva a segurança do alimento produzido (SILVA *et al.*, 2004).

2.5- Betalactamases de Espectro Expandido (ESBL's)

2.5.1- Origem e evolução

O primeiro isolado clínico expressando ESBL foi identificado na Alemanha por KNOTHE *et al.* (1983). Em 1985, o primeiro surto hospitalar causado por bactérias produtoras de ESBL ocorreu na França e depois nos EUA, no fim da década de 1980 e início da de 1990. O número de variantes de ESBL identificados tem crescido muito desde 1983, demonstrando a rápida evolução dessas enzimas. Mais de 150 variantes naturais são conhecidas até hoje, e esta lista continua a crescer (SHAH *et al.*, 2004).

As ESBL têm sido classificadas em nove distintos grupos evolucionários e estruturais, de acordo com sua seqüência de aminoácidos: TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES e OXA. As maiores famílias são formadas pelo tipo TEM e SHV, que incluem as primeiras variantes de ESBL identificados e que permaneceram como os tipos prevalentes. As enzimas do tipo OXA, as únicas pertencentes à classe D, representam uma família de ESBL relativamente prevalente. As enzimas do tipo TEM variam de TEM-1 e TEM-2, as do tipo SHV de SHV-1 (grupo 2b) e as do tipo OXA de OXA-2 e OXA-10 (grupo 2d). A origem das enzimas não é clara, com exceção das enzimas SHV que parecem ter relação com enzimas cromossomais SHV-1 de *Klebsiella pneumoniae*. As semelhanças estruturais sugerem origens comuns em muitos casos. As mutações mais importantes são aquelas que expandem o espectro do sítio ativo. Estas mutações são pesquisadas em estudos epidemiológicos dos tipos enzimáticos (BRADFORD, 2001).

A pressão seletiva que direciona a evolução das ESBL tem sido atribuída ao intenso uso de oximino-cefalosporinas. As ESBL freqüentemente demonstram preferência seletiva à diferentes oximino-cefalosporinas, sendo a seleção de uma variante específica em um hospital atribuída ao padrão específico do uso de antimicrobianos. Mas a pressão não pode explicar todo o fenômeno da evolução e

epidemiologia das ESBL. A forte pressão seletiva pelo uso de β -lactâmicos faz com que ocorra aumento na incidência de ESBL, pela seleção de bactérias com mutações em regiões codificadoras, mutações em regiões promotoras e bactérias com número de cópias do gene aumentado, entre outros. Algumas mutações alteram a resistência aos β -lactâmicos, devido ao aumento na expressão da enzima, mudança nos substratos hidrolisados e variação na susceptibilidade aos inibidores (GNIADKOWSKI, 2001).

Em anos recentes, as ESBL começaram a ser prevalentes em espécies produtoras de AmpC como *Enterobacter sp*, *Citrobacter freundii* e *Serratia marcescens*. Cepas produtoras de ESBL's e AmpC simultaneamente, já foram identificadas em vários trabalhos, sendo difícil a sua detecção, pois as enzimas AmpC mascaram o efeito inibitório obtido com ácido clavulânico nas bactérias produtoras de ESBL's (GNIADKOWSKI, 2001).

2.5.2- Caracterização, susceptibilidade e características bioquímicas

A maioria das ESBL pertence à classe molecular A de AMBLER (1980). As enzimas da classe A são caracterizadas por possuírem serina no sítio ativo, terem massa molecular de aproximadamente 29KDa e por hidrolisarem preferencialmente penicilinas. A classe A inclui enzimas como TEM-1, SHV-1 e penicilinases encontradas em *Staphylococcus aureus*.

Na classificação funcional de BUSH *et al.* (1995) as ESBL situam-se no grupo 2be. São capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas (incluindo as de amplo espectro) e monobactams. As mutações no sítio ativo que as tornam capazes de degradar antimicrobianos β -lactâmicos de amplo espectro, fazem com que não sejam tão eficientes na hidrólise de penicilinas, quanto às enzimas originais. Além disso, essas mutações resultam no aumento da susceptibilidade dessas enzimas aos inibidores de β -lactamases. As ESBL não são ativas contra cefamicinas, e muitas cepas são susceptíveis a cefoxitina e cefotetan. No entanto, cepas produtoras de ESBL podem ser resistentes a cefamicinas quando a permeabilidade

estiver diminuída, devido a menor quantidade de porinas na membrana. Também não são capazes de degradar carbapenêmicos, permanecendo susceptíveis a esse grupo de antimicrobianos (BUSH *et al.*, 1995).

2.5.3- Tipos de ESBL's

As ESBL “clássicas” são enzimas transmitidas/codificadas por plasmídeos, como as famílias: Temoniera (TEM), Sulfidril variável (SHV) e Oxacilina (OXA). Dentro destas maiores “famílias”, estão incluídas as duas primeiras variantes de beta-lactamases identificadas (SIROT *et al.*, 1987). Embora estas variantes ainda se mantêm, nos dias atuais, como as mais isoladas, nos últimos anos houve uma explosão no desenvolvimento/aparecimento de outras ESBL (famílias CTX-M, PER, VEB, GES, TLA e BES). Como resultado disso, mais de 370 variantes naturais de ESBL diferentes são conhecidas atualmente (STÜRENBURB *et al.*, 2005).

Estas enzimas pertencem filogeneticamente à classe de beta-lactamases denominadas “*Serine-Beta-Lactamases*” que, juntamente com as “*Metallo-Beta-Lactamases*”, formam os dois grandes grupos de enzimas que possuem a capacidade de degradar antibióticos beta-lactâmicos (SHAH *et al.*, 2004).

Para se caracterizar a descoberta de uma nova ESBL é necessário se descobrir alguma modificação, como mudança na região promotora, sozinha e/ou em conjunto com uma substituição nucleotídica, que funcionalmente devem ser “silenciosas”.

2.5.4- Significado clínico da detecção de ESBL

Os pacientes acometidos com infecções causadas por microrganismos produtores de ESBL têm um elevado risco de falha no tratamento com antimicrobianos β -lactâmicos de amplo espectro. Por isso, é recomendado que

qualquer microrganismo em que a produção de ESBL for confirmada seja reportado como resistente a todos os antimicrobianos β -lactâmicos de amplo espectro, independentemente dos resultados obtidos no teste de sensibilidade (CLSI, 2005). Isto decorre do fato que, enquanto algumas cepas apresentam plena resistência aos β -lactâmicos de amplo espectro, muitos isolados podem não ser fenotipicamente resistentes. Sendo assim, é importante que o laboratorista esteja consciente de que certas cepas podem ter sensibilidade reduzida a oximino-cefalosporinas em níveis que, embora não sejam considerados de resistência, sugerem a presença de ESBL. É também importante que o laboratório programe um ou mais métodos para detectar ESBL's nessas cepas (COUDRON *et al.*, 2003).

Outros motivos para a detecção são, o aumento da prevalência no mundo, a alta transmissibilidade dos plasmídeos em que estão situadas as enzimas e principalmente, a letalidade das infecções causadas por esses microrganismos (SILVA *et al.*, 2001a). Quando os pacientes são tratados com o antibiótico adequado, não há diferença significativa na mortalidade por infecções causadas por produtores e não produtores de ESBL (RAHAL, 2000).

Um sinergismo entre β -lactamases de amplo espectro e mutações em porinas de membrana, pode elevar o nível de resistência aos β -lactâmicos, ocorrendo inclusive resistência as cefalosporinas de quarta geração, como cefepime e ceftipime. O uso das cefalosporinas de quarta geração no tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras de ESBL, também não é recomendado pelo fato de geralmente apresentarem susceptibilidade *in vitro*, podendo, no entanto, haver falência no tratamento devido a grande quantidade de ESBL no sítio de infecção (TZOUVELEKIS *et al.*, 1998).

2.5.5- Ocorrência, distribuição e disseminação das ESBL

As ESBL são encontradas principalmente em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca*, consideradas espécies típicas produtoras, para as quais foram padronizadas as metodologias de detecção (CLSI, 2005). Porém já

foram descritas em muitas outras espécies de enterobactérias como: *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter gergoviae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Shigella sonnei*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Citrobacter farmeri*, *Citrobacter amalonaticus*, *Klebsiella ornithinolytica*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens* e *Salmonella typhimurium* (MULVEY *et al.*, 2003). Por isso, recentemente, o CLINICAL AND LABORATORIES STANDARDS INSTITUTE (2005) padronizou a detecção também em *Proteus mirabilis*, sendo que a necessidade da pesquisa nas demais espécies não-*E.coli* e não-*Klebsiella spp* continua sem padronização.

A produção de ESBL por bactérias não-enterobactérias são raras, mas podem ocorrer principalmente em *Pseudomonas aeruginosa*. Nestes microrganismos os tipos mais comuns são OXA-derivados. Contudo, isolados de *Pseudomonas aeruginosa* produzindo TEM, SHV e PER têm sido identificados em muitos países. Já foi detectado ESBL em *Acinetobacter sp*, *Alcaligenes faecalis*, e *Burkholderia cepacia* (GNIADSKOWSKI, 2001).

As bactérias produtoras de ESBL encontram-se espalhadas pelo mundo, todas com alta incidência na Europa, sendo que 32,8% das amostras de *Klebsiella spp* e 14,4% das amostras de *Escherichia coli* isoladas nessa região, produzem ESBL (JONES *et al.*, 2003). Um estudo realizado na Espanha detectou cepas produtoras de ESBL em 90% dos hospitais participantes de um programa de vigilância (HERNANDEZ *et al.*, 2003).

As cepas produtoras de ESBL disseminaram-se rapidamente por todo o mundo e, quando estabelecidas em uma região, freqüentemente passam a ser o mecanismo de resistência prevalente. A literatura demonstra muitos casos onde hospitais têm notado rápido aumento no número de microrganismos carregando ESBL, além de disseminação intra-hospitalar ou entre hospitais vizinhos. A transmissão pelas mãos dos profissionais é relevante, sendo o trato gastrointestinal dos pacientes um importante reservatório (WINOKUR *et al.*, 2000). Alguns surtos foram resultantes de contaminação de aparelhos e insumos diagnósticos, como termômetros e gel usado em ultra-sonografia (GNIADKOWSKI, 2001).

Além da transmissão das cepas resistentes ocorre também a aquisição de resistência por cepas susceptíveis (SILVA *et al.*, 2001). A transmissão horizontal do gene de resistência é facilitada por estar freqüentemente codificado em plasmídeos (WU *et al.*, 2003), que podem ser facilmente transferidos entre as cepas (PAGANI *et al.*, 2003).

O aumento na incidência pode estar relacionado à administração indiscriminada de cefalosporinas de amplo espectro (GNIADKOVSKI, 2001).

2.5.6- Fatores de risco

Alguns estudos têm revelado a existência de vários fatores de risco independentes entre si, associados à produção de ESBL. O principal fator, sem dúvida, está relacionado ao tempo de permanência do paciente nos hospitais, principalmente nos Centros de Tratamento Intensivo (CTI) (KIM *et al.*, 2002). Outro fator importante, são casos de hospitalização anterior, onde houve o uso de diversos antimicrobianos para erradicação da infecção, principalmente cefalosporinas de amplo espectro (LAUTENBACH *et al.*, 2001).

Outro importante fator de risco está associado à utilização de procedimentos invasivos, como cateteres venosos centrais, cateteres arteriais, urinários e cateteres utilizados em drenagem biliar (KIM *et al.*, 2002), além de intubações pulmonares, mecanismos de ventilação pulmonar artificial e doenças severas (doenças malignas e falha cardíaca) (HO *et al.*, 2002).

2.5.7- Medidas de Controle

A ampla e rápida distribuição geográfica das ESBL é uma ameaça com que os hospitais do mundo inteiro estão se deparando desde o início dos anos 80. As formas usuais de transmissão incluem a disseminação clonal das cepas

produtoras de ESBL (FRENCH *et al.*, 1996) ou a disseminação através de genes produtores de ESBL carregados por plasmídeos que são transmitidos entre gêneros diferentes de Enterobactérias (RICE, 1990). Ambas, a disseminação por plasmídeos ou a própria multiplicação bacteriana, podem ocorrer concomitantemente (PALUCHA *et al.*, 1999). Além disso, alguns estudos têm demonstrado que o mesmo gene codificador tem sido encontrado em diferentes plasmídeos presentes em diferentes cepas. Finalmente, já se sabe que alguns genes codificadores de ESBL são residentes em *transposons* ou em *integrans*, fornecendo assim os meios adicionais para sua propagação e expressão (POIREL, 2000).

2.6- Resistência bacteriana

Nos últimos 15 anos, a resistência microbiana às múltiplas drogas vem aumentando progressivamente e se tornando um problema mundial de saúde pública. Este aumento da resistência é maior em bactérias, mas, atualmente, ocorre também em vírus, fungos e protozoários. A resistência bacteriana tornou-se uma ameaça aos tratamentos de doenças infecciosas, na medida em que foram encontrados casos de patógenos comuns resistentes a quase todos os antibacterianos disponíveis no mercado, ocasionando um aumento na taxa de morbidade, mortalidade e dos custos nos serviços de saúde (VIKSVEEN, 2003).

Outro agravante que deve ser considerado é que, recentemente, a resistência não se limita às dependências de hospitais, ocorrendo também na comunidade de um modo geral, devido à utilização desordenada dos antibióticos (VIKSVEEN, 2003).

Vários são os fatores que contribuem para a ocorrência, freqüência e persistência da resistência bacteriana, como: a pressão seletiva pelo uso abusivo dos antibióticos; a utilização de antibióticos para o tratamento e a prevenção de infecções em animais, que aumentam a transmissão de organismos multi-resistentes para os seres humanos (COHEN, 1992; VIKSVEEN, 2003).

Um importante estudo realizado em três países diferentes (Canadá, Grécia e Países Baixos) por BRUINSMA *et al.* (2003) revelou que, além dos fatores relacionados acima, a densidade populacional é outro fator importante na prevalência da resistência, devido à maior oportunidade de contato interpessoal, facilitando a transmissão de bactérias resistentes.

Os mecanismos do desenvolvimento de resistência das bactérias aos antimicrobianos podem ser naturais ou adquiridos. Os naturais são características intrínsecas de algumas espécies, que conferem resistência a todas as cepas dessa espécie a um determinado antimicrobiano (NORMARK & NORMARK, 2002).

A resistência adquirida ocorre devido a uma mutação genética, tanto em nível cromossomal, pela alteração do DNA bacteriano, como extracromossomal, pela transferência de DNA, geralmente pelos plasmídios de resistência (NORMARK & NORMARK, 2002).

Os mecanismos químicos de resistência decorrentes dessas mutações podem ser criados por: 1. alterações no alvo ao qual os antimicrobianos se ligam para promover sua ação (ex. eritromicina); 2. alteração da permeabilidade da membrana celular, ocorrendo modificação das proteínas da membrana e impedindo assim, a passagem dos antibióticos (ex. quinolonas); 3. desenvolvimento de enzimas que inativam ou destroem o antimicrobiano (ex. β -lactâmicos); 4. alteração de uma enzima que vai permitir a ocorrência de uma reação antes inibida (ex. sulfonamida); 5. alteração de uma via metabólica (ex. sulfas) (BLACK, 2002).

O uso abusivo de antimicrobianos, têm como principais fatores determinantes a automedicação, e a prescrição de cepas resistentes. Estima-se que cerca de 20 a 50% dos antibióticos prescritos são desnecessários. Um exemplo clássico é a indicação de antibióticos para o tratamento de infecções das vias respiratórias superiores – como resfriado comum, infecção de ouvido (otite média), garganta dolorida, tosses e bronquites, apesar das evidências de ineficácia desses agentes para essas doenças, por serem frequentemente de etiologia viral (VIKSVEEN, 2003; NORRBY & NORD, 2005).

Paralelamente ao aumento da resistência a antimicrobianos, houve uma diminuição no desenvolvimento de novas drogas. A principal razão pelas quais as indústrias farmacêuticas reduziram as pesquisas em drogas antimicrobianas é o pequeno retorno financeiro sobre o investimento, devido aos custos cada vez mais altos (NORRBY & NORD, 2005).

Dessa forma, torna-se cada vez mais urgente a conscientização a respeito da resistência antimicrobiana pelos serviços de saúde e a prevenção do aparecimento de novas resistências através de programas e estratégias básicas que busquem o controle do uso abusivo e indiscriminado de antibióticos. Os meios efetivos para este controle ainda não são bem conhecidos, mas é imprescindível o envolvimento de agências governamentais, indústrias farmacêuticas, profissionais de saúde e dos consumidores neste sentido (VIKSVEEN, 2003).

Alguns métodos utilizados hodiernamente na redução dessa resistência estão focados na medicina curativa, que nada mais é do que uma consequência da carência de medicina preventiva. Portanto, a melhoria da saúde necessita de esforços comuns focados principalmente na prevenção e transmissão de infecções (VIKSVEEN, 2003).

Existe uma variedade de programas e meios para a redução da transmissão da resistência, tais como: práticas de controle de infecção em hospitais; higiene e saneamento básico na comunidade; redução da utilização de antibióticos em animais e na agricultura; cautela dos médicos em relação à prescrição de antimicrobianos; informação e conscientização dos pacientes e da população de uma forma geral, sobre o desenvolvimento de resistência dos microrganismos, pelos profissionais de saúde e indústrias farmacêuticas; utilização desses medicamentos somente com prescrição médica; e o incentivo do governo para que as indústrias invistam no desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas (COHEN, 1992; VIKSVEEN, 2003).

2.7- Agentes antimicrobianos na avicultura

Na avicultura, o uso de antimicrobianos na prevenção de infecção é uma medida muito utilizada para minimizar os danos causados por *E. coli* (GIUROV, 1981), e para reduzir a incidência de mortalidade associada com colibacilose aviária (WATTS *et al.*, 1993). Entretanto são cada vez maiores os índices de resistência das bactérias frente aos antimicrobianos testados (BLANCO *et al.*, 1997), sendo muito preocupante para o setor avícola (PEIGHAMBARI *et al.*, 1995).

Os antimicrobianos utilizados são de amplo espectro, tendo ação bactericida nas células bacterianas. As quinolonas: ácido oxolínico e norfloxacina atuam na replicação de DNA, isto é, impedindo que isto ocorra. A amoxicilina e fosfomicina atuam inibindo a síntese de peptídeos que compõem a parede celular. A associação sinérgica das sulfas com o trimetoprim (sulfazotrim) atua bloqueando a formação dos ácidos que são necessários para a síntese das bases purinas, metionina e timina, essenciais para o metabolismo da célula bacteriana (TRABULSI *et al.*, 1999). Os antimicrobianos utilizados têm alta ação destrutiva nas células bacterianas, mas mesmo com este potencial, as cepas de *E. coli* estão se tornando resistentes a ação antimicrobiana.

As novas quinolonas são uma nova classe de antimicrobianos que tem uma excelente atividade contra bacilos Gram negativos, e o uso inadequado nas aves, causa resistência cruzada no tratamento humano (GARCÍA-RODRÍGUEZ *et al.*, 1995).

Durante a criação de frangos de corte, o uso de antimicrobianos é comum e a resistência de *E. coli* proveniente do trato intestinal de aves permanece por muito tempo, mesmo na ausência do uso destes (CHASLUS *et al.*, 1987).

Escherichia coli é uma bactéria anaeróbia facultativa, pertencente a microbiota normal do trato intestinal de animais e homens (BONTEN *et al.*, 1990). As amostras de *E. coli* que possuem fatores de virulência como habilidade de adesão, produção de aerobactina, resistência sérica e presença de plasmídeo CoIV, são

potencialmente patogênicas para aves (WOOLEY *et al.*, 1998). O trato respiratório superior das aves é a principal porta de entrada de *E. coli* patogênica, ocorrendo a colonização e multiplicação do agente na traquéia, com posterior disseminação para os sacos aéreos e tecidos adjacentes (SOJKA & CARUAGHAN, 1961). A infecção por *E. coli* (colibacilose) é uma das principais doenças da avicultura industrial moderna, devido aos grandes prejuízos econômicos causados no mundo inteiro, por quadros como septicemia, peritonite, pneumonia, aerossaculite, pericardite, onfalite e salpingite, entre outros (FERREIRA & KNOBL, 2000).

São cada vez maiores os índices de resistência das bactérias frente aos antimicrobianos testados (BLANCO *et al.*, 1997), representando um sério problema mundial (COHEN, 1992). Amostras de *E. coli* isoladas de aves são freqüentemente resistentes para mais de uma droga (FERREIRA & KNOBL, 2000). Isto se deve principalmente ao uso indiscriminado e prolongado, concentrações subterapêuticas e terapias inadequadas de antimicrobianos (FERREIRA & KNOBL, 2000; WITTE, 1998) que proporciona uma pressão na seleção de genes de resistência antimicrobiana (TURTURA *et al.*, 1990).

A evolução e a disseminação de microrganismos resistentes aos antibióticos são o resultado da pressão seletiva imposta pelo homem, seja pela prescrição necessária dessas drogas ou pelo uso incorreto em tratamentos sem diagnóstico estabelecido, automedicação, desperdício de restos de antimicrobianos no meio ambiente e emprego desses fármacos como fatores de crescimento em animais de produção (TAVARES, 2000). De acordo com SMITH (1974) é possível que os resíduos de antibióticos em produtos animais possam ser veiculados a pessoas que os consumam, produzindo efeitos de toxicidade ou reações alérgicas em indivíduos previamente sensibilizados, além de favorecer o aparecimento de bactérias resistentes.

Os agentes antimicrobianos perdem sua eficiência nas infecções entéricas do homem, devido a resistência cruzada entre os agentes causadores de infecções veterinárias e humanas, sendo necessário um rigoroso controle no uso de antimicrobianos (BLANCO *et al.*, 1997).

O desenvolvimento de resistência por certas bactérias patogênicas é mais rápido que a capacidade da indústria para produzir novas drogas (FREITAS *et al.*, 2004).

O teste de susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* faz com que se tenha uma escolha precisa do uso de medicamentos apropriados para cada situação na área veterinária (BLANCO *et al.*, 1997).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

- Verificar a produção de betalactamases pelos coliformes presentes na carne de frango.

3.2. Objetivos específicos

- Realizar análises microbiológicas em amostras de carne de frango resfriada e congelada, na forma de carcaça e em cortes, comercializada em vários estabelecimentos localizados na cidade de Fortaleza, Ceará, incluindo a Contagem padrão em placas de bactérias aeróbias mesófilas e Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 35°C e coliformes a 45°C;
- Identificar cada coliforme isolado e avaliar seu grau de sensibilidade a determinados antibióticos;
- Verificar a produção de ESBL pelos coliformes;

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Obtenção das amostras

Foram coletadas 80 amostras de carne de frango resfriada e congelada, na forma de carcaça e em cortes, comercializada em vários estabelecimentos localizados na cidade de Fortaleza, Ceará, no período de abril a novembro 2006. As amostras foram transportadas em sacos plásticos devidamente identificadas, acondicionadas em caixas térmicas, contendo gelo, até o Laboratório de Microbiologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Ceará, para realização das análises microbiológicas.

4.1.1- Preparo das amostras

Cada uma das amostras foi preparada, pesando asepticamente 25,0g de amostra, que, a seguir, foi transferida para um frasco contendo 225,0mL de água salina peptonada (AP) a 0,1% (DIFCO) estéril acompanhado por posterior homogeneização (diluição 10^{-1}). A partir dessa diluição decimal foram preparadas as demais (até 10^{-3}), transferindo da diluição anterior (diluição 10^{-1}) 1,0mL para um tubo contendo 9,0mL de água salina peptonada a 0,1% estéril, preparando assim a diluição 10^{-2} e a partir desta diluição foi transferido 1,0mL para um tubo contendo 9,0 mL de água salina peptonada a 0,1% estéril preparando a diluição 10^{-3} (ANEXO I). Em seguida, foi efetuada as inoculações para as análises (SIQUEIRA, 1995).

4.2- Análises microbiológicas

Para determinar a contagem padrão em placas de bactéria aeróbias mesófilas, determinação do Número Mais Provável de Coliformes a 35°C e de Coliformes a 45°C foi utilizada a metodologia descrita por SIQUEIRA (1995).

Para interpretação dos resultados de coliformes a 45°C foi utilizada a RDC n°12 de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001).

4.2.1- Contagem Padrão em Placas

Para a análise de bactérias aeróbias mesófilas, que são microrganismos que crescem em aerobiose e em temperatura de incubação entre 15 e 40°C e uma temperatura média de 35°C, foram pipetadas assepticamente 1,0mL das diluições e distribuídas em placas de Petri (100 x 20mm) esterilizadas, de cada diluição foram realizadas análises em duplicata. Foi adicionado a cada placa 15,0mL de Ágar Padrão para Contagem (PCA) (DIFCO), previamente fundido a 44-46°C. As placas foram homogeneizadas com movimentos suaves em forma de oito, sucessivamente, por 10 vezes e deixadas para solidificar a temperatura ambiente. As placas foram incubadas a 35°C em estufa por 48 horas. Transcorrido o período de incubação, foram consideradas para contagem, somente as placas, da mesma diluição, que apresentaram de 30 a 300 colônias. A contagem de bactérias aeróbias mesófilas foi obtida multiplicando-se a média aritmética das duas placas pelo fator da diluição correspondente, expressando o resultado em Unidades Formadoras de Colônias/g de amostra (UFC/g) (ANEXO II).

4.2.2- Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 35°C

Para a determinação do NMP foi utilizada a técnica dos tubos múltiplos, com três séries de três tubos de cada diluição (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}). Foi pipetado alíquotas de 1,0mL de cada diluição para uma série de três tubos de Caldo Lactosado (CL) (MERCK), contendo tubos de Durham invertidos para coletar o gás produzido durante a fermentação. Foram homogeneizados e incubados em estufa regulada a 35°C durante 48 horas. Transcorrido este tempo, foi observado turvação e a produção de gás nos tubos de fermentação (tubo de Durham) quando o tubo foi agitado suavemente. Foram anotados os tubos com produção de gás (tubos positivos). Foi utilizada a tabela de Hoskins para expressar o Número Mais Provável de Coliformes por g da amostra (NMP/g).

De cada tubo de Caldo Lactosado positivo, foi transferida uma alçada para um tubo de Caldo Verde Brilhante 2% (VB) (MERCK), previamente identificado (diluição correspondente). Os tubos foram homogeneizados e incubados em estufa a 35°C durante 48 horas. Foram considerados positivos os tubos turvos e com produção de gás nos tubos de Durham. Foi verificado na tabela o número correspondente e o resultado foi expresso em NMP de coliformes a 35°C/g. Cada tubo positivo foi semeado em placa de Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) (MERCK) e incubado a 35°C/24 horas (ANEXO III). Após o crescimento as cepas identificadas como fermentadoras foram estocadas em Agar Tripticase de Soja (TSA) (DIFCO) para posterior identificação (ANEXO IV) e testes de sensibilidade (ANEXO VI).

4.2.3- Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 45°C

Para determinação do NMP de coliformes a 45°C foram utilizados os tubos positivos de coliformes a 35°C. Com auxílio de uma alça de platina, uma alíquota foi assepticamente transferida para tubos de ensaio contendo caldo E.C (MERCK), com tubos de Durham invertidos. Foram incubados em banho-maria a

45°C por 24 horas. Foram considerados positivos os tubos que apresentaram formação de gás evidenciados nos tubos de Durhan, com ou sem turvação do caldo. A leitura do NMP de coliformes a 45°C foi realizada da mesma forma como descrito anteriormente para o NMP de coliformes a 35°C. Cada tubo que apresentou crescimento positivo foi semeado em placa de Agar Eosina Azul de Metileno (EMB) (MERCK) e incubado a 35°C/24 horas (ANEXO III). Após o crescimento as cepas identificadas como fermentadoras foram estocadas em Agar Tripticase de Soja (TSA) (DIFCO) para posterior identificação (ANEXO IV) e testes de sensibilidade (ANEXO VI).

4.3- Identificação das cepas bacterianas

As cepas estocadas em TSA foram repicadas para Agar EMB e colocadas em estufa a 35°C/24 horas. Após o crescimento foram realizadas as seguintes provas bioquímicas: Prova do Citrato de Simmons, Prova do Vermelho de Metila (VM), Prova do Voges-Proskauer (VP), Prova de descarboxilação da Lisina, Prova de H₂S, indol e motilidade, Prova de fenilalanina e Prova de hidrólise da uréia (KONEMAN *et al.*, 2006) (ANEXO V).

4.3.1- Prova do Citrato de Simmons

Esta prova bioquímica foi utilizada para caracterizar microrganismos capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono, os quais provocam a elevação do pH do meio de cultivo devido a metabolização de íon citrato.

Após incubação a 37°C por 4 dias, foi considerado como teste positivo quando o meio se tornou azul intenso, principalmente no ápice.

4.3.2- Prova do vermelho de metila (VM)

Prova utilizada para testar a habilidade de certos microrganismos de produzirem e manterem estáveis produtos ácidos finais da fermentação da glicose.

Após incubação a 37°C por 48 horas, foi adicionado o reagente vermelho de metila e foi interpretado como positivo a formação de coloração vermelha.

4.3.3- Prova do Voges-Proskauer (VP)

Utilizada para testar a habilidade de certos microrganismos de produzirem um produto final neutro, acetilmetilcarbinol, durante a fermentação da glicose.

Para cada ml da cultura incubada durante 48 horas, foi adicionado os reagentes (solução de α -naftol e solução de hidróxido de potássio a 40%), agitando sempre após a inclusão de cada solução, deixando-a em repouso por 5 a 30 minutos, e tendo como positivo o desenvolvimento de uma coloração rósea a vermelho rubro.

4.3.4- Prova de descarboxilação da lisina

Serve para medir a habilidade de alguns microrganismos de descarboxilarem um aminoácido para formar amina, que alcaliniza o meio.

Após incubação a 37°C por 24-48 horas, foi considerado como positivo o enegrecimento do meio, eventualmente, com uma zona ao redor do crescimento em tom violeta.

4.3.5- Prova de H₂S, indol e motilidade

Esta prova é para verificar a motilidade dos microrganismos, a capacidade de produção de H₂S e de indol. Para isto a inoculação foi feita com agulha de níquel-cromo, procedendo uma picada no centro da coluna.

Após incubação a 37°C por 24 a 48 horas, foi interpretado como positivo:

- motilidade: quando os microrganismos migraram da linha de inoculação, difundindo-se por todo o meio, causando a turvação do mesmo.
- produção H₂S: quando houve escurecimento do meio ao nível da sementeira.
- produção de indol: quando surgiu o desenvolvimento de coloração vermelha após adição de 2 a 4 gotas do reativo de Kovacs, sobre a superfície do meio.

4.3.6- Prova de Fenilalanina

Esta prova bioquímica é utilizada na diferenciação de microrganismos capazes de desaminar a fenilalanina em ácido fenil pirúvico, por ação enzimática.

Após incubação a 37°C por 24 horas e adição do reagente (solução de cloreto férrico a 0,5 M), foi tido como teste positivo o aparecimento de uma cor verde quando ácido fenil pirúvico foi formado.

4.3.7- Prova de hidrólise da uréia

Nesta prova bioquímica comprova-se a capacidade de certos microrganismos de produzirem uréase, com conseqüente produção de amônia em quantidade suficiente, para elevar o pH do meio fortemente tamponado.

Após inoculação (inóculo recente e abundante) e incubação a 37°C, foi feito a leitura após 24 horas, quando foi observada uma coloração de rosa a vermelho.

4.4- Testes de Sensibilidade a Antibióticos

O teste de sensibilidade a antimicrobianos foi realizado pelo método de KIRBY-BAUER (1966). Discos de papel filtro, contendo agentes antimicrobianos, foram colocados em placas contendo Ágar Mueller-Hinton (MH) (Difco) inoculado com culturas das cepas isoladas em uma densidade equivalente ao padrão 1,0 de McFarland. As placas foram incubadas à 35°C por 24 horas. Os antimicrobianos estudados foram: amicacina (30µg), ampicilina (10µg), ciprofloxacina (05µg), ceftazidima (30µg), estreptomicina (10µg), doxiciclina (30µg), gentamicina (10µg), imipenem (10µg), sulfonamida (300µg) e sulfametoxazol/trimetroprim (25µg). Após a incubação, foi feita a leitura dos halos de inibição de crescimento formados ao redor dos discos e a interpretação dos resultados foi realizada com o auxílio de uma tabela de padrões (CLSI, 2005) (ANEXO VI).

4.5- Testes para detecção de ESBL

4.5.1- Detecção de cepas produtoras de ESBL

Cada cepa identificada como pertencente à família *Enterobacteriaceae* foi avaliada quanto a possibilidade de ser produtora de ESBL. As cepas foram semeada em meio Agar MacConkey (MC) (Merck) modificado acrescido de 2,0mg/L de ceftazidima, como teste de triagem para a cepas produtoras de ESBL. As placas foram incubadas a 35°C/24 horas. As bactérias que apresentaram crescimento positivo foram confirmadas quanto à produção de ESBL (KONEMAN *et al.*, 2006).

4.5.2- Confirmação de cepas produtoras de ESBL

As cepas que apresentaram crescimento em Agar MacConkey (MC) (Merck) contendo 2,0mg/L de ceftazidima foram confirmadas para a produção de ESBL com a metodologia do teste de difusão em disco, utilizando os discos de ceftazidima e ácido clavulânico (KONEMAN *et al.*, 2006) (ANEXO VII).

5- RESULTADOS

5.1- Contagem Padrão em Placas

Para a contagem padrão em placas de microrganismos aeróbios mesófilos, foi observada uma variação nesta pesquisa de $<1,0 \times 10$ UFC/g a $6,3 \times 10^5$ UFC/g, e a maioria das amostras encontrava-se entre 10^2 e 10^5 UFC/g (FIGURA 1).

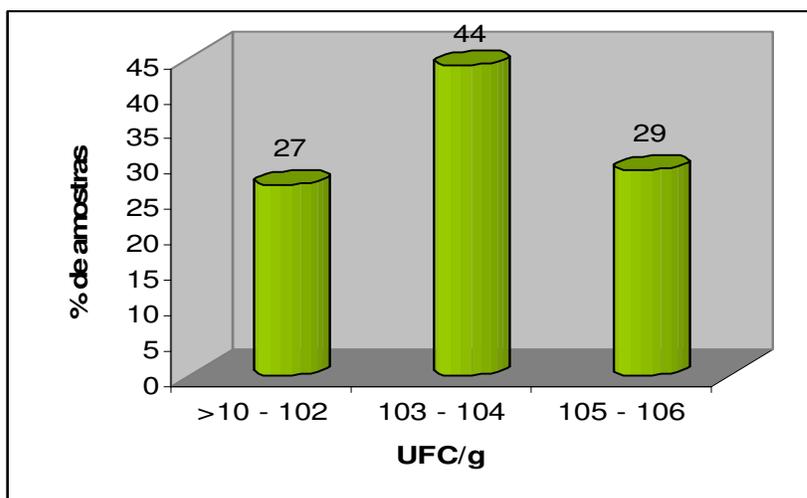


FIGURA 1 – Percentual de amostras de carne de frango resfriada e congelada comercializada na cidade de Fortaleza, Ceará em relação a contagem de bactérias aeróbias mesófilas.

5.2- Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 35°C e coliformes a 45°C

Independentemente da existência de padrão microbiológico na legislação brasileira em vigor (BRASIL, 2001), para coliformes a 35°C com referência a situações e convenções microbiológicas para a avaliação de alimentos para os quais

não existem padrões específicos, essas amostras também foram submetidas a esta análise, para que se tivesse uma idéia dessa carga microbiana e das condições higiênico-sanitárias destes alimentos, que muito provavelmente poderão refletir as condições da matéria-prima, do ambiente e do pessoal. O Número Mais Provável de coliformes a 35°C variou entre <3 a 24000 NMP/g. Assim, das 80 amostras de carne de frango analisadas, 18 (22%) amostras apresentaram contagem de >3 a 930NMP/g, 35 (44%) amostras, contagem entre 1500 – 4600NMP/g e 27 (34%) amostras encontravam-se entre 11000 – 24000NMP/g (FIGURA 2).

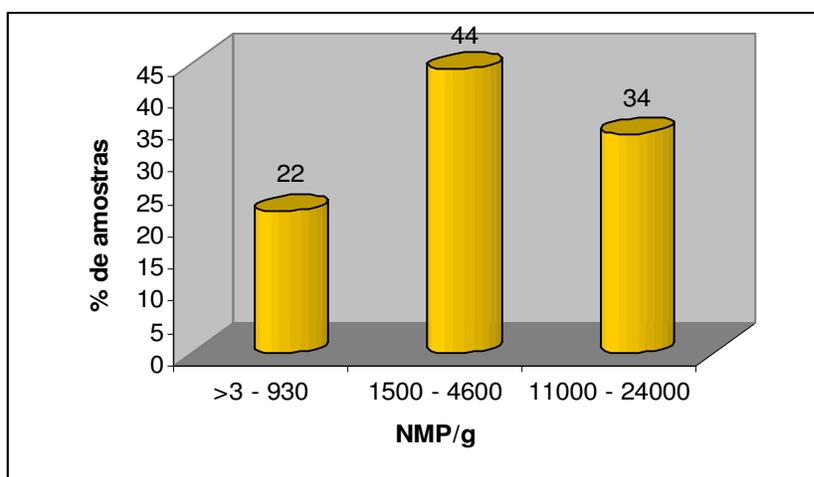


FIGURA 2 – Percentual de amostras de carne de frango resfriada e congelada comercializada na cidade de Fortaleza, Ceará em relação a coliformes a 35° C.

Na contagem de coliformes a 45°C foram considerados os padrões microbiológicos exigidos pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2001) que classifica os produtos avícolas como aceitável para o consumo até 10^4 NMP/g. Baseado neste padrão, das 80 amostras analisadas neste trabalho, 79% das amostras encontravam-se dentro dos padrões para coliformes a 45°C (FIGURA 3).

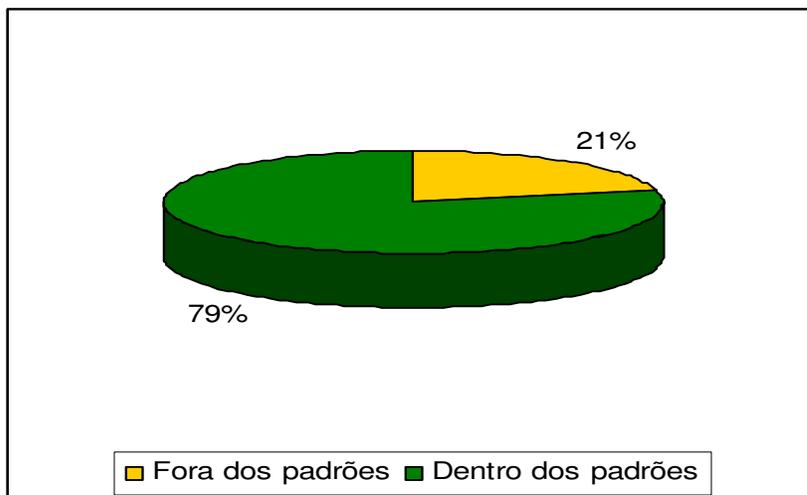


FIGURA 3 - Percentual de amostras fora e dentro dos padrões para coliformes a 45°C encontrados em carne de frango resfriada e congelada comercializada na cidade de Fortaleza, Ceará.

5.3- Identificação das cepas

Das 80 amostras analisadas foram identificadas 52 cepas de coliformes, sendo que 11 (21,1%) apresentaram características bioquímicas de *Escherichia coli*, 22 (42,4%) de *Klebsiella pneumoniae* e 19 (36,5%) de *Enterobacter aerogenes* (FIGURA 4).

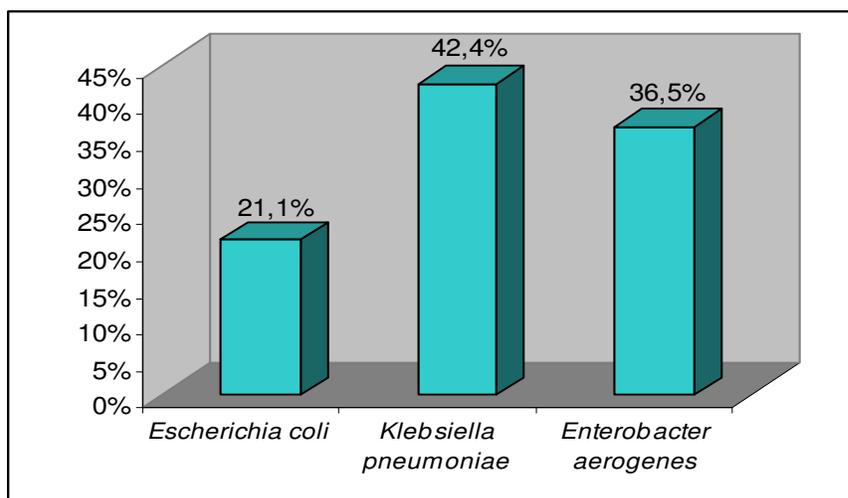


FIGURA 4 - Prevalência das espécies de coliformes isoladas de amostras de carne de frango resfriada e congelada comercializada na cidade de Fortaleza, Ceará.

Posteriormente, todas as cepas identificadas foram submetidas ao teste de sensibilidade a antibióticos. Os antibióticos testados foram aqueles recomendados pela Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005) para a análise do perfil de sensibilidade a antibióticos dos bacilos Gram-negativos pertencentes a família *Enterobacteriaceae*.

5.4- Testes de Sensibilidade a Antibióticos

5.4.1- *Escherichia coli*

Os resultados obtidos no presente trabalho mostraram que as cepas de *Escherichia coli* apresentaram uma alta percentagem de resistência aos antimicrobianos, sendo a amicacina, gentamicina e o imipenem os antimicrobianos mais eficientes, mostrando-se 100% eficientes, e a doxiciclina o que apresentou a maior resistência (90,9%), seguido da estreptomina (81,8%).

A TABELA 1 mostra o perfil de resistência e sensibilidade das cepas de *Escherichia coli* aos 10 agentes antimicrobianos testados.

TABELA 1 - Perfil de resistência e sensibilidade a antimicrobianos encontrado nas cepas de *Escherichia coli* analisadas.

Antibióticos	Sensível		Intermediário		Resistente	
	N°	%	N°	%	N°	%
Amicacina	11	100	-	-	-	-
Ampicilina	05	45,5	-	-	06	54,5
Ciprofloxacina	09	81,8	-	-	02	18,2
Ceftazidima	10	90,9	01	9,1	-	-
Estreptomina	02	18,2	-	-	09	81,8
Doxiciclina	-	-	01	9,1	10	90,9
Gentamicina	11	100	-	-	-	-
Imipenem	11	100	-	-	-	-
Sulfonamida*	02	28,6	-	-	05	71,4
Sulfametoxazol/ Trimetoprim	03	27,3	-	-	08	72,7

* teste de sensibilidade a sulfonamida realizado somente com 7 cepas de *E. coli*.

Das 11 cepas de *Escherichia coli* testadas quanto à sensibilidade antimicrobiana, 9/11 (81,9%) foram multi-resistentes, 2/11 (18,2%) apresentaram sensibilidade intermediária para pelo menos um antibiótico testado e 2/11 (18,2%) foram resistentes a apenas um antibiótico.

Os percentuais de sensibilidade das cepas de *E. coli* a cada um dos antibióticos utilizados foram: amicacina (100,0%), ampicilina (45,5%), ciprofloxacina (81,8%), ceftazidima (90,9%), estreptomicina (18,2%), gentamicina (100,0%), imipenem (100,0%), sulfonamida (28,6%), sulfametoxazol/trimetroprim (27,3%). Os de resistência foram: ampicilina (54,5%), ciprofloxacina (18,2%), estreptomicina (81,8%), doxiciclina (90,9%), sulfonamida (71,4%), sulfametoxazol/trimetroprim (72,7%). Os percentuais de sensibilidade intermediária para cada droga antimicrobiana utilizada foram: ceftazidima (9,1%) e doxiciclina (9,1%).

No tocante ao perfil antimicrobiano das cepas de *E. coli* isoladas, foram determinados modelos de resistência a antibióticos, sendo que apenas 03 cepas (27%) foram sensíveis a todos os antibióticos testados. Apesar de aproximadamente 18% dos isolados apresentarem resistência a somente um antibiótico, o caráter de múltipla resistência foi constatado na maioria das cepas, destacando-se 2 cepas com resistência a 6 dos antibióticos testados (FIGURA 5).

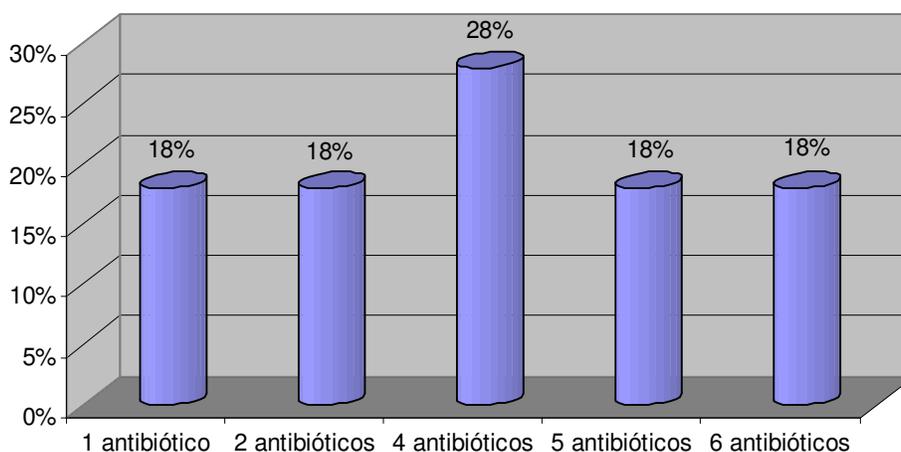


FIGURA 5 – Resistência a antibióticos de cepas de *Escherichia coli* isoladas de carne de frango resfriada e congelada comercializada na cidade de Fortaleza, Ceará.

5.4.2- *Klebsiella pneumoniae*

Os resultados dos testes de sensibilidade antimicrobiana realizados nas 22 cepas de *Klebsiella pneumoniae*, frente aos 10 antibióticos testados demonstraram que os antibióticos mais eficientes, ou seja, os que apresentaram maior percentual de sensibilidade, foram a gentamicina, imipenem e sulfametoxazol/trimetoprim, ambos com 95,5% de eficiência e o menos eficaz, com menor percentual de sensibilidade, foi ampicilina.

O perfil de sensibilidade/resistência antimicrobiana das cepas de *Klebsiella pneumoniae* está apresentado na TABELA 2.

TABELA 2 - Perfil de resistência e sensibilidade a antimicrobianos encontrado nas cepas de *Klebsiella pneumoniae* analisadas.

Antibióticos	Sensível		Intermediário		Resistente	
	N°	%	N°	%	N°	%
Amicacina	20	91,0	01	4,5	01	4,5
Ampicilina	01	4,5	-	-	21	95,5
Ciprofloxacina	19	86,4	-	-	03	13,6
Ceftazidima	18	81,9	01	4,5	03	13,6
Estreptomina	15	68,2	-	-	07	31,8
Doxiciclina	05	22,7	10	45,5	07	31,8
Gentamicina	21	95,5	-	-	01	4,5
Imipenem	21	95,5	01	4,5	-	-
Sulfonamida	16	72,7	02	9,1	04	18,2
Sulfametoxazol/ Trimetoprim	21	95,5	-	-	01	4,5

Das 22 cepas de *Klebsiella pneumoniae* testadas quanto à sensibilidade antimicrobiana, 10/22 (45%) foram multi-resistentes, 15/22 (68%) apresentaram sensibilidade intermediária para pelo menos um antibiótico testado e 12/22 (54%) foram resistentes a apenas um antibiótico.

Os percentuais de sensibilidade das cepas de *K. pneumoniae* a cada um dos antibióticos utilizados foram: amicacina (91,0%), ampicilina (4,5%), ciprofloxacina (86,4%), ceftazidima (81,9%), estreptomina (68,2%), doxiciclina

(22,7%), gentamicina (95,5%), imipenem (95,5%), sulfonamida (72,2%), sulfametoxazol/trimetoprim (95,5%). Os de resistência foram: amicacina (4,5%), ampicilina (95,5%), ciprofloxacina (13,6%), ceftazidima (13,6%), estreptomicina (31,8%), doxiciclina (31,8%), gentamicina (4,5%), sulfonamida (18,2%), sulfametoxazol/trimetoprim (4,5%). Os percentuais de sensibilidade intermediária para cada droga antimicrobiana utilizada foram: amicacina (4,5%), ceftazidima (4,5%) e doxiciclina (45,5%), imipenem (4,5%), sulfonamida (9,1%).

Quanto ao perfil antimicrobiano das cepas de *K. pneumoniae* isoladas, foram determinados modelos de resistência a antibióticos, sendo que 54% dos isolados apresentaram resistência a somente um antibiótico, o caráter de múltipla resistência foi constatado na maioria das cepas, destacando-se uma cepa com resistência a 7 dos antibióticos testados (FIGURA 6).

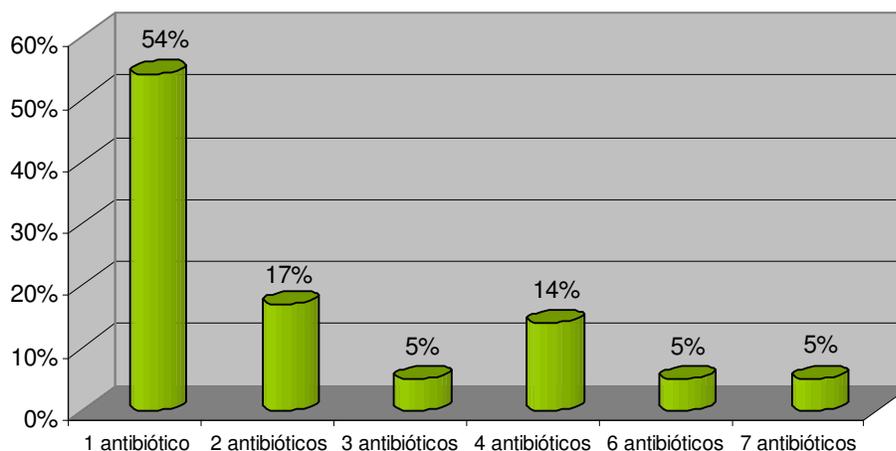


FIGURA 6 - Resistência a antibióticos de cepas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de carne de frango resfriada e congelada comercializada na cidade de Fortaleza, Ceará.

5.4.3- *Enterobacter aerogenes*

As cepas de *Enterobacter aerogenes* apresentaram uma alta percentagem de resistência aos antimicrobianos, sendo a ciprofloxacina o antimicrobiano mais eficiente (94,7%), com menor índice de resistência e a ampicilina o que apresentou a maior resistência (89,4%).

Na TABELA 3 constam os resultados obtidos para o grau de resistência/sensibilidade das cepas de *Enterobacter aerogenes* isoladas frente aos 10 antimicrobianos testados.

TABELA 3 - Perfil de resistência e sensibilidade a antimicrobianos encontrado nas cepas de *Enterobacter aerogenes* analisadas.

Antibióticos	Sensível		Intermediário		Resistente	
	N°	%	N°	%	N°	%
Amicacina	16	84,2	02	10,5	01	5,3
Ampicilina	01	5,3	01	5,3	17	89,4
Ciprofloxacina	18	94,7	-	-	01	5,3
Ceftazidima	17	89,5	-	-	02	10,5
Estreptomicina	11	57,9	-	-	08	42,1
Doxiciclina	-	-	09	47,4	10	52,6
Gentamicina	16	84,2	-	-	03	15,8
Imipenem	16	84,2	01	5,3	02	10,5
Sulfonamida	09	47,4	01	5,3	09	47,4
Sulfametoxazol/ Trimetroprim	12	63,2	-	-	07	36,8

Das 19 cepas de *Enterobacter aerogenes* testadas quanto à sensibilidade antimicrobiana, 14/19 (73,6%) foram multi-resistentes, 14/19 (73,6%) apresentaram sensibilidade intermediária para pelo menos um antibiótico testado e 5/19 (26,3%) foram resistentes a apenas um antibiótico.

Os percentuais de sensibilidade das cepas de *E. aerogenes* a cada um dos antibióticos utilizados foram: amicacina (84,2%), ampicilina (5,3%), ciprofloxacina (94,7%), ceftazidima (89,5%), estreptomicina (57,9%), gentamicina (84,2%), imipenem (84,2%), sulfonamida (47,4%), sulfametoxazol/trimetroprim (63,2%). Os de resistência foram: amicacina (5,3%), ampicilina (89,4%), ciprofloxacina (5,3%), ceftazidima (10,5%), estreptomicina (42,1%), doxiciclina (52,6%), gentamicina (15,8%), imipenem (10,5%), sulfonamida (47,4%), sulfametoxazol/trimetroprim (36,8%). Os percentuais de sensibilidade intermediária para cada droga antimicrobiana utilizada foram: amicacina (10,5%), ampicilina (5,3%), doxiciclina (47,4%), sulfonamida (5,3%), sulfametoxazol/trimetroprim (5,3%).

Quanto ao perfil antimicrobiano das cepas de *E. aerogenes* isoladas, foram determinados modelos de resistência a antibióticos, sendo que 25% dos isolados apresentaram resistência a somente um antibiótico, o caráter de múltipla resistência foi constatado na maioria das cepas, destacando-se 2 cepas com resistência a 6 dos antibióticos testados (FIGURA 7).

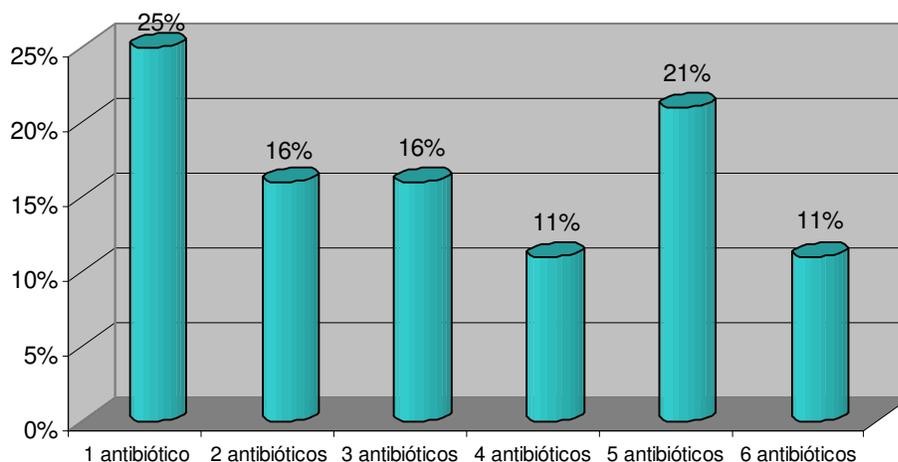


FIGURA 7 - Resistência a antibióticos de cepas de *Enterobacter aerogenes* isoladas de carne de frango resfriada e congelada comercializada na cidade de Fortaleza, Ceará.

5.5- Detecção de cepas produtoras de ESBL

Das 11 cepas de *Escherichia coli*, 22 de *Klebsiella pneumoniae* e 19 de *Enterobacter aerogenes* isoladas, apenas 4, 9 e 5 cepas apresentaram o fenótipo produtor de ESBL, respectivamente, e destas somente 3 (33%) das cepas de *Klebsiella pneumoniae* e 3 (60%) das cepas de *Enterobacter aerogenes* foram confirmadas como produtoras de ESBL (FIGURAS 8 e 9).

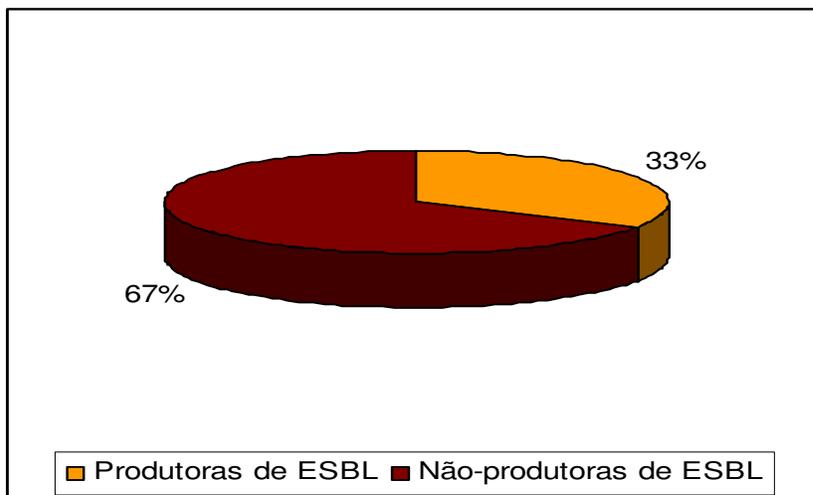


FIGURA 8 – Percentual de cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL.

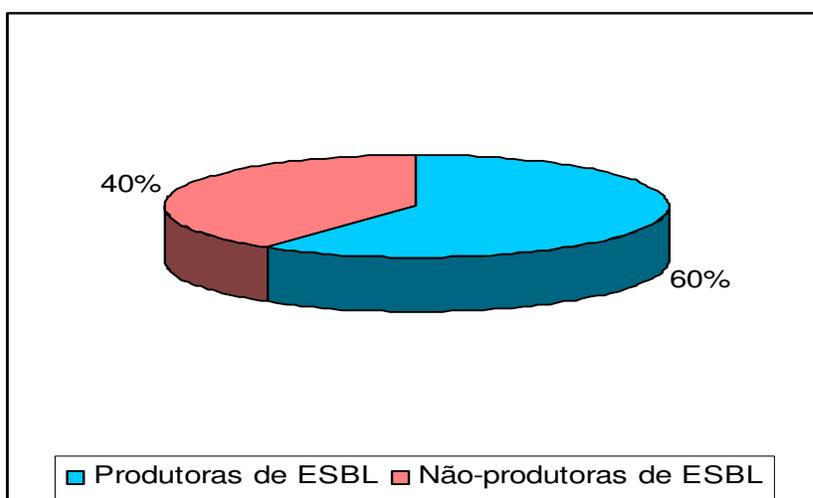


FIGURA 9 – Percentual de cepas de *Enterobacter aerogenes* produtoras de ESBL.

Das 18 cepas de coliformes que apresentaram o fenótipo produtor de ESBL, somente 6 (35%) foram confirmadas como produtoras de ESBL (FIGURA 10).

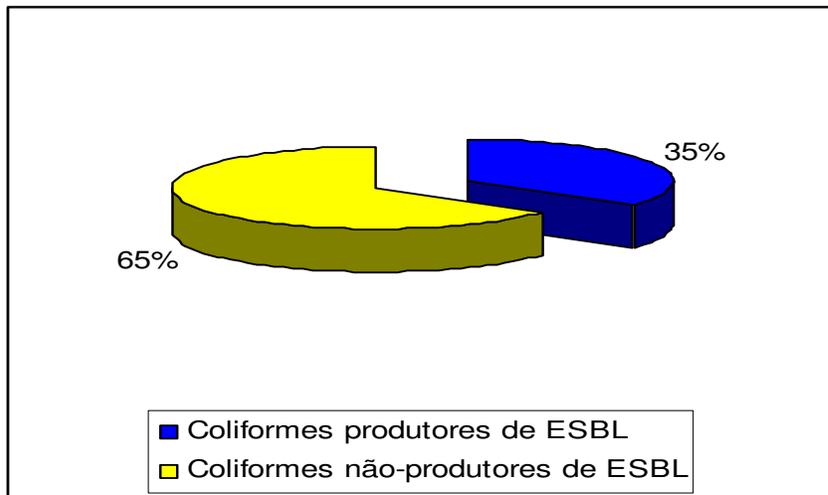


FIGURA 10 – Coliformes produtores de ESBL.

6- DISCUSSÃO

6.1- Contagem Padrão em Placas

Resultado similar ao encontrado no presente estudo foi observado por HOFFMAN *et al.* (1995) ao identificar a presença de microrganismos mesófilos em amostras de frangos congelados comercializados no estado de São Paulo. Nesta pesquisa foi observado que houve uma variação de $<1,0 \times 10$ UFC/g a $6,3 \times 10^5$ UFC/g, e a maioria das amostras encontrava-se entre 10^2 e 10^5 UFC/g.

Trabalho semelhante realizado por CARLONI *et al.* (1998) ao estudarem as condições higiênico-sanitárias de 100 amostras de aves prontas para o consumo na Argentina, para a detecção de bactérias aeróbias mesófilas, encontraram o valor mínimo de $1,0 \times 10^3$ UFC/g e o máximo de $1,0 \times 10^6$ UFC/g, considerando os autores que 20% das amostras apresentaram valores acima dos valores limites permitidos para esse país, que é de 10×10^5 UFC/g.

PINTO *et al.* (1999) observaram que 60% (36/60) das amostras de lingüiça e 44,7% (17/38) das amostras de salsichas de carne de frango servidas na Unesp (SP) apresentaram contagens de mesófilos entre 10^2 e 10^3 UFC/g e 28,94% (11/38) apresentaram contagens acima de 10^5 UFC/g. Resultados semelhantes foram detectados por HOFFMAN *et al.* (1999) para microrganismos mesófilos, valores esses variando de 10^3 a 10^4 UFC/g em frangos inteiros comercializados em São José do Rio Preto-SP.

Para CARDOSO *et al.* (2005) em relação a contagem dos mesófilos para as amostras de carcaças de frango e de cortes de frango oriundos da indústria avícola de Descalvado, a variação do valor mínimo e máximo observado foi de $4,0 \times 10^2$ a $8,0 \times 10^2$ UFC/g e de <10 a $7,8 \times 10^2$ UFC/g, respectivamente.

Em um experimento, RUSSELL (1996) relatou que mesófilos são reduzidos ou se mantêm constantes, quando carcaças são mantidas em temperaturas menores que 4 °C.

SOUSA *et al.* (2006) avaliando a qualidade higiênico-sanitária de amostras congeladas de frangos industrializados, resfriadas industrializadas e não industrializadas e não inspecionadas comercializados na cidade de Salvador-Bahia obtiveram contagem média de mesófilos de $9,3 \times 10^3$ UFC/g, $2,1 \times 10^7$ UFC/g e $1,3 \times 10^8$ UFC/g, respectivamente.

FIGUEREDO *et al.* (2006) analisaram amostras de diferentes cortes cárneos de frango resfriado (asa, coxa e peito) comercializados na cidade de Franca-SP e constataram uma variação de mesófilos de $1,4 \times 10^3$ a $2,5 \times 10^7$ UFC/g.

A completa prevenção da contaminação dos alimentos, principalmente os de origem animal, é extremamente difícil, tendo em vista a ampla distribuição de bactérias no ambiente e a freqüente existência de portadores assintomáticos. No entanto, a adoção de medidas higiênico-sanitárias no manuseio e processamento, o controle das rações e a prevenção das contaminações cruzadas, são algumas das medidas importantes para a redução dos níveis de contaminação (LEITÃO, 1988).

Os microrganismos pesquisados neste experimento são mesófilos, o que representa a manutenção do produto em temperaturas inadequadas à sua conservação em uma ou mais etapas do seu processamento ou armazenamento. Se o processamento de alimentos de origem animal for bem conduzido, os níveis de contaminação microbiana serão baixos, uma vez que a qualidade final dependerá da extensão da contaminação/recontaminação das espécies bacterianas presentes e da temperatura de armazenamento (BUCHANAN, 1992).

6.2- Determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes a 35°C e coliformes a 45°C

Contagem de coliformes totais significativa demonstra a necessidade de adoção de boas práticas de manipulação, bem como um maior controle no processamento e no acondicionamento dos alimentos, além do isolamento das áreas de manipulação para melhorar a qualidade higiênica dos produtos analisados. Embora não existam padrões estabelecidos para coliformes totais pelas legislações sanitárias em vigor, números elevados destes coliformes indicam que está ocorrendo uma deficiência na qualidade de higienização interna nos abatedouros, o que deve ser revisto para evitar posteriormente contaminações que possam prejudicar a qualidade dos produtos.

O abate é a etapa em que a indústria tem capacidade de controlar a contaminação bacteriana do frango (PORTO & SILVA, 1995), entretanto trabalhos têm acusado a detecção de coliformes a 35°C em produtos avícola como relata CASTRO *et al.* (1997) em 306 (66,2%) das amostras analisadas na linha de abate (fígado, coxa e sobre-coxa).

HOFFMAN *et al.* (1999) ao estudarem amostras de hambúrgueres e salsichas de frango comercializadas em São José do Rio Preto-SP, verificaram que todas se encontravam em acordo com os padrões estabelecidos na legislação vigente para coliformes fecais. No presente estudo, das 80 amostras de carne de frango analisadas 46 (57%) apresentaram-se aceitáveis para o consumo humano e 34 (43%) apresentaram-se fora dos padrões para o consumo, em relação à contagem de coliformes a 35°C. Para a contagem de coliformes a 45°C, 63 (79%) amostras encontravam-se dentro dos padrões, enquanto, 17 (23%) estavam fora dos padrões exigidos pela legislação vigente.

Entretanto, PINTO *et al.* (1999) observaram que 18,34% (11/60) das amostras de lingüiça de carne de ave servidas na Unesp-SP apresentaram enumeração de coliformes fecais superiores a $5,0 \times 10^2$ NMP, enquanto CHAVES *et*

al. (2000) detectaram coliformes fecais em 15 (75%) das lingüiças comercializadas no município do Rio de Janeiro-RJ.

OLIVEIRA *et al.* (1999) ao analisarem 30 amostras de hambúrguer de frango comercializados em Niterói-RJ, observaram que o NMP de coliformes fecais das amostras variou de 4,0 a $4,6 \times 10^2$ NMP/g.

Em trabalho realizado por CARDOSO *et al.* (2005) com 29 amostras de carcaças e 35 cortes de frango provenientes de um abatedouro localizado no estado de São Paulo, os valores mínimos e máximos para o NMP de coliformes fecais por grama das amostras de carcaças e de cortes de frango obtidas foram <3 e $9,6 \times 10^2$, <3 e $11,2 \times 10^2$, respectivamente.

Considerando os resultados observados por outros pesquisadores que também avaliaram a presença de coliformes fecais em diferentes produtos avícolas, destaca-se VIEIRA & TEIXEIRA (1997) que estudaram as condições higiênico-sanitárias de carcaças de frango comercializadas em Poços de Caldas-MG, apresentaram uma variação com valores inferiores a $0,3$ a $1,1 \times 10^3$ NMP/g para coliformes a 45°C.

REZER & CARDONHA (2000) analisando carcaças de frango comercializadas em Natal-RN, verificaram a presença de coliformes fecais em 10 (100%) das amostras de feiras livres e 6 (60%) das amostras de supermercados, contagens superiores a 3×10^2 NMP/g estabelecidos pela legislação do estado de São Paulo.

CASTRO *et al.* (1997) relataram a presença de coliformes fecais em 100% das 140 amostras de fígado e de coxa/sobrecoxas comercializadas no estado de São Paulo. Já para carcaças inteiras, CARLONI *et al.* (1998) obtiveram valores de $1,1 \times 10^3$ NMP/g em amostras consumidas na cidade de Buenos Aires, Argentina.

Comparando-se os resultados obtidos por esses pesquisadores, pode-se verificar que existe uma discrepância muito grande em relação à presença dos

coliformes fecais nas amostras estudadas, demonstrando que as condições higiênico-sanitárias podem ser diferentes para cada estabelecimento produtor.

6.3- Testes de Sensibilidade a Antibióticos

TURTURA *et al.* (1990) obtiveram resultados semelhantes em culturas de *E. coli* isoladas de carcaças de frango comercializadas na Itália. No entanto, comparando-se os resultados aqui obtidos com trabalhos realizados no Brasil nas décadas de 70 e 80, é possível constatar-se uma evolução quantitativa de cepas de *E. coli* resistentes (MARTINS *et al.*, 2003). Por exemplo, FALCÃO *et al.* (1982) registraram 47% de cepas sensíveis em relação a todos os antibióticos testados. No presente estudo, apenas cerca de 27% das cepas foram sensíveis a todos os antibióticos.

MARTINS *et al.* (2003) isolaram 124 cepas de *Escherichia coli* de amostras de produtos de origem animal comercializadas no estado do Ceará e constataram que 63% das cepas possuíam caráter de resistência múltipla a antibióticos.

Em pesquisa realizada por CAMPOS *et al.* (2006) verificando o perfil de sensibilidade de 69 cepas de *E. coli* isoladas de um laticínio de Goiás, 42 (60,9%) cepas foram suscetíveis a todos os antibióticos testados, enquanto 27 (39,1%) apresentaram resistência à cefalotina, à tetraciclina e ao sulfametoxazol/trimetroprim. STÜRMER *et al.* (2004) analisando 406 cepas de *E. coli* isoladas de fezes de pacientes internados na Alemanha, observaram resistência de 16,7% à ampicilina, 0,7% à ciprofloxacina e 8,6% ao sulfametoxazol/trimetroprim. Na presente pesquisa foi observada resistência das cepas somente ao sulfametoxazol/trimetroprim.

Em uma pesquisa realizada com 1.142 cepas de *E. coli* isoladas de amostras de urina de pacientes hospitalizados no Canadá, 37,7% das cepas foram

resistentes à ampicilina, 5,5% resistentes à ciprofloxacina e 21,3% foram resistentes ao sulfametoxazol/trimetroprim (ZHANEL *et al.*, 2000).

Estudo realizado por BACCARO *et al.* (2002), em amostras de *E. coli* isoladas de fezes de leitões de granjas no estado de São Paulo, revelou resistência de 87,4% das amostras ao sulfametoxazol/trimetroprim e 86,8% à ampicilina.

Em estudo conduzido por GALES *et al.* (2000) com 262 cepas de *E. coli* isoladas da urina de pacientes hospitalizados na América Latina, a resistência à ampicilina foi de 58,8% e a ciprofloxacina de 8,1%. Fato que não foi constatado em nossa pesquisa.

Amostras de *E. coli* usualmente são sensíveis à gentamicina, amicacina, trimetoprim, sulfazotrim (sulfametoxazol + trimetoprim) e ceftiofur, e resistentes a tetraciclina, estreptomicina, sulfonamidas, ampicilina e kanamicina (PALÚ *et al.*, 2000), dados confirmados nesta pesquisa, onde o maior índice de sensibilidade foi observado para amicacina, gentamicina, ambos com 100% de eficácia.

Trabalho realizado por CARDOSO *et al.* (2005) mostrou que as cepas de *E. coli* provenientes de frangos de corte oriundos da indústria avícola de Descalvado, apresentaram uma alta percentagem de resistência aos antimicrobianos, sendo a fosfomicina o antimicrobiano mais eficiente, com menor índice de resistência (45,4%), e o ácido oxolínico o que apresentou maior resistência (87,9%). As cepas de *E. coli* provenientes das matrizes apresentaram, em média, taxas de resistência superiores a 50%.

Este aumento, provavelmente, está relacionado ao uso abusivo de antibióticos, que favorece a seleção de linhagens com diferentes mecanismos de resistência, bem como a transferência dos genes responsáveis por estas características, através de plasmídeos de resistência (DAVIES, 1994).

As cepas de *E. coli* isoladas de aves são frequentemente resistentes para mais de uma droga (GROSS, 1991), e o uso indiscriminado de antimicrobianos é o

fator mais importante para promover a seleção e disseminação dessa resistência (WITTE, 1998).

A resistência adquirida pela bactéria *E. coli* devido a utilização inadequada de antimicrobianos e de administração em doses sub-terapêuticas, apenas selecionam os agentes bacterianos mais resistentes, e não debelam a infecção (FERREIRA & KNOBL, 2000).

Os antimicrobianos utilizados têm alta ação destrutiva nas células bacterianas, mas mesmo com este potencial, as cepas de *E. coli* estão se tornando resistentes a ação antimicrobiana, fato que foi evidenciado neste trabalho.

Os resultados encontrados no presente estudo foram verificados também por CLOUD *et al.* (1985), ALLAN *et al.* (1993), AMARA *et al.* (1995), PEIGHAMBARI *et al.* (1995), os quais relataram também altas taxas de resistência aos antimicrobianos testados.

KIM *et al.* (2005) isolaram 132 cepas de *K. pneumoniae* de fontes alimentares comercializadas em Oklahoma, todos os isolados foram resistentes à ampicilina, tetraciclina, estreptomicina, gentamicina e canamicina. A produção de betalactamases nas cepas isoladas foi responsável pela resistência aos antibióticos beta-lactâmicos. No presente estudo a maioria das cepas apresentou resistência a ampicilina e sensibilidade a gentamicina, corroborando com o resultado obtido pelo autor citado.

A multi-resistência tem sido citada por diversos autores, apresentando níveis mais elevados em cepas isoladas de suínos e aves, quando comparada a isolados de bovino (BACCARO *et al.*, 2002), fato que se deve à pressão de seleção causada pela adição indiscriminada de antibióticos na ração animal.

O alto nível de resistência múltipla a antibióticos representa um risco potencial para a saúde pública e pode dificultar o tratamento de doenças humanas e de animais, agravando quadros clínicos potencialmente curáveis (FREITAS *et al.*, 2004).

NASCIMENTO *et al.* (2005) estudaram 41 amostras de alface coletadas em feiras livres na cidade de São Luís no Maranhão e isolaram 28 cepas de *E. coli*, 4 de *C. freundii*, 3 de *S. marcescens*, 3 de *K. pneumoniae* e 3 de *E. aerogenes*. As cepas que apresentaram maior resistência foram as de *K. pneumoniae*, o autor sugere que essas cepas seriam produtoras de ESBL.

Quanto maior a resistência da bactéria aos antibióticos, maiores são as suas condições de sobrevivência, não só em ambiente hospitalar, quanto extra-hospitalar, além de grande facilidade de adquirir resistência a outros antibióticos e/ou quimioterápicos (NUNES *et al.*, 2001).

Conhecer as bactérias resistentes a antibióticos é uma atividade que merece atenção, uma vez que o alimento é uma porta de entrada para estes microrganismos nos seres humanos.

Provavelmente, o alto grau de resistência exibido por essa bactéria e demais cepas esteja relacionado com a produção de enzimas betalactamases, que inativam as drogas de espectro beta-lactâmicos (TAVARES, 1993; PITOUT, 1997), ou devido à resistência mediada por outras enzimas.

Considerando o resultado de sensibilidade de cepas de *Enterobacter aerogenes* à ciprofloxacina, o resultado aqui apresentado sugere que essa droga pode ser útil na eventual necessidade de um tratamento no caso de infecções associadas com as cepas de *E. aerogenes* isoladas neste estudo.

Entretanto, BAZILE-PHAM-KHAC *et al.* (1996) e LAMBIE *et al.* (2000) observaram um aumento na resistência às novas quinolonas em cepas isoladas de frangos de corte. Nesta pesquisa a ciprofloxacina mostrou-se eficiente para a maioria das cepas testadas.

Do gênero *Enterobacter* spp as espécies mais comumente encontradas são: *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *E. agglomerans* e *E. sakazakii*. Infecções por *E. aerogenes* podem ser adquiridas de fontes endógenas e exógenas, pois essa

bactéria é ubíqua. Várias espécies têm sido encontradas em fezes humanas, de animais, água, alimentos e insetos (SANDERS & SANDERS, 1997).

Na pesquisa realizada por LÁZARO *et al.* (1999) foi testado o nível de resistência de enterobactérias, isoladas das mãos de manipuladores de alimentos e das superfícies de produtos cárneos não-processados da Unidade de Alimentação da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Verificaram que mais de 50% das cepas isoladas mostraram-se resistentes à ampicilina, cefalotina, estreptomicina e tetraciclina, sendo a ampicilina (86,3% dos isolados) considerada o marco de resistência.

É de extrema importância o isolamento do agente causador da infecção e posteriormente realização do teste de susceptibilidade, o qual indicará o melhor antimicrobiano para a prescrição de tratamentos, evitando-se assim o uso inadequado que possa causar uma seleção bacteriana resistente.

O uso indiscriminado de antibióticos, na terapêutica avícola e como promotores de crescimento em rações, tem sido apontado como causa de multi-resistência de patógenos e levado à seleção de bactérias resistentes dentro do ecossistema.

Com o declínio de efetividade dos antimicrobianos existentes, as infecções serão mais difíceis de tratar e tornar-se-ão também mais onerosas, e conseqüentemente, as epidemias serão mais difíceis de controlar.

Os resultados do presente trabalho são importantes não apenas para a avicultura como também para a medicina humana, devido aos riscos de transferência de bactérias dos animais para humanos. Entretanto, SADER (2004) afirmou que não foi documentada ainda ligação entre resistência em hospitais e uso de aditivos antimicrobianos em animais produtores de alimentos.

6.4- Detecção de cepas produtoras de ESBL's

Atualmente as ESBL representam o maior grupo de betalactamases estudado mundialmente e têm sido motivo de extensivas investigações microbiológicas, bioquímicas, genéticas e epidemiológicas (REIS *et al.*, 1998).

As ESBL inativam muitas das cefalosporinas de terceira geração, enquanto que os carbapenêmicos são relativamente resistentes a estas enzimas versáteis. As bactérias Gram-negativas têm estado suficientemente cheias de recursos como a produção de betalactamases que inativam antibióticos em forma específica, como o imipenem, que são resistentes à ação da maior parte das outras enzimas (KONEMAN *et al.*, 2006).

Um dos principais problemas causados por estas enzimas é decorrente do fato de sua produção ser induzida durante a terapêutica antimicrobiana. Dessa maneira, quando a amostra bacteriana é detectada pelo laboratório de microbiologia, ela é aparentemente sensível às cefalosporinas de terceira geração e penicilinas de amplo espectro, porém, durante o tratamento pode ocorrer indução da produção de grandes quantidades de enzimas e o paciente começar a evoluir mal, ocorrendo "recidiva" da infecção. Uma nova amostra da bactéria é isolada e esta poderá se mostrar resistente a um antimicrobiano (utilizado para o tratamento) para o qual a bactéria era inicialmente sensível, podendo até ser interpretado como erro laboratorial quando da avaliação da primeira amostra (SILVA & SALVINO, 2000).

É de suma importância avaliar a freqüência de bactérias produtoras de ESBL para que se possa estabelecer como rotina no laboratório de microbiologia clínica a inclusão dos antibióticos nos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos que auxiliam em tal identificação como ceftriaxona, ceftazidima, cefotaxima, cefpodoxima, aztreonam, tobramicina, ciprofloxacina e os discos que possuem os inibidores associados como amoxicilina/ácido clavulânico, sulbactam/ampicilina ou ticarcilina/ácido clavulânico. Esta seleção pode ajudar ao Clínico, evitando ocorrência de falha terapêutica (KONEMAN *et al.*, 2006).

Nesta pesquisa, das 11 cepas de *Escherichia coli*, 22 de *Klebsiella pneumoniae* e 19 de *Enterobacter aerogenes*, apenas 4, 9 e 5 cepas apresentaram o fenótipo produtor de ESBL's, respectivamente, e destas somente 3 (33%) das cepas de *Klebsiella pneumoniae* e 3 (60%) das cepas de *Enterobacter aerogenes* foram confirmadas como produtoras de ESBL's.

O primeiro relato de cepas produtoras de ESBL ocorreu em Frankfurt, na Alemanha em 1983, onde enzimas do tipo SHV foram isoladas de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. A análise destas cepas demonstrou posteriormente que a resistência devia-se à produção de uma betalactamase plasmidial transferível, derivada de SHV-1, sendo denominada SHV-2. Desde então, têm sido descritas em todo mundo numerosas enzimas dos tipos TEM e SHV com este fenótipo de resistência (PELOSO *et al.*, 2007).

Cepas de *Klebsiella* spp e *Escherichia coli* são as bactérias mais comuns produtoras de ESBL, porém já foram detectadas em diversas outras espécies de Enterobacteriaceae e em *Pseudomonas aeruginosa*. Atualmente existem mais de 150 ESBL descritas, das quais mais de 90 são do tipo TEM e mais de 25 dos tipos SHV e OXA. As enterobactérias produtoras de ESBL têm sido isoladas com maior frequência em amostras procedentes de pacientes hospitalizados, porém também podem ser encontradas em amostras de origem comunitária. Estes isolamentos podem aparecer de forma esporádica, sem relação epidemiológica ou dar lugar a surtos nosocomiais (PELOSO *et al.*, 2007).

Klebsiella pneumoniae é um dos bacilos gram-negativos mais frequentemente isolados como causa de infecções hospitalares (YINNON *et al.*, 1996), chegando a ser responsável por até 29% das infecções de um hospital (MYEROWITZ *et al.*, 1971). As infecções causadas por *K. pneumoniae* estão associadas com alta morbimortalidade (MEYER *et al.*, 1993).

A prevalência de amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL varia entre diferentes regiões, sendo relatada como 9,6% na França (SIROT *et al.*, 1987), 14% no Reino Unido (LIN *et al.*, 1992), 24% na Grécia (VATOPOULOS *et al.*, 1990) e 9% na Hungria (NAGY *et al.*, 1998). Estudo multicêntrico envolvendo hospitais em

três diferentes cidades brasileiras demonstrou que a *K. pneumoniae* foi a causa de 9,7% das infecções de corrente sanguínea, 11% das do trato respiratório inferior, 7% das de pele e mucosas, feridas, e também por 11,7% das ocorridas nas UTI. Destas, mais de 50% eram produtoras de betalactamases (SADER *et al.*, 2001). Outras infecções como endocardite e meningite também podem ser causadas por este agente (MEYER *et al.*, 1993; PAYNE *et al.*, 1994).

De 134 amostras de *K. pneumoniae* isoladas de corrente sanguínea de pacientes internados no hospital de São Paulo no período de julho de 1996 a julho de 2001, 72 amostras (53,8%) foram classificadas como produtoras de ESBL e 62 (46,2%) como não-produtoras (PEREIRA *et al.*, 2003).

PALUCHA *et al.* (1999) isolaram 35 cepas de 7 espécies diferentes da família *Enterobacteriaceae* provenientes de pacientes hospitalizados no Hospital de Varsóvia e constataram que 16% das cepas de *Klebsiella pneumoniae*, 16% de *Citrobacter freundii* e 32% de *Serratia marcescens* eram produtoras de ESBL.

COUDRON *et al.* (2003) testaram 190 cepas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas da circulação sanguínea de 189 pacientes hospitalizados em 30 hospitais norte-americanos e observaram que 18 (9,5%) dos isolados eram produtores de ESBL.

PAGANI *et al.* (2003) testando 12 cepas pertencentes a família *Enterobacteriaceae* (1 de *Klebsiella pneumoniae*, 8 de *Escherichia coli*, 1 de *Proteus mirabilis* e 2 de *Proteus vulgaris*) isoladas em hospital no norte da Itália, verificaram a produção de ESBL por todas as cepas testadas.

WU *et al.* (2003) verificaram a produção de ESBL em cepas de enterobactérias isoladas de Unidades Pediátricas de Cuidado Intensivo (PICU). O aparecimento e disseminação de enterobactérias produtoras de ESBL em PICU são a consequência da disseminação clonal de algumas tensões epidêmicas junto com a transmissão de resistência entre os organismos bacterianos.

SILVA & SALVINO (2000) isolaram 366 enterobactérias a partir de amostras clínicas diversas (sangue, urina, secreções, lavado bronco-alveolar, cateter etc) sendo 53 enterobactérias produtoras de ESBL (14,5%).

KIM *et al.* (2002) isolaram 17,9% cepas de *E. coli* e 52,9% de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL provenientes de 157 amostras de sangue provenientes de um hospital na Coreia.

RAMOS *et al.* (2005) analisaram 60 isolados, sendo 30 de *Klebsiella pneumoniae* e 30 de *Escherichia coli* e verificaram que 14/60 (23,3%) produziam ESBL e destes 11/30 (36,6%) eram *K. pneumoniae* e 3/30 (10%) eram *E. coli*.

A ocorrência de ESBL em outras espécies de enterobactérias, além das tradicionais *Escherichia coli* e *Klebsiella spp*, já tem sido descrita por vários autores (BONNET *et al.*, 2000; MENDES *et al.*, 2000; TENOVER *et al.*, 1999; VARELA *et al.*, 2001). Existe, no entanto, grande dificuldade em avaliar essa ocorrência devido à falta de uma metodologia padronizada.

Pacientes com infecções por enterobactérias produtoras de ESBL não devem ser medicados com antibióticos betalactâmicos, o que acarretaria em falha terapêutica e agravamento do quadro infeccioso.

Para o controle de surtos ocasionados por cepas produtoras de ESBL têm sido aplicadas medidas como a restrição do consumo de cefalosporinas de terceira geração, isolamento dos pacientes colonizados e/ou infectados e educação das pessoas que trabalham diretamente com os pacientes quanto ao cuidado com a manipulação destes e a correta lavagem das mãos. O problema do tratamento das infecções causadas por cepas de bactérias que produzem ESBL é universal e ocorre principalmente em hospitais que utilizam de maneira indiscriminada as cefalosporinas de amplo espectro de ação (SILVA & SALVINO, 2000).

A dificuldade na detecção de cepas produtoras de ESBL é decorrente de vários fatores, como a grande variedade de tipos de ESBL, que podem variar de cepa para cepa e alterações na potência e afinidade das betalactamases aos

diferentes antimicrobianos betalactâmicos. A detecção laboratorial apresenta grande importância, uma vez que há vários relatos de falência terapêutica devido ao uso de cefalosporinas de terceira geração e penicilinas de amplo espectro no tratamento de infecções causadas por cepas produtoras de ESBL (REIS *et al.*, 1998).

A detecção presuntiva de ESBL não acarreta custos adicionais ao laboratório, visto que os antimicrobianos necessários para tal detecção podem compor o conjunto de discos utilizados na rotina laboratorial em antibiogramas. O trabalho no laboratório de microbiologia é imprescindível na detecção das enterobactérias produtoras de ESBL.

A detecção precoce destas bactérias multi-resistentes é de suma importância para se instaurar o tratamento adequado e as medidas de isolamento dos pacientes, necessárias para se evitar a disseminação destes patógenos em surtos comunitários e nosocomiais.

7- CONCLUSÃO

Foi possível constatar que a carne de frango apresentou falhas em relação a qualidade microbiológica, como demonstrado pela presença de elevado número de bactérias aeróbias mesófilas, coliformes a 35°C e coliformes a 45°C, sinalizando para o risco potencial de ocorrência de DTA, inclusive por microrganismos multi-resistentes à antimicrobianos e produtores de ESBL.

A implementação de um sistema de Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (APPCC), envolvendo todas as etapas do processamento, pode constituir uma medida eficaz para a melhoria da qualidade e segurança do produto.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEF. Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frangos. Produção brasileira e Consumo brasileiro de carne de frangos. Disponível em: <<http://www.abef.com.br/estatisticas/MercadoInterno/producao.htm>>. Acesso em: 11 jan. 2006a.

ABEF. Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frangos. Produção brasileira e Consumo brasileiro de carne de frangos. Disponível em: <<http://www.abef.com.br/estatisticas/MercadoInterno/consumoanual.htm>>. Acesso em: 11 jan. 2006b.

ABEF. Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frangos. Disponível em: <http://www.abef.com.br/Relatorios_Anuais/Rel2006.zip.htm>. Acesso em: 26 ago. 2007.

ABU-RUWAIDA, W. N.; SAWAYA, W. N.; DASHTI, B. H.; MURAD, M.; AL-OTHMAN, H. A. Microbiological quality of broilers during processing in a modern commercial slaughterhouse in Kuwait. **Journal of Food Protection**, v. 57, n.10, p. 887-892, 1994.

ALBUQUERQUE, R; ITO, N. M. K.; MIYAJI, C. I. Estudo comparativo de diferentes meios de cultura para isolamento de Salmonelas em matérias-primas e rações. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.37, n.1, 2000.

ALLAN, B.J.; VAN DEN HURK, J.; POTTER, A.A. Characterization of *Escherichia coli* isolated from cases of avian colibacillosis. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v.57, p.146-151, 1993.

ALMEIDA, P. F. & SERRANO, A. M. Ocorrência de *Campylobacter fetus* subespécie *jejuni* em carcaças de frango e suínos. **Microbiology**, v. 18, p. 279-83, 1987.

ALMEIDA, P. F. & SILVA, E. N. Estudos sobre o controle e disseminação bacteriana em carcaças de frangos de abatedouros industriais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.44, n.2, p. 105-120, 1992.

ALTEKRUSE, S. F.; HUNT, J. M.; TOLLEFSON, L. K.; MADDEN, J. M. Food and animal sources of human *Campylobacter jejuni* infection. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.204, p.57-61, 1994.

AMARA, A.; ZIANI, Z.; BOUZOUBAA, K. Antibioresistance of *Escherichia coli* strains isolated in Morocco from chickens with colibacillosis. **Veterinary Microbiology**, v.43, p.325-330, 1995.

AMBLER, R. P. The structure of β -lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 289, p. 321-331, 1980.

AQUINO, M. H. C., FRANCO, R. M., TIBANA, A. *Campylobacter jejuni* na avicultura: importância e método de controle. **Higiene Alimentar**, v. 9, n. 36, p. 17-19, 1995.

ARUMUGAS WAMY, R. K. Prevalence of *Salmonella* in raw and cooked foods in Malaysia. **Food Microbiology**, v.12, n.1, p.3-8, 1995.

BACCARO, M. R.; MORENO, A. M.; CORRÊA, A.; FERREIRA, A. J. P.; CALDERARO, F.F. Resistência antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de fezes de leitões com diarreia. **Arquivos do Instituto Biológico**, 69(2):15-18, 2002.

BAILEY, J. S. Control of *Salmonella* and *Campylobacter* in poultry production. A Summary of Work at Russel Research Center. **Poultry Science**, v. 72, p. 1169-1173, 1993.

BAZILE-PHAM-KHAC, S.; TRUONG, Q. C.; LAFONT, J. P.; GUTMANN, L.; ZHOU, X. Y.; OSMAN, M.; MOREAU, N. J. Resistance to fluoroquinolones in *Escherichia coli* isolated from poultry. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.40, n.6, p.1504-1507, 1996.

BERCHIERI JR, A.; FERNANDES, S. A.; IRINO, K.; QUINTANA, J. L.; SANTOS, A. J. *Salmonella* in poultry feeds in Brazil. **Revista de Microbiologia**, 24(1): 22-25, 1993.

BERGDOLL, M. S. Analytical methods for *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 10, p.91-100, 1999.

BLACK, J. G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. Traduzido por Eiler Fritsch Toros. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kogan, 2002. Cap. 13, p.316-347. Título do original: Microbiology.

BLANCO, J. E.; BLANCO, M.; MORA, A.; BLANCO, J. Prevalence of bacterial resistance to quinolones and other antimicrobials among avian *Escherichia coli*

strains isolated from septicemic and healthy chickens in Spain. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35(8):2184-2185, 1997.

BLASER, M. J., LAFORCE, F. M., WILSON, N. A., WANG, W. L. L. Reservoirs for human campylobacteriosis. **Journal Infectious Diseases**, v. 141, p. 665-9, 1980.

BONNET, R.; SAMPAIO, J. L. M.; LABIA, R.; CHAMPS, C.; SIROT, D.; CHANAL, C.; SIROT, J. A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 44: 1936-1942, 2000.

BONTEN, M.; STOBBERINGH, E.; HOUBEN, A. High prevalence of antibiotic resistant *Escherichia coli* in faecal samples of students in the south-east of the Netherland. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.26, p.585-592, 1990.

BOULOS, M. E. M. S. Segurança alimentar: uma preocupação – questão de atualizar e viabilizar informação. **Nutrição em Pauta**, p.21-23, nov/dez, 1999.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14(4), p. 933-951, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 451 de 19 de setembro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 22 set. 1997. Seção 1, p. 21005-21012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, p. 46-53.

BROWN, L. R. Carnes. Mercado em alta. Disponível em: <<http://www.joelmirbeting.com.br/noticias.asp?ldgNews=6eldnews=196>>. Acesso em: 27 out. 2006.

BRUINSMA, N.; HUTCHINSON, J. M.; VAN DEN BOGAARD, A. E.; GIAMARELLOV, H.; DEGENER, J.; STOBBERING, E. E. Influence of population density on antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.51, p.385-390, 2003.

BUCHANAN, R. L. Feasibility of using microbiological indicator assays to detect temperature abuse in refrigerated meat, poultry and seafood products. **Food Microbiology**, v.9, p.279-301, 1992.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structures. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39(6):1211-1233, Jun, 1995.

CAMPOS, M. R. H.; KIPNIS, A.; ANDRÉ, M. C. D. P. B.; VIEIRA, C. A. S.; JAYME, L. B.; SANTOS, P. P.; SERAFIM, A. B. Caracterização fenotípica pelo antibiograma de cepas de *Escherichia coli* isoladas de manipuladores de leite cru e de queijo "Minas Frescal" em um laticínio de Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, v.36, n.4, p.1221-1229, jul./ago., 2006.

CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C.; GARCIA-LINARES, M. C.; MORENO, B.; GARCIA-FERNÁNDEZ, M. C. *Salmonella* y salmonelosis humana. **Alimentaria**, 313:91-98, 2000.

CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C.; GARCÍA-FERNÁNDES, M. D. C.; MORENO, B. Microbiological quality of retail poultry carcasses in Spain. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 12, p. 1961-1966, 2001.

CARDOSO, A. L. S. P.; TESSARI, E. N. C.; CASTRO, A. G. M. Pesquisa de *Salmonella* sp, coliformes totais, coliformes fecais e mesófilos em carcaças e produtos derivados de frango. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.67, n.1, 2000.

CARDOSO, A. L. S. P.; CASTRO, A. G. M.; TESSARI, E. N. C.; BALDASSI, L.; PINHEIRO, E. S. Pesquisa de *Salmonella* spp, coliformes totais, coliformes fecais, mesófilos, em carcaças e cortes de frango. **Higiene Alimentar**, v.19, n.128, p.144-150, 2005.

CARLONI, G.; MÁZ, J.; GODALY, S.; LÚQUEZ, R. Estado higiênico-sanitario de pollos para consumo en la ciudad de Buenos Aires y sus alrededores. **Veterinaria Argentina**, v.15, n.141, p.26-31, 1998.

CARMO, L. S.; DIAS, R. S.; LINARDI, V. R.; PENA, E. C.; JETT, M.; HENEINE, L. G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in minas cheese and raw milk in Brazil. **Food Microbiology**, v. 14, p. 9-14, 2002.

CARVALHO, A. C. F. B. & COSTA, F. N. Ocorrência de *Campylobacter* sp em carcaças e cortes de frango ao nível industrial e comercial. **Higiene Alimentar**, v. 10, n. 46, p. 41-47, 1996.

CARVALHO, A. C. F. B. – Determinação do NMP de *Campylobacter* em vísceras comestíveis de frango refrigerados. **Higiene Alimentar**, v. 12, n. 55, p. 63-65, 1998.
CARVALHO, L. T.; COSTA, P. S.; CARVALHO, A. L. T. Análise de perigos e pontos críticos de controle na linha de produção de frango inteiro congelado. **Higiene Alimentar**, v.16, n.95, p. 34-42, abr, 2002.

CARVALHO, A. C. F. B. & CORTEZ, A. L. L. *Salmonella* spp em carcaças, carne mecanicamente separada, lingüiças e cortes comerciais de frango. **Ciência Rural**, v.35, n.6, p.1465-1468, nov./dez., 2005.

CASTRO, A. G. M.; GENOVEZ, M. E.; SCARCELLI, E.; TORRES, A. P.; PASCHOAL, A. L. S.; SOUZA, C. A. I.; CARRASCO, S. Monitoramento de *Campylobacter* spp ao longo da linha de abate de frangos de corte. **Arquivos Instituto Biológico**, v.64, n.2, p.21-26, 1997.

CHARLES, D. R. Poultry meat: a food for today. Disponível em: <<http://www.foodsciencecentral.com/library.html#ifis/11702>>. Acesso em: 27 out. 2006.

CHASLUS D. E.; GERBAUD, G.; LAGORCE, M.; LAFONT, J. P.; COURVALIN, P. Persistence of an antibiotic resistance plasmid in intestinal *Escherichia coli* of chickens in the absence of selective pressure. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.31(5), p.784-788, 1987.

CHAVES, G. M. C.; GONÇALVES, P. M. R.; FRANCO, R. M.; CARVALHO, J. C. A. P. Avaliação Microbiológica de lingüiça frescal suína comercializada no Município do Rio de Janeiro-RJ. **Higiene Alimentar**, v.14, n.73, p.48-52, 2000.

CHESCA, A. C.; ANDRADE, S. C. J.; D'ANGELIS, C. E. Avaliação higiênico-sanitária de produtos cárneos artesanais. **Higiene Alimentar**, v.18, n.118, p.71-75, 2004.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. **CLSI**. Wayne. PA, 2005.

CLOUD, S. S.; ROSENBERGER, J. K.; FRIES, P. A.; WILSON, R. A.; ODOR, E. M. In vitro and in vivo characterization of avian *Escherichia coli*. serotypes, metabolic activity, and antibiotic sensitivity. **Avian Diseases**, v.29, p.1084-1093, 1985.

COHEN, M. L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. **Science**, Washington, v.257, n.1, p.1050-1055, 1992.

COSTA, F. N. & ROSSI JÚNIOR, O. D. Bactérias do gênero *Aeromonas* em abatedouro de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.54, n.5, out, 2002.

COUDRON, P. E.; HANSON, N. D.; CLIMO, M. W. Occurrence of extended spectrum β -lactamase in bloodstream isolates of *Klebsiella pneumoniae*: isolates harbor plasmid-mediated FOX-5 and ACT-1 AmpC β -lactamases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41(2), p. 772-777, 2003.

CWIKOVÁ, O.; HOVORKOVÁ, A.; MRÁZ, O. *Aeromonas* in slaughtered chickens: their species and pathogenic factors. **Acta Veterinária Brunensis**, v.62, p.95-102, 1993.

DAVIES, J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. **Science**, v.264, p.375-382, 1994.

DELAZARI, I. Aspectos microbiológicos ligados a segurança e qualidade da carcaça de aves. In: SEMANA ACADÊMICA VETERINÁRIA, 8., 1998, São Paulo. **Anais...** São Paulo: 1998. p.71-77.

DELÚ, M. A. F.; SBAMPATO, C. G.; MENDONÇA, A. T.; PICCOLI, R. H.; MAIA, S. C. Avaliação microbiológica de cortes de frango resfriado, comercializados no município de Lavras, MG. **Higiene Alimentar**, v.20, n.138, p.83-85, jan/fev 2006.

DICKEL, E. L.; SANTOS, L. R.; RODRIGUES, L. B.; VALLE, S. F.; CECATTI, D.; PILOTTO, F.; NASCIMENTO, V. P. Ocorrência de *Salmonella* em abatedouros de aves com tecnologia totalmente automatizada (grande porte), semi automatizada (médio porte) e semi automatizada (pequeno porte). **Higiene Alimentar**, v.19, n.131, p. 62-67, mai. 2005.

DOYLE, M. P. *Campylobacter jejuni*. In: OBLINGER, J. L. Bacteria associated with foodborne disease - A scientific stratus summary. Chicago, **Institute of Food Technologists**, p. 1-18, 1988.

FALCÃO, D. P.; LIMA, B. M.; NARINI, E.; SHIMIZU, N. T. Resistência a drogas em enterobactérias isoladas de alimentos. **Revista de Microbiologia**, 13(4): 402-411, out/dez, 1982.

FERREIRA, A. J. P. & KNOBL, T. Doenças das aves. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2000, Campinas. **Anais...**Campinas: FACTA – Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas , p.197-205, 2000.

FIGUEIREDO, E. A. P. Avicultura de corte ou de postura? Disponível em: <<http://www.bichoonline.com.br/artigos/embrapave0003.htm>>. Acesso em: 27 out. 2006.

FIGUEREDO, M. I. F. G.; MELO, M. O.; OLIVIERA, C. D. D.; NASCIF JÚNIOR, L. A.; RABELO, R. N. Avaliação microbiológica de cortes cárneos de frango comercializados na cidade de Franca-SP. **Higiene Alimentar**, v.21, n.150, p.210-211, abril, 2006.

FIGURA, N. & MARRI, L. Isolation of *Aeromonas* species from animals. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.4(3), p.354-355, 1985.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Trad. Maria Carolina Minardi Guimarães e Cristina Leonhardt – Porto Alegre: Artmed, 2002. p. 211-216.

FRANCHIN, P. R.; AIDOO, K. E.; BATISTA, C. R. V. Sources of poultry meat contamination with thermophilic *Campylobacter* before slaughter. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p. 157-162, 2005.

FRANCISCO, W & JEA, A. H. Y. Resistência à Beta-Lactamases por Presença de ESBL. <<http://www.fleury.com.br/mednews/0301/mdcontfcb0302.htm>> Acesso em: 14/01/2006

FRANCO, B. D. G. M. & LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo, Ed. Atheneu, 1996. 182p.

FRAZIER, W. C. **Microbiologia de los alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1976. 512p.

FRAZIER, W. C. & WESTHOFF, D. C. **Microbiología de los alimentos**. 4. ed. Zaragoza: Acribia, 2000. 681p.

FREITAS, M. F. L.; MOTA, R. A.; LEÃO, A. E. D. S.; FIGUEIREDO, M. L.; FONTE, M. M.; VIEIRA, R. F. C. Sensibilidade antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus* spp isoladas de carcaças de frango comercializadas em Recife. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.3, p.405-407, 2004.

FRENCH, G. L.; SHANNON, K. P.; SIMMONS, N. Hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* resistant to broad-spectrum cephalosporins and beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combinations by hyperproduction of SHV-5 beta-lactamase. **Journal Clinical Microbiology**, 34(2):358-363, Feb, 1996.

FUZHARA, T. O.; MURAKAMI, K. A.; VANNUCI, L. *Aeromonas hydrophila*: ocorrência em águas de consumo humano. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 18, 1995, Santos. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1995, p.28.

GALES, A. C.; JONES, R. N.; GORDON, K. A.; SADER, H. S.; WILKE, W. W. BEACH, M. I.; PHALLER, M. A.; DOERM, G. V. Activity and spectrum of 22 antimicrobial agents tested against urinary tract infection pathogens in hospitalized patients in Latin America: report from the second year of the SENTRY antimicrobial surveillance program. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 45:295-303, 2000.

GARCÍA-RODRÍGUES, J. A.; FRESNADILLO, M. J.; GARCÍA, M. I.; GARCÍASÁNCHEZ, E.; GARCÍA -SÁNCHEZ, J. E.; TRUJILLANO, I. Multicenter Spanish study of ciprofloxacin susceptibility in gram-negative bacteria. **European Journal of Clinical Microbiology & Infection Diseases**, v.14(5), p.456-459, 1995.

GELLI, D. S.; JAKABI, M.; SAKATA, H; FERNANDES, S. A.; TRAVECCHIO, A. T. Salmonelas isoladas de alimentos no período de 1985-1996 no estado de São Paulo, Brasil. In: CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS (COMBHAL), 5, Águas de Lindóia, 1998. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1998, p.105, res.Q.101.

GIUROV, B.; KORUDZHIISKI, N.; BINEVA, I. Drug resistance of *Escherichia coli* strains isolated from poultry. **Veterinary Science**, v.18, n.8, p.12-18, 1981.

GNIADROWSKI, M. Evaluation and epidemiology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and ESBL-producing organisms. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 7(11): 597-608, 2001.

GONÇALVES, P. M. R.; FRANCO, R. M.; ZAMBORLINI, L. C. Enumeração de enterococos e coliformes fecais, pesquisa de *Salmonella* e indicação presuntiva de *Proteus*, em cortes e miúdos de frango (*Gallus domesticus*) congelados. **Higiene Alimentar**, v.12, n.54, p.42-47, 1998.

GONÇALVES, P. M. R. Toxinfecções alimentares: uma revisão. **Higiene Alimentar**. v.12, n.53, p.38-44, 1998.

GRANT, I. H., RICHARDSON, N. J., BOOKKENHEUSER, V. D. Broiler chickens as potencial source of *Campylobacter* infections in humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 11(5), p. 508-510, 1980.

GROSS, W. B. Colibacilosis. In: HOFSTAD, M. S.; CALNECK, B. W.; HELMBOD, C. F.; REID, W. M.; YODER, H. W. **Disease of poultry**. Ames: Iowa State University Press, p.138-144, 1991.

HANDFIELD, M.; SIMARD, P.; COUILARD, M. *Aeromonas hydrophila* isolated from food and drinking water: hemagglutination, hemolysis and cytotoxicity for a human intestinal cell line (HT-29). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62(9), p.3459-3461, 1996.

HÄNNINEN, M. L. & SIITONEN, A. Distribution of *Aeromonas* phenospecies and genospecies among strains isolated from water, foods or from human clinical samples. **Epidemiology Infectious**, v.115, p.39-50, 1995.

HERNANDEZ, J. R.; PASCUAL, A.; CANTON, R.; MARTINEZ-MARTINEZ, L. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido en hospitales españoles (Proyecto GEIH-BLEE 2000). **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 21, p. 77-82, 2003.

HILTON, M. H.; AL-CHALABY, Z. A. M.; HINTON, A. H. Field and experimental investigations into the epidemiology of *Salmonella* infections in broiler chickens. In: International Symposium Prevention of Contamination and Decontamination in the meat industry proceedings. Zeist, **Elsevier Science**, p.27-38, 1986.

HO, P. L.; CHAN, W. M.; TSANG, K. W.; WONG, S. S.; YOUNG, K. Bacteremia caused by *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamase: a casecontrol study of risk factors and outcomes. **Scandinavian Journal Infectious Diseases**, 34(8):567-73, 2002.

HOBBS, B. C. & ROBBERTS, D. **Toxinfecções e controle higiênico-sanitário de alimentos**. 1ed. São Paulo: Varela, 1993.

HOFFMAN, F. L.; GARCIA-CRUZ, C. H.; VENTURIM, T. M. Estudo higiênico-sanitário de frangos comercializados na cidade de São José do Rio Preto-SP. **Higiene Alimentar**, v.9, n.35, p.31-33, 1995.

HOFFMAN, F. L.; GARCIA-CRUZ, C. H.; VENTURIM, T. M. Estudo higiênico-sanitário de amostras de diferentes produtos cárneos. **Higiene Alimentar**, v.13, n.63, p.43-45, 1999.

ICMSF – International Commission on Microbiological Specification for Foods. **Ecol. Microbiol. de los factores que afectan a la sobrevivencia de los microorganismos em los alimentos**. Zaragoza, Acríbia, v.1, 1980, 332p.

IRINO, K. Progression of *Salmonella enteritidis* phage type 4 strains in São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.38, p.193-196, 1996.

JARAMILLO, H. F. **Espécies termofílicas de *Campylobacter*; aspectos bacteriológicos, epidemiológicos e patogênicos**. São Paulo, 1983, 114 p. Tese (Doutor em Ciências da Saúde), Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

JAURRAD, S.; PEYRAT, M. A.; LIM, A. egc a highly prevalent operon of enterotoxin gene, forms a putative nurse of superantigens in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Immunology**, v. 166(1), p. 669-677, 2001.

JAY, J. M. **Modern Food Microbiology**. 6ed. Maryland: Aspen. 6ed., 2000. 679p.

JONES, R. N.; PFALLER, M. A.; DOERN, G. V, ERWIN, M. C.; HOLLIS, R. J. Antimicrobial activity against strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp with resistance phenotypes consistent with an extended-spectrum beta-lactamase in Europe. **Clinical Microbiology and Infectious**, v. 9(7): 708-712, 2003.

KIM, Y. K.; PAI, H.; LEE, H. J.; PARK, S. E.; CHOI, E. H.; KIM, J.; KIM, J. H.; KIM, E. C. Bloodstream infections by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 46(5):1481-91, May, 2002.

KIM, S. H.; WEI, C. I.; TZOU, Y. M.; AN, H. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from farm environments and retail products in Oklahoma. **Journal of Food Protection**, 68(10):2022-2029, 2005.

KIROV, S. M. The public health significance of *Aeromonas* spp in foods. **International Journal of Food Microbiology**, v.20, p.179-198, 1993.

KNOTHE, H.; SHAH, P.; KREMERY, V.; ANTAL, M.; MITSUHASHI, S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole e cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection**, v. 11, p. 315-317, 1983.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN JR., W. C. – **Diagnóstico microbiológico**. Editora MEDSI, São Paulo, 2006. 1464p.

KVENBERG, J. E. & ARCHER, D. L. Economic impact of colonization control on foodborne disease. **Food Technology**, v.41, n.7, p.77-81, 1987.

LAMBIE, N.; NGELEKA, M.; BROWN, G.; RYAN, J. Retrospective study on *Escherichia coli* infection in broilers sul postmortem examination and antibiotic resistance of isolates in Trinidad. **Avian Diseases**, v.44, n.1, p.155-160, 2000.

LANDGRAF, M. & FRANCO, B. D. G. M. Doenças microbianas de origem alimentar provocadas por enteropatógenos. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v.17, p.77-113, 1996.

LAUTENBACH, E.; PATEL, J. B.; BILKER, W. B.; EDELSTEIN, P. H.; FISHMAN, N. O. Extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: risk factors for infection and impact of resistance on outcomes. **Clinical Infectious Diseases**, 32(8):1162-71, Apr, 2001.

LAZÁRO, N. S.; FARIAS, R. S.; RODRIGUES, D. P.; HOFER, E. Enterobacteriaceae oriundas de fontes humana e animal: produção de enterotoxina termoestável e nível de resistência a antimicrobianos. **Higiene Alimentar**, v.13, n.64, p.49-57, 1999.

LEITÃO, M. F. F. **Microbiologia de alimentos**. In: ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L. R.; AZEVEDO, J. L. Tratado de microbiologia, Manole, São Paulo, v.1, p. 3-81, 1988.

LEITÃO, M. F. F. Qualidade e segurança alimentar em produtos avícolas. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS. Campinas, SP. **Anais...** Facta- Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, p.215-232, 2002.

LETERTRE, C.; PERELLE, S.; DILASSER, F.; FACH, P. Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by *egc* cluster of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Applied Microbiological Research**, v. 2, p. 63-76, 2003.

LILLARD, H. S. The impact of commercial processing procedures on the bacterial contamination and cross-contamination of broiler carcasses. **Journal of Food Protection**, v.53, n.3, p.202-204, march, 1990.

LIN, P. Y. F.; GUR, D.; HALL, L. M. C.; LIVERMORE, D. M. Survey of the prevalence of betalactamases amongst 1000 Gram-negative bacilli isolated consecutively at the Royal London Hospital. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 30(4): 429-33, 1992.

LOIR, Y. L.; BARON, F.; GAUTIER, M. *Staphylococcus aureus* and Food Poisoning. **Genetics and Molecular Research**, v. 2(1), p. 63-76, 2003.

MACHADO, R. A. **Microbiota bacteriana no processamento industrial de frangos e sua influência na vida útil de carcaças refrigeradas**. São Paulo, 1992, 165p. Tese (Doutor em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP).

MARTINS, S. C. S.; LIMA, J. R.; ALMADA, J. S.; PEREIRA, A. I. B. "Screening" de linhagens de *Escherichia coli* multiresistentes a antibióticos, em alimentos de origem animal, no estado do Ceará, Brasil. **Higiene Alimentar**, v.17, n.104/105, p. 71-76, jan./fev. 2003.

MAY, K. N. Changes in microbial numbers during final washing and chilling of commercialy slaughtered broilers. **Poultry Science**, v.53, p.1282-1285, 1974.

MEAD G. C. Hygiene Problems and Control of Process Contamination. In: MEAD G. C. Processing of Poultry. New York. **Elsevier Applied Science**, p. 360-368, 1989.

MENDES, C.; HSIUNG, A.; KIFFER, C.; OPLUSTIL, C.; SINTO, S.; MIMICA, I.; ZOCCOLI, C. Evaluation of the *in vivo* Activity of 9 Antimicrobials Against Bacterial Strains Isolated from Patients in Intensive Care Units in Brazil: MYSTIC Antimicrobial Surveillance Program. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 4:236-244, 2000.

MENDES, A. A. Pré-slaughter feed withdrawal in broiler chickens. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v.3, n.3, set./dez., 2001.

MENDONÇA, S. C. Condições higiênico-sanitárias de mercados e feiras livres da cidade do Recife – PE. **Higiene Alimentar**, v.16, n.94, p.20-25, 2002.

MEYER, K. S.; URBAN, C.; EAGAN, J. A.; BERGER, B. J.; RAHAL, J. J. Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* infection resistant to late-generation cephalosporins. **Annals of Internal Medicine**, 119(5): 353-8, 1993.

MODOLO, J. R.; AUGUSTO FILHO, O.; PINTO, J. P. A. N.; PADOVANI, C. R.; SIMÕES, L. B.; CARVALHO, J. L. B. *Campylobacter* em carcaças resfriadas de frangos: Análise espacial do fator de risco para a saúde pública. **Higiene Alimentar**, v.19, n°135, p.40-46, set., 2005.

MULVEY, M. R.; SOULE, G.; BOYD, D.; DEMCZUK, W.; AHMED, R. Characterization of the first extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella* isolate identified in Canada. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41(1), p. 460-462, 2003.

MYEROWITZ, J. L.; MEDEIROS, A. D.; O'BRIEN, T. F. Recent experience with bacillemia due Gram-negative organisms. **The Journal of Infectious Diseases**, 124: 239-46, 1971.

NADVORNY, A.; FIGUEIREDO, D. M. S.; SCHMIDT, V. Ocorrência de *Salmonella* sp em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul, em 2000. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.47-51, 2004.

NAGY, E.; PRÁGAI, Z.; KOCZIÁN, Z.; HAJDÚ, E.; FODOR, E. Investigation of the presence of different broad-spectrum betalactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae. **Acta Microbiológica et Immunologica Hungarica**, 45(3-4): 433-46, 1998.

NASCIMENTO, V. P.; SANTOS, L. R.; CARDOSO, M. O.; RIBEIRO, A. R.; SCHUCH, D. M. T.; SILVA, A. B. Qualidade Microbiológica dos produtos avícolas. In: SIMPÓSIO GOIÂNIO DE AVICULTURA, 2., 1996, Goiânia. **Anais...** Goiânia: 1996. p.13-17.

NASCIMENTO, S. P. Rastreabilidade assegura qualidade de carne bovina. **Higiene Alimentar**, v.16, n.95, p.3-8, 2002.

NASCIMENTO, A. R.; MOUCHREK FILHO, J. E.; MOUCHREK FILHO, V. E.; MARTINS, A. G. L. A.; MARINHO, S. C.; SERRA, C. L. M.; ALVES, L. M. C. Avaliação da sensibilidade de antimicrobianos a cepas de *Enterobacteriaceae* isoladas de amostras de alface (*Lactuca sativa*) comercializada na cidade de São Luís-MA. **Boletim CEPPA**, v. 23, n. 2, jul./dez., 2005

NOCITI, D. L. P.; ROSSI JÚNIOR, O. D.; AMARAL, L.A. Bactérias do gênero *Aeromonas* em carcaças e cortes comerciais de frangos comercializados em Jaboticabal, Estado de São Paulo e comportamento das cepas frente a ação de antimicrobianos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.6, p.69-73, 1999.

NORMARK, B. H. & NORMARK, S. Evolution and spread of antibiotic resistance. **Journal of Internal Medicine**, n.252, p.91-106, 2002.

NORRBY, S. R. & NORD, C. E. Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. **Lancet Infectious Diseases**, v.5, p.115-119, Feb, 2005.

NUNES, A. P. F.; TEIXEIRA, L. M.; SANTOS, K. R. N. Antimicrobial resistance patterns among staphylococcal strains isolates in two hospitals at rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 21, 2001, Foz do Iguaçu. **Anais...** Paraná: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2001, p.156.

OLIVEIRA, L. A. T.; FERREIRA, T.; FRANCO, R. M.; CARVALHO, J. C. A. P. Enumeração de *E. coli* e *enterococcus* em amostras de hambúrguer de frango, comercializados em Niterói- RJ. Avaliação da sensibilidade a antimicrobianos das cepas isoladas. **Higiene Alimentar**, v.13, n.63, p.49-54, 1999.

OLSEN, J. E.; BROWN, D. J.; MADSEN, M.; BISGAARD, M. Cross-contamination with *Salmonella* on a broiler slaughterhouse line demonstrated by use of epidemiological markers. **Journal of Applied Microbiology**, 94(5), 826-835, 2003.

ORWIN, P. M.; LEUNG, D. Y. M.; DONAHUE, H. L.; NOVICK, R. P.; SCHLIEVERT, P. M. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 1, p. 360-366, 2001.

ORWIN, P. M.; FITZGERARD, J. R.; LEUNG, D. Y. M.; GUTIERREZ, J. A.; BOHACH, G. A.; SCHLIEVERT, P. M. Characterization of *Staphylococcus aureus* enterotoxin L. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 5, p. 2916-2919, 2003.

PAGANI, L.; DEL'AMICO, E.; MIGLIAVACCA, R.; D'ANDREA, M. M.; GIACOBONE, E.; ROSSOLINI, G. M. Multiple CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases in nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from a hospital in Northern Italy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41(9), p. 4264-4269, 2003.

PALÚ, A. P.; PYRRO, A. S.; MIGUEL, M. A. L. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e marcadores de agressão da microbiota de frutas e hortaliças servidas em restaurantes do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17. 2000, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2000, p. 4161.

PALUCHA, A. Concurrent outbreaks of extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms of the family *Enterobacteriaceae* in a Warsaw hospital. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 44(4):489-99, Oct, 1999.

PARDI, M. C.; SANTOS, I. F.; SOUZA, E. R.; PARDI, H. S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne**: Riscos microbiológicos da carne, Goiânia: UFG, 1995. v.1, p.294-308.

PAYNE, D. J.; CRAMP, R.; WINSTANLEY, D. J.; KNOWLES, D. J. C. Comparative activities of clavulanic acid, sulbactam, and tazobactam against clinically important β -lactamases. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 38(4): 767-72, 1994.

PEIGHAMBARI, S. M.; VAILLANCOURT, J. P.; WILSON, R. A.; GYLES, C. L. Characteristics of *Escherichia coli* isolates from avian cellulitis. **Avian Diseases**, v.39, p.116-124, 1995.

PELCZAR JR., M.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia: conceitos e aplicações**: Doenças transmitidas por água e alimentos. 2.ed. São Paulo: Makron books, v. 2, p.222-236, 1996.

PELOSO, P. F. D.; LEITE, C. C. F.; TORRES FILHO, H. M. Bactérias Produtoras de Betalactamases de Espectro ampliado (ESBL). Laboratório Richet. Disponível em: www.richet.com.br/microbiologiaclinica.html. Acesso em: 10/06/2007.

PEREIRA, A. S.; CARMO FILHO, J. R.; TOGNIM, SADER, H. S. Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de betalactamase de espectro estendido. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n.4, 2003.

PICCOLO, R. C.; PIMENTEL, E. P.; FÁVERO, L. M.; RIZZO, M. A.; PASCHER, D. M. Surto de salmonelose ocorrido em cantina escolar, no município de São Paulo, em 1991. **Higiene Alimentar**, v.6, n.23, p.28-30, set, 1992.

PIN, C.; MARIN, M. L.; GARCIA, L. L. REINA, J. LLOMPART, I. Comparison of different media for the isolation and enumeration of *Aeromonas* sp in foods. **Journal of Applied Microbiology**, v.18, p.190-192, 1994.

PINTO, J. P. A. N; CASTRO, A. P.; OHASHI, F. H.; AMARAL, G. P. Avaliação microbiológica de produtos embutidos encaminhados ao serviço de orientação à alimentação pública (SOAP) da FMVZ, Unesp, Campus de Botucatu. **Higiene Alimentar**, v.13, n.61, p.69-70, 1999.

PITOUT, J. D. Antimicrobial resistance with focus on beta-lactamase resistance in gram-negative bacilli. **American Journal of Medicine**, v.103, p.51-59, 1997.

POIREL, L. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 44(4):891-7, Apr, 2000.

PORTO, E. & SILVA, E. N. *Staphylococcus aureus* em abatedouro industrial de frangos: origem, disseminação e resistência térmica de cepas isoladas de carcaças. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.47, n.3, p.417-433, 1995.

PUBLIC HEALTH LABORATORY SERVICE (PHLS). Infectious intestinal diseases general outbreaks, England and Wales, by organism, 1992 – 1998. Disponível em: [www.http://www.phls.co.uk/facts/iids-f01.htm](http://www.phls.co.uk/facts/iids-f01.htm). Acesso em: 10 jan. 2007.

QUEVEDO, A. Anuário 2005 – Frango à brasileira. Disponível em: <http://www.aviculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp?id=12036etipo_tabela=negociosecategoria=mercado_interno-> Acesso em: 20 jan. 2007.

RAHAL, J. J. Extended-spectrum β -lactamase: how big is the problem? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 6(8): 2-6, 2000.

RAMOS, P. J. M.; MARÍN, P. A. E.; BUSTOS, G. A.; VELILLA, S. M. Prevalencia de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), en el Hospital San Jerónimo de Montería. **Med UNAB**, v.8, n.1, p. 15-22, mar, 2005.

REIS, E. M. F.; COSTA, R. G.; SOLARI, C. A. Sorovares de *Salmonella* caracterizados no biênio 1992-1993 no departamento de bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.89, n.3, p. 156-61, 1993.

REIS, A. O.; GALES, A. C.; SADER, H. S. Avaliação da acurácia do teste de adição clavulanato em disco para a detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.34: p.85-93, 1998.

REZER, J. S. & CARDONHA, A. M. Avaliação da qualidade microbiológica das carcaças de frango comercializadas em Natal-RN. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, 17, 2000, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2000, p.4.20.

RICE, L. B. Outbreak of ceftazidime resistance caused by extended-spectrum beta-lactamases at a Massachusetts chronic-care facility. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**,. 34(11):2193-2199, nov, 1990.

ROCHA, A. A. Consumo interno de frango volta a aumentar. Disponível em: <http://www.agrolink.com.br/saudeanimal/pg_detalhe_noticia.asp?cod=21937>. Acesso em: 27 jan. 2007.

RODRIGUES, K. R. M. & SALAY, E. Garantia da qualidade sanitária de ovos de galinha *in natura*, em Unidades de Alimentação e Nutrição. **Higiene Alimentar**, v.14, n.73, p.13-19, jun., 2000.

ROSSI JÚNIOR, O. D. **Fontes de contaminação da carne bovina por bactérias do gênero *Aeromonas* e formas de disseminação destes microrganismos nas diferentes fases do fluxograma de abate, comportamento frente a antimicrobianos e capacidade enterotoxigênica das cepas isoladas.** Jaboticabal, 1998, 154p. Tese (Livre docência) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.

RUSSELL, S. M. A rapid method for predicting the potential shelf life of fresh broiler chicken carcasses. **Journal of Food Protection**, v.60, n.2, p.148-152, 1996.

SADER, H. S.; GALES, A. C.; PFALLER, M. A.; MENDES, R. E.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; JONES, R. N.. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the Sentry Antimicrobial Surveillance Program. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 5(4):200-14, 2001.

SADER, H. S. O uso de antimicrobianos promotores de crescimento contribui para a resistência a antibióticos? In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 5., 2004, Santos, SP. **Anais...** Santos, 2004. v.2, p.211-217.

SAKUMA, H., FRANCO, D. G. M., FERNADEZ, H. Occurrence of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in retail raw chicken meat and giblets in São Paulo, Brazil. **Revista de Microbiologia**, v. 23, p. 13-16, 1992.

SALEHA, A. A., MEAD, G. C., IBRAHIM, A. L. *Campylobacter jejuni* in poultry production and processing in relation to public health. **Journal World Poultry Science**, v. 54, p. 49-58, 1998.

SANDERS, W. E. & SANDERS, C. *Enterobacter* spp: Pathogens poised to flourish at the turn of the century. **Clinical Microbioloy Reviews**, 10(2):220-241, 1997.

SANTOS FILHO, L.; SANTOS, I. B.; ASSIS, A. M. L.; XAVIER, D. E. Determinação da produção de metalo β -lactamases em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em João Pessoa, Paraíba. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 38:79-84, 2002.

SANTOS, A. F.; VIZEU, D. M.; DESTRO, M. T. Determinação da dose de radiação gama para reduzir a população de *Salmonella* sp. em carne de frango. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.23, n.2, maio/ago., 2003a.

SANTOS, L. R.; NASCIMENTO, V. P.; OLIVEIRA, S. D.; RODRIGUES, D. P.; REIS, L. M.; RIBEIRO, A. R.; FERNANDES, S. A. Phages types of *Salmonella enteritidis* isolated from clinical and foods and broiler carcasses in southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.45(1):1-4, 2003b.

SCHOFIELD, G. M. Emerging food-borne pathogens and their significance in chilled foods. **Journal of Applied Bacteriology**, v.72, p.267-273, 1992.

SCHORR, H. O futuro da cadeia de produção de frangos de corte (uma visão internacional). In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, 2002, Campinas. **Anais...** Campinas : FACTA – Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas , p.19-30, 2002.

SHAH, A. A.; HASAN, F.; AHMED, S.; HAMEED, A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing

extended-spectrum β lactamases. **Research in Microbiology**, v. 155, p. 409-421, 2004.

SHIOZAWA, K.; KATO, E.; SHIMIZU, A. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from chickens. **Journal of Food Protection**, v. 43, n. 9, p. 683-685, 1980.

SILVA, N. & JUNQUEIRA, V. C. A. **Métodos de análise microbiológica de alimentos**. Campinas:ITAL, 1995. 228p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Varela, 1997. 295p.

SILVA, J. M. L. Principais causas de condenações e perdas a nível de abatedouros e sua importância como método de controle de doenças no frango de corte. In: ENCONTRO EMPRESARIAL DE ATUALIZAÇÃO EM PATOLOGIA AVÍCOLA, 1998, Campinas. **Anais...** Campinas:1998, p.59-69.

SILVA, C. H. P. M. & SALVINO, C. R. Importância do Reconhecimento das Enterobactérias Hospitalares Produtoras de Beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBL) e suas Implicações Terapêuticas. **NewsLab**, (41):104-112, 2000.

SILVA, J.; GATICA, R.; AGUILAR, C.; BECERRA, Z.; GARZA-RAMOS, U.; VELÁZQUEZ, M. Outbreak of infection with extended-spectrum β -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexican hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39(9), p. 3193-3196, 2001.

SILVA, E. N. & DUARTE, A. *Salmonella enteritidis* em aves: Retrospectiva da situação atual. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Campinas, SP. **Anais...** FACTA- Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, p.215-232, 2002.

SILVA, E. N. Efeito das doenças infecciosas na qualidade da carne de frangos. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Campinas, SP. **Anais...** FACTA- Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, p.215-232, 2004.

SILVA, J.C.T. Carne de frango: aumenta a demanda mundial e a produção brasileira acompanha o crescimento. Disponível em: http://www.aviculturai.../dinamica.asp?id=1338etipo_tabela=produtosecategoria=frango_de_corte. Acesso em: 27 out. 2006.

SILVEIRA, N. F.; SILVA, N.; CONTRERAS, C.; MIYAGUSKU, L.; BACCIN, M. L. F.; KOONO, E.; BERAQUET, N. J. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in hamburguers produced in Brasil. **Journal of Food Protection**, v.62, n.11, p.1333-1335, 1999.

SIQUEIRA, R. S. **Manual de microbiologia de alimentos**. Brasília: EMBRAPA, 1995. 159 p.

SIROT, D.; SIROT, J.; LABIA, R.; MORAND, A.; COURVALIN, P. Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 20(3):323-34, Sep, 1987.

SMITH, M. W. Antibiotic-resistant bacteria in animal: the danger to human health. **British Veterinary Journal**, v.130, p.110-119, 1974.

SOJKA, W. J. & CARUAGHAN, R. B. A. *Escherichia coli* infection in poultry. **Research in Veterinary Science**, v.2, p.340-352, 1961.

SOUSA, J. S.; BARRETO, L. C.; FERNANDES, M. V. M.; LEITE, A. B.; BURGHGRAVE, V. S.; RAMOS, J. C. Avaliação da qualidade higiênico-sanitária de frangos comercializados na cidade de Salvador-Bahia. **Higiene Alimentar**, v.21, n.150, p.76-77, abril, 2006.

STURENBURG, E.; SOBOTTKA, I.; LAUFS, R.; MACK, D. Evaluation of a new screen agar plate for detection and presumptive identification of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, 51(1):51-5, jan, 2005.

STÜRMER, T.; ERB, A.; MARRE, R.; BRENNER, H. Prevalence and determinants of colonization with antibiotics-resistant *Escherichia coli* in unselected patients attending general practitioners in Germany. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**, 13:303-308, 2004.

TAUNAY, A. E.; FERNANDES, S. A.; TAVECHIO, A. T. The role of public health laboratory in the problem of salmonellosis in São Paulo State, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.38(2), p.119-129, 1996.

TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. São Paulo: Atheneu, 1993. 816p.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.33, n.3, p.214-17, 2000.

TAVECHIO, A. T. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella enteritidis* in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.38(5), p.315-322, 1996.

TAVECHIO, A. T.; GHILARDI, A. C.; PERESI, J. T.; FUZIHARA, T. O.; YONAMINE, E. K.; JAKABI, M.; FERNANDES, S.A. *Salmonella* serotypes isolated from nonhuman sources in São Paulo, Brazil, from 1996 though 2000. **Journal of Food Protection**, 65(6):1041-1044, 2002.

TENOVER, F. C.; MOHAMMED, M. J.; GORTON, T. S.; DEMBEK, Z. F. Detection and reporting of organisms producing extended-spectrum β -lactamases: survey of laboratories in Connecticut. **Journal of Clinical Microbiology**, 37: 4065-4070, 1999.

TIROLI, I. C. C. & COSTA, C. A. Ocorrência de *Salmonella spp.* em carcaças de frangos recém abatidos em feiras e mercados da cidade de Manaus-AM. **Acta Amazônica**, v.36(2):205-208, 2006.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUN, F.; GOMPertz, O. F.; CANDEIAS, J. A. N. **Microbiologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 586p.

TURTURA, G. C.; MASSA, S.; GHAZVINIZADEH, H. Antibiotic resistance among coliform bacteria isolated from carcasses of commercially slaughtered chickens. **International Journal Food Microbiology**, v.11(3-4), p.351-354, 1990.

TZOUVELEKIS, L. S.; TZELEPI, E.; TASSIOS, P. T.; LEGAKIS, N. J. Sporadic emergence of *Klebsiella pneumoniae* strains resistant to cefepime and ceftazidime in Greek Hospitals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36(1), p. 266-268, 1998.

UBA. União Brasileira de Avicultura. Números da avicultura brasileira 2004. Disponível em: <<http://www.uba.org.br>>. Acesso em: 17 dez. 2006.

VARELA, C.; OLIVER, A.; COQUE, T. M.; BAQUERO, F.; CANTON, R. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in group-1, beta-lactamases-producing isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, 7: 278-282, 2001.

VATOPOULOS, A. C.; PHILIPPON, L. S.; TZOUVELEKIS, Z.; KOMNINOU, N. J. Prevalence of a transferable SHV-5 type β -lactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Greece. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, 26(5): 635-48, 1990.

VIEIRA, C. R. N. & TEIXEIRA, C. G. Condições higiênico-sanitárias de carcaças resfriadas de frango comercializadas em Poços de Caldas-MG. **Higiene Alimentar**, v.11, n.48, p.36-40, 1997.

VIKSVEEN, P. Antibiotics and the development of resistant microorganisms. Can homeopathy be an alternative? **Homeopathy**, n.92, p.99-107, 2003.

WANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D. F. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 3 ed. Washington: American Public Health Association, 1996. 873p.

WATTS, J. L.; SALMON, S. A.; YANCEY, R. J.; NERSESSIAN, B.; KOUNEV, Z. V. Minimum inhibitory concentrations of bacteria isolated from septicemia and airsacculitis in ducks. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.5, p.625-628, 1993.

WINOKUR, P. L.; CANTON, R.; CASELLAS, J. M.; LEGAKIS, N. Russian *Klebsiella pneumoniae* isolates that express extended-spectrum β -lactamase. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 6(2):103-108, 2000.

WITTE, W. Medical consequences of antibiotic in agriculture. **Science**, v.279, p.996-997, 1998.

WOOLEY, R. E; GIBBS, P. S.; BROWN, T. P.; GLISSON, J. R.; STEFFENS, W. L.; MAUER, J. L. Colonization of the chickens trachea by an avirulent avian *Escherichia coli* transformed with plasmid pHK 11. **Avian Diseases**, v.42, p.194-198, 1998

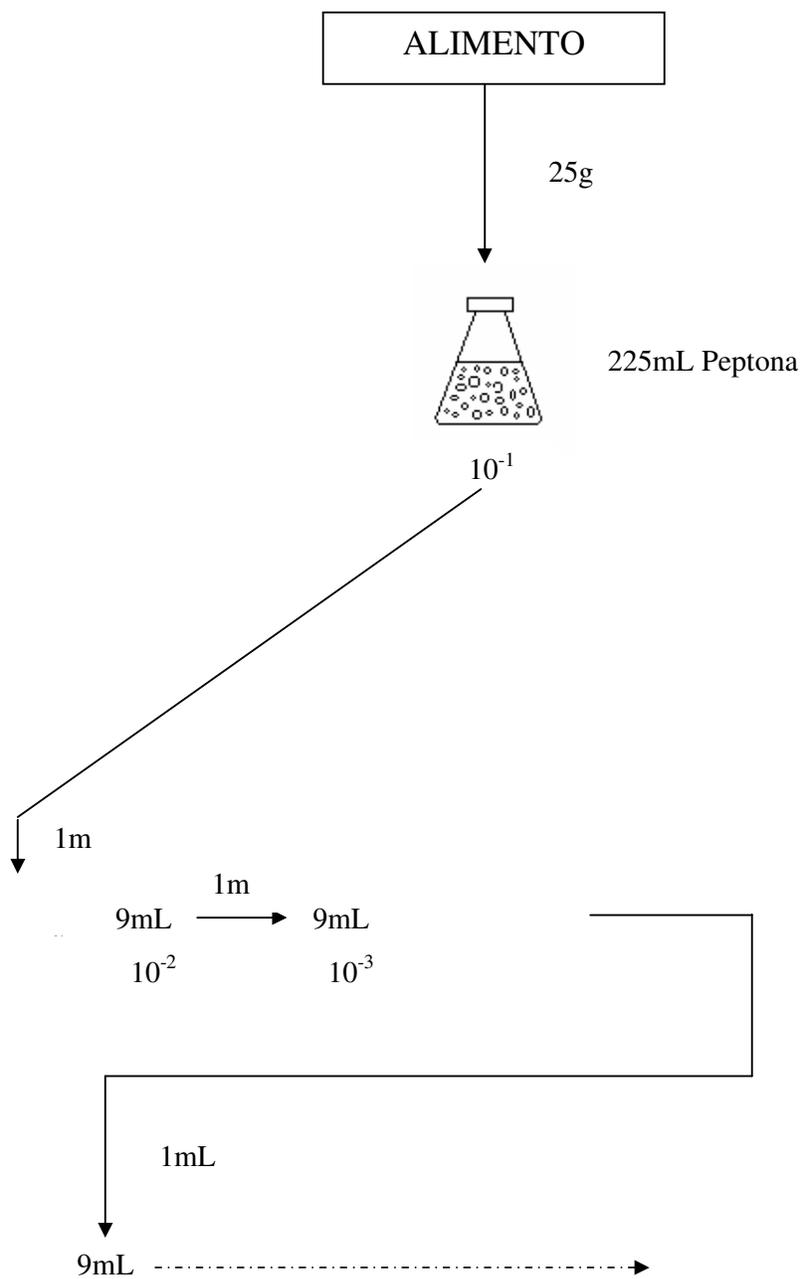
WU, P. J.; SHANNON, K.; PHILLIPS, I. Dissemination of extended-spectrum β -lactamases-producing *Enterobacteriaceae* in pediatric intensive care units. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41(10), p. 4836-4838, 2003.

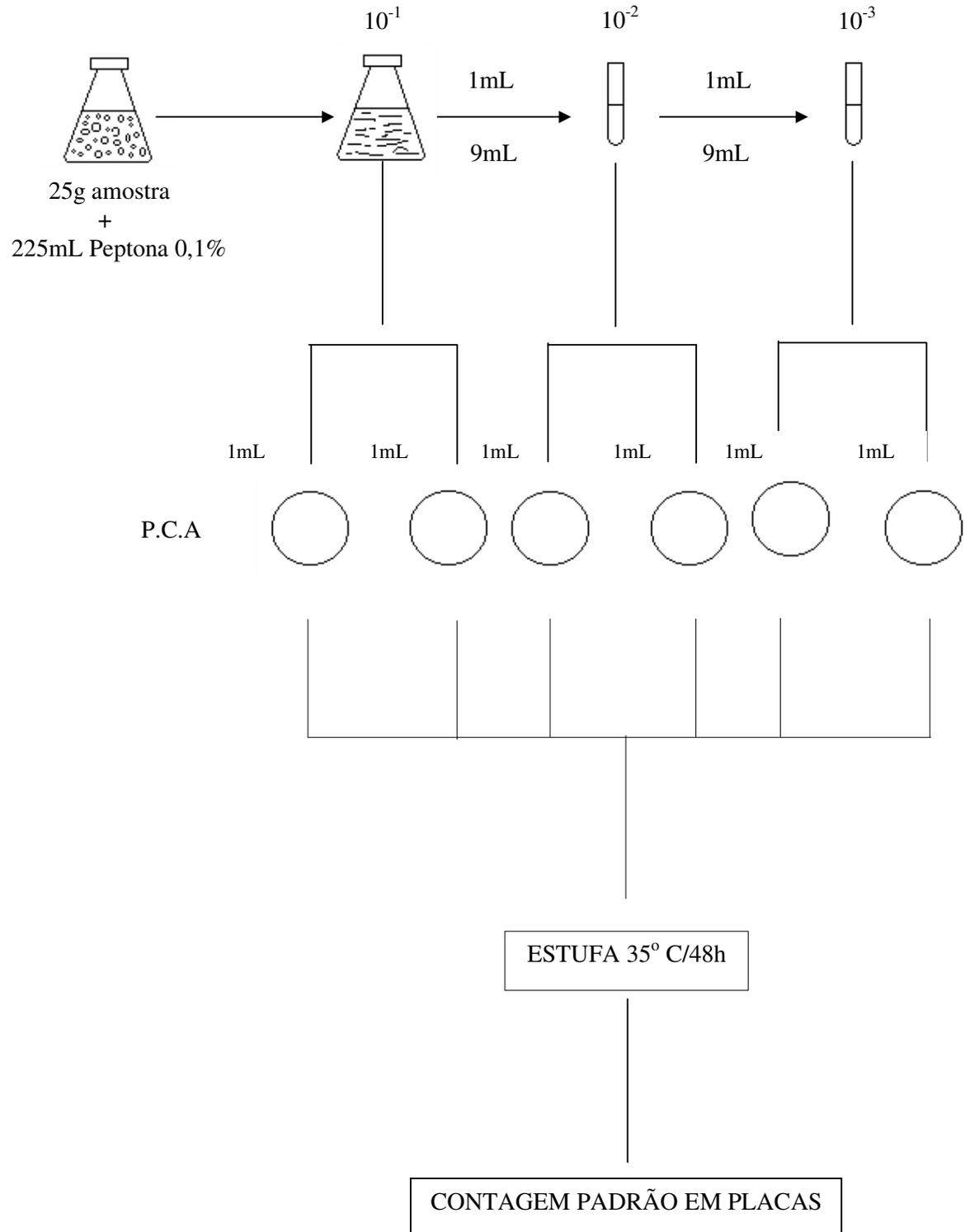
YINNON, A. M.; BUTNARU, A.; RAVEH, D.; JERASSY, Z.; RUDENSKY. *Klebsiella* bacteremia: community versus nosocomial infections. **Quarterly Journal of Medicine**, 89(12): 933-41, 1996.

ZHANEL, G. G.; KARLOWSKY, J. A.; HARDING, G. K.; CARRIE, A.; MAZZULLI, T.; LOW, D. E.; HOBAN, D. J. A Canadian national surveillance study of urinary tract isolates from outpatients: comparison of the activities of trimethoprim-sulfamethoxazole, ampicillin, mecillinam, nitrofurantoin, and ciprofloxacin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 44(4): 1089-1092, 2000.

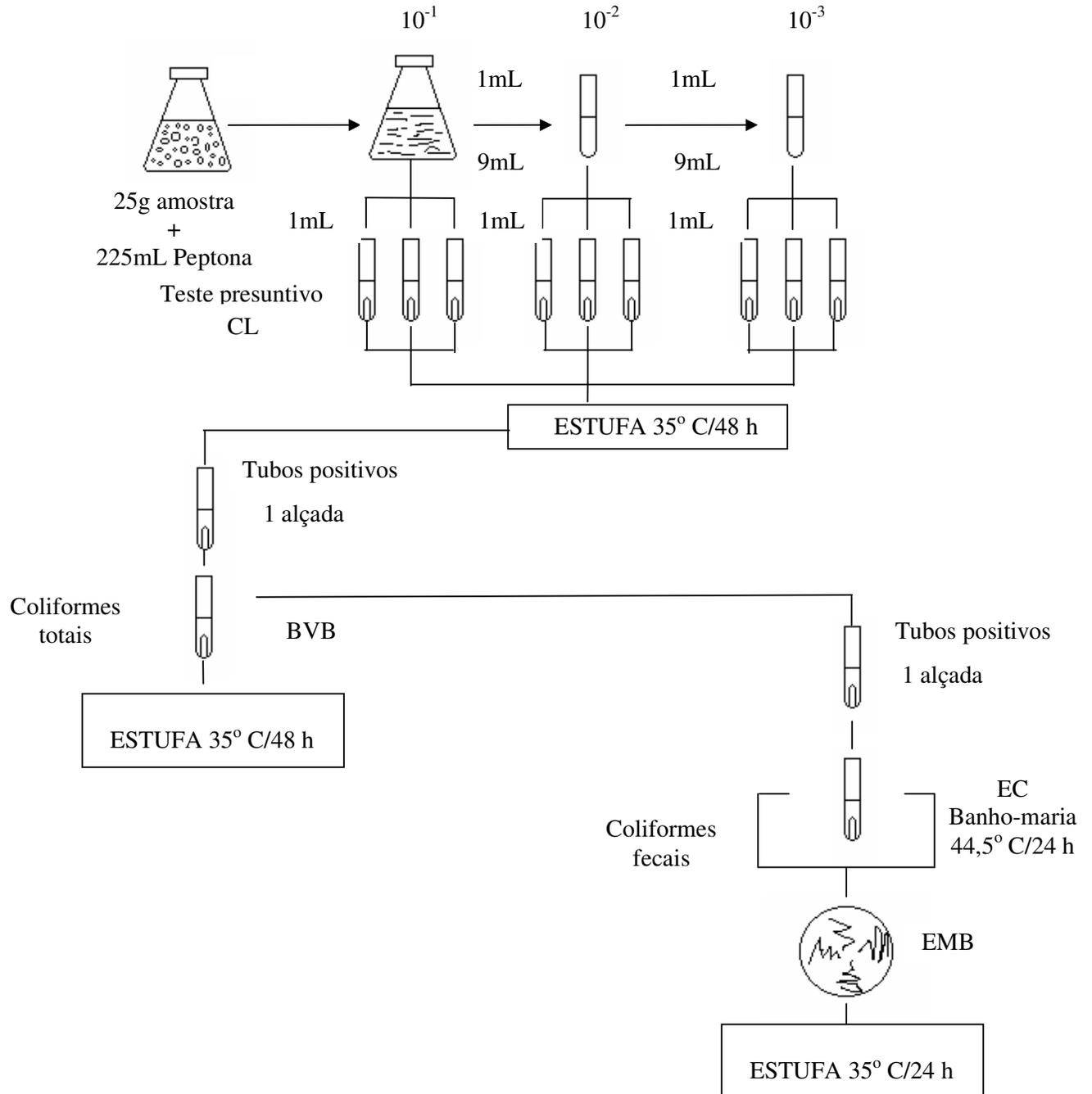
ANEXOS

ANEXO I - Esquema das diluições sucessivas

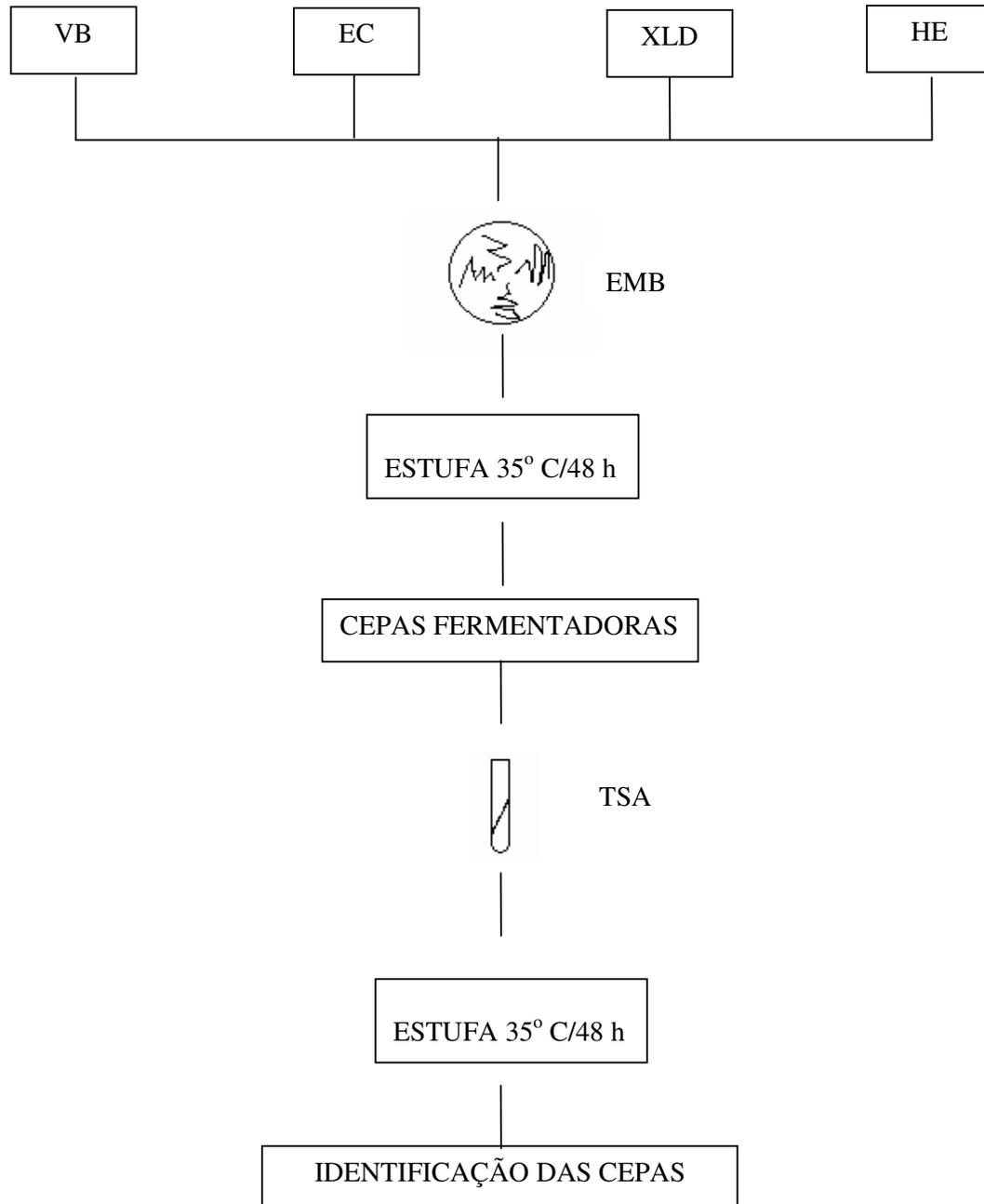


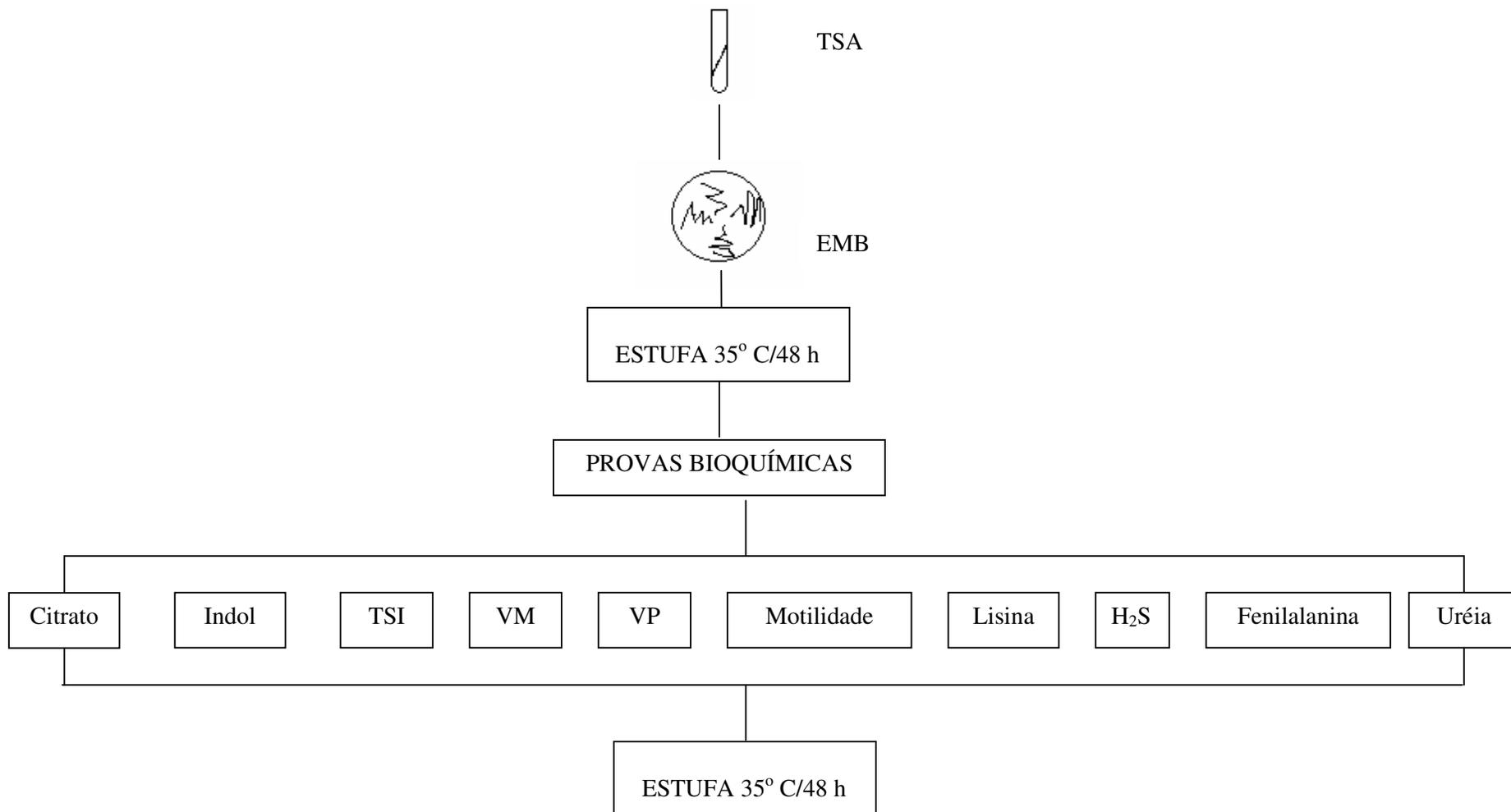
ANEXO II - Esquema da técnica de análise da Contagem Padrão em Placas

ANEXO III - Esquema da técnica do Número Mais Provável (NMP)

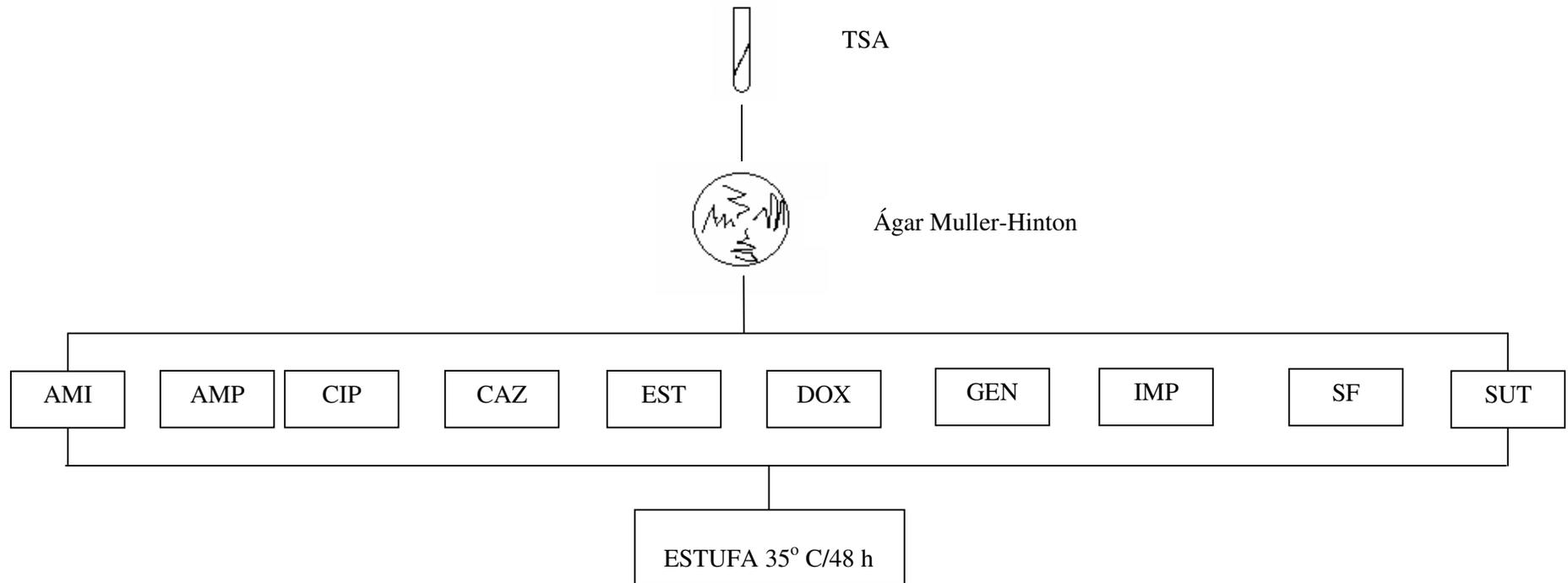


ANEXO IV – Isolamento das cepas oriundas dos tubos positivos de VB, EC, XLD e HE.



ANEXO V – Identificação das cepas estocadas em TSA

ANEXO VI – Testes de sensibilidade à antimicrobianos



AMI – Amicacina (30 µg)	CIP – Ciprofloxacina (05 µg)	EST – Estreptomicina (10 µg)	GEN – Gentamicina (10 µg)	SF – Sulfonamidas (300 µg)
AMP – Ampicilina (10 µg)	CAZ – Ceftazidima (30 µg)	DOX – Doxiciclina (30 µg)	IMP – Imipenem (10 µg)	SUT – Sulfametoxazol/ Trimetoprim (25 µg)

ANEXO VII – Detecção e confirmação de cepas produtoras de ESBL