



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA – FCE/ UNB
CURSO DE FARMÁCIA

RAABE ANDRADE VELOSO

SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS *ESCHERICHIA*
***COLI* ISOLADAS DE CARNES DE FRANGO COMERCIALIZADAS NO DISTRITO**
FEDERAL

BRASÍLIA, DF

2019

RAABE ANDRADE VELOSO

SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE CARNES DE FRANGO COMERCIALIZADAS NO DISTRITO FEDERAL

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Farmácia, na Universidade de Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientador: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi

Co-orientador: Profa. Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva

BRASÍLIA, DF

2019

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

AV443 Andrade Veloso, Raabe
SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS
ESCHERICHIA COLI ISOLADAS DE CARNES DE FRANGO
COMERCIALIZADAS NO DISTRITO FEDERAL / Raabe Andrade Veloso;
orientador Daniela Castilho Orsi; co-orientador Izabel
Cristina Rodrigues da Silva. -- Brasília, 2019.
46 p.

Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de
Brasília, 2019.

1. Carnes de frango. 2. Coliformes termotolerantes. 3.
Escherichia coli. 4. Resistência antimicrobiana. 5. Técnica
de PCR. I. Castilho Orsi, Daniela , orient. II. Rodrigues
da Silva, Izabel Cristina , co-orient. III. Título.

RAABE ANDRADE VELOSO

SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE CARNES DE FRANGO COMERCIALIZADAS NO DISTRITO FEDERAL

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi
(FCE/ Universidade de Brasília)

Msc. Ana Carolina Almeida de Oliveira Ferreira
(FCE/ Universidade de Brasília)

Msc. Sabrina Lunara Santos Pavelquesi
(FCE/ Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, DF

2019

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, eu gostaria de agradecer a Deus. Que me proporcionou a entrada na faculdade, no tempo que foi e da maneira que foi. Que ao longo do curso esteve comigo, me mostrando que Ele estava presente e que bastava eu confiar n'Ele para que todos os desafios fossem vencidos. Fazendo-me viver durante os cinco anos, e durante a realização do TCC, o Salmo 125, versículo 1 "Os que confiam no Senhor serão como o monte de Sião, que não se abala, mas permanece para sempre".

Gostaria de agradecer aos meus pais por terem sido corajosos ao me apoiarem a entrar na faculdade. E por me darem suporte ao longo do curso, proporcionando tudo o que eu precisava para concluí-lo. A minha família por orarem, se preocuparem, se interessarem pelo meu TCC, e se alegrarem com essa conquista.

Quero agradecer de forma especial a minha irmã que, desde que saiu o resultado do vestibular, tirou do seu tempo para me ajudar em todas as dificuldades ao longo do curso. Desde a matrícula na faculdade, as matérias, até o TCC. Não seria possível realizá-lo sem sua ajuda. Obrigada por sempre acreditar em mim e me apoiar.

Gostaria de agradecer a Universidade de Brasília, pelo melhor curso possível oferecido. Por investirem nos estudantes e nos proporcionarem o conhecimento. Por conter o melhor corpo docente, que com todo o seu conhecimento se dispuseram a nos ensinar. A todos os meus professores o meu muito obrigada, por cada aula, por cada tirar de dúvidas, e por realmente quererem nos ver alcançando nossos objetivos.

Em especial, quero agradecer a minha orientadora, a professora Dra. Daniela Castilho Orsi, por primeiramente ter me aceito como sua aluna de pesquisa, por me permitir conhecer esse tema tão incrível. Por toda a ajuda no laboratório, por toda a ajuda com a parte escrita do meu TCC, por todas suas correções e pela disponibilidade de sempre me ajudar e tirar minhas dúvidas. De igual modo, quero agradecer a minha professora co-orientadora, professora Dra. Izabel Cristina Rodrigues da Silva, por todo o auxílio quanto a Identificação Molecular do meu trabalho, tornando-a possível.

Gostaria de agradecer aquelas que passaram cinco anos ao meu lado, me dando forças, me encorajando, me explicando as matérias, revisando antes das provas, fazendo os moodles, os melhores trabalhos e as melhores provas em grupo. Que foram muito mais do que colegas de faculdade, mas amigas durante esses cinco anos. As melhores farmacêuticas da turma 2º/2014: Elisa de Souza Alves, Larissa Ribeiro Gonçalves e Thaís Vieira Marques.

Por fim, mas não menos importante, eu gostaria de agradecer a minha igreja Comunidade Cristã de Discípulos. Por todos os irmãos que perguntaram, se interessaram, e principalmente oraram por mim ao longo desses cinco anos. Desde o momento que passei no vestibular até o realizar do meu TCC. Agradecer de forma especial a minha célula, que sempre esteve vivendo os desafios comigo e orando por cada um deles. A minha líder dos jovens, que todo domingo me perguntou sobre o TCC, e sei que orou por ele, e as minhas amigas Raabe Freitas e Lidiana por orarem e se preocuparem comigo.

Deixo o meu muito obrigado a todos aqueles que estiveram direta ou indiretamente ligados a essa conquista.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi realizar a quantificação de coliformes termotolerantes em amostras de carnes de frango resfriadas comercializadas no Distrito Federal e avaliar a resistência antimicrobiana das bactérias *Escherichia coli* isoladas. As 14 amostras de carnes de frango analisadas neste estudo (diferentes cortes como coxa, coxinha da asa, peito inteiro com osso e pele, filé de peito e sobrecoxa, embalados em bandejas de isopor e expostas ao consumo nos balcões refrigerados) foram coletadas em 5 supermercados do Distrito Federal. Para a determinação do Número Mais Provável de coliformes termotolerantes as amostras foram inoculadas em tubos de ensaio contendo caldo *Escherichia coli* (caldo EC). Do caldo EC foram isoladas as cepas de *E. coli* no meio Agar Mac Conkey. As colônias suspeitas de *E. coli* foram submetidas à identificação molecular através da técnica de PCR e ao teste de susceptibilidade a antimicrobianos. Das 14 amostras de carnes de frango analisadas, 10 amostras (71,4%) apresentaram coliformes termotolerantes, porém a enumeração dessas amostras estava dentro dos limites permitidos pela legislação brasileira (máximo de $1,0 \times 10^4$ NMP/g). Das 10 amostras de carnes de frango que apresentaram enumeração positiva para coliformes termotolerantes, foi possível isolar cepas características de *E. coli* em 7 amostras. As bactérias isoladas foram identificadas através de PCR pela amplificação do gene *MalB*. O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das 17 cepas de *E. coli* isoladas das amostras de carnes de frango mostrou que as cepas apresentaram mais resistência a Sulfonamida (52,9%), a Tetraciclina (35,2%) e a Ciprofloxacina (35,2%). E das 17 cepas de *E. coli* testadas, três cepas (17,5%) classificaram-se como multirresistentes, isto é, cepas resistentes a três classes de antibióticos ou mais. Sendo assim, foi possível concluir que a existência de cepas com resistência antimicrobiana em amostras de carnes de frango comercializadas no Distrito Federal representa um risco ao consumidor, pela possibilidade da transmissão dessa resistência aos seres humanos.

Palavras-chave: carnes de frango; coliformes termotolerantes; *Escherichia coli*; resistência antimicrobiana; técnica de PCR

ABSTRACT

The objective of this work was to quantify thermotolerant coliforms in samples of cooled chicken meat commercialized in the Federal District and to evaluate the antimicrobial resistance of the isolated *Escherichia coli* bacteria. The 14 chicken meat samples analyzed in this study (different cuts such as thigh, wingtip, whole breast with bone and skin, breast fillet and over thigh, packaged in Styrofoam trays and exposed to consumption in refrigerated counters) were collected in 5 supermarkets of the Federal District. For the determination of the most probable number of thermotolerant coliforms the samples were inoculated in test tubes containing *Escherichia coli* broth (EC broth). From the EC broth *E. coli* strains were isolated on MacConkey Agar medium. The *E. coli* suspected colonies were submitted to molecular identification by the PCR technique and the antimicrobial susceptibility test. Of the 14 chicken samples analyzed, 10 samples (71.4%) had thermotolerant coliforms, but the enumeration of these samples was within the limits allowed by Brazilian legislation (maximum of 1.0×10^4 MPN / g). Of the 10 chicken meat samples that showed positive enumeration for thermotolerant coliforms, it was possible to isolate strains characteristic of *E. coli* in 7 samples. Bacteria isolated were identified by PCR amplification of the MalB gene. The antimicrobial susceptibility profile of the 17 *E. coli* strains isolated from the chicken meat samples showed that the strains showed more resistance to Sulfonamide (52.9%), Tetracycline (35.2%) and Ciprofloxacin (35, 2%). And of the 17 strains of *E. coli* tested, three strains (17.5%) were classified as multiresistant, ie strains resistant to three classes of antibiotics or more. Thus, it was possible to conclude that the existence of strains with antimicrobial resistance in samples of cooled chicken meat commercialized in the Federal District represents a risk to the consumer, due to the possibility of transmitting this resistance to humans.

Keywords: chicken meat; thermotolerant coliforms; *Escherichia coli*; antimicrobial resistance; PCR technique

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Características da bactéria <i>Escherichia coli</i>	11
1.2. <i>Escherichia coli</i> na cadeia produtiva do frango de corte	13
1.3. <i>Escherichia coli</i> e resistência aos antimicrobianos	14
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo geral.....	18
2.2. Objetivos específicos	18
3. JUSTIFICATIVA	19
4. ARTIGO	20
RESUMO	20
MATERIAL E MÉTODOS	23
Coleta, preparo das amostras e análises microbiológicas	23
Identificação molecular de <i>Escherichia coli</i>	24
Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das bactérias <i>E. coli</i> isoladas.....	25
RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO	33
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA	38
6. ANEXOS	42
ANEXO 6.1. Antibiograma das bactérias <i>E. coli</i> isoladas das amostras de carnes de frango.....	42
ANEXO 6.2. Normas de submissão para a revista Higiene Alimentar	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência do primer e tamanho do produto amplificados na PCR para identificação do gene <i>MalB</i>	24
Tabela 2. Quantificação de coliformes termotolerantes nas amostras de carnes de frango.....	26
Tabela 3. Identificação molecular das bactérias <i>Escherichia coli</i> isoladas das amostras de carnes de frango.....	27
Tabela 4. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das bactérias <i>E. coli</i> isoladas das amostras de carnes de frango.....	28
Tabela 5. Número de cepas de <i>E. coli</i> isoladas das amostras de carnes de frango com resistência aos antimicrobianos testados.....	31
Tabela 6. Perfis de resistência antimicrobiana das cepas de <i>E. coli</i> isoladas das amostras de carnes de frango.....	32

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 6.1. Antibiograma das bactérias <i>E. coli</i> isoladas das amostras de carnes de frango.....	42
ANEXO 6.2. Normas de submissão para a revista Higiene Alimentar.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

WHO = Organização Mundial da Saúde

OIE = Organização Internacional de Saúde Animal

MAPA = Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

caldo EC = Caldo *Escherichia coli*

EMB = Ágar eosina azul de metileno

CIM = Concentração Inibitória Mínima

NMP = Número mais provável

Técnica de PCR = Técnica de reação em cadeia da polimerase

seg= Segundos

min = Minutos

h = Horas

°C= Grau Celsius

mm= Milímetro

SUL = Sulfonamida

CLO = Cloranfenicol

CTX = Cefotaxima

TET = Tetraciclina

IMP = Imipenem

GEN = Gentamicina

AMC = Amoxicilina Com Ácido Clavulânico

CIP = Ciprofloxacina

CAZ = Ceftazidima.

E. coli = *Escherichia coli*

APEC = cepas de *E. coli* patogênicas para aves

EPEC= Enteropatogênicos

ETEC= Enterotoxigênicos

EIEC= Enteroinvasivos

EHEC= Enterohemorrágicos

EAGGEC= Enteroagregativos

UPEC= Uropatogênicos

MNEC= Meningite neonatal

REDEC= Patogênicos para coelhos

Kg= Quilograma

g= Gramas

p/v= Peso/Volume

μ L= Microlitro

μ g= Micrograma

CLSI= *Clinical and Laboratory Standards Institute*

1. INTRODUÇÃO

1.1. Características da bactéria *Escherichia coli*

O médico e bacteriologista Theodor Von Escherich foi o responsável pela descoberta da bactéria *Escherichia coli*. Na época, esta foi denominada *Bacterium coli commune*, recebendo, em 1958, sua nomenclatura atual, *Escherichia coli*, em sua homenagem (CORREA, 2012). A *E. coli* é uma bactéria pertencente à família *Enterobacteriaceae*. Algumas de suas características são: ser um bastonete gram negativo que não forma esporos, ser anaeróbia facultativa e possuir flagelos peritríquios que possibilitam sua locomoção. No entanto, existem também cepas imóveis (GOMES e MARTINEZ, 2017). *E. coli* cresce em temperaturas entre 8 a 48°C, sendo 39°C a temperatura ótima para o crescimento. A faixa de pH propício para o seu crescimento é de 6,0 a 8,0, podendo também crescer em pH ácido (no máximo 4,3), porém, nesta condição, seu crescimento é mais lento (ALVES, 2012).

O gênero *Escherichia* juntamente com outras enterobactérias forma o grupo dos coliformes. Este grupo é dividido em coliformes totais e coliformes termotolerantes. Coliformes totais é o grupo que abrange todas as enterobactérias que são capazes de fermentar lactose com produção de ácido e gás a 32-37°C, em um intervalo de 24 a 48 horas. Os coliformes totais são utilizados para avaliar as condições de higiene, limpeza e sanitização dos alimentos (OLIVEIRA et al., 2011). Coliformes termotolerantes, por sua vez, são capazes de fermentar a lactose em 24 horas na temperatura de 44,5 a 45,5°C (SANTOS, 2009). *E. coli* é a principal bactéria representante do grupo dos coliformes termotolerantes, sendo considerada um indicador de contaminação fecal na água e nos alimentos. Ela possui um fácil isolamento nos meios de cultura convencionais e apresenta resistência por um período longo fora do trato intestinal do homem e dos animais (SILVA e MENÃO, 2015).

A bactéria *E. coli* pode estar presente em todos os alimentos de origem vegetal ou animal, em especial os que não tenham sido processados. Segundo Alves (2012), principalmente, alimentos crus de origem animal, são contaminados frequentemente com bactérias *E. coli*. Estas também têm sido encontradas em águas e solos que tenham recebido contaminação fecal recente (ROVERI e MUNIZ, 2016).

Devido a essa frequência de contaminação, a *E. coli* é uma bactéria que facilmente entra em contato com seres humanos e animais, sendo considerada uma das principais bactérias que constituem a microbiota intestinal dos mesmos. Acredita-se que a maioria dos sorotipos de *E. coli* sejam desprovidos de fatores de virulência, não apresentando danos ao seu hospedeiro. Entretanto, alguns sorotipos adquiriram, durante seu processo evolutivo, diferentes conjuntos de genes que lhes proporcionaram a capacidade de ocasionarem doenças. Esses são denominados sorotipos de *E. coli* patogênicas (CORREA, 2012).

Essa patogenicidade é manifestada por um mecanismo multifatorial e complexo que envolve vários fatores de virulência. A combinação desses fatores possui um papel decisivo para a patogenicidade da bactéria (CORREA, 2012). Com base nestes fatores de virulência e nos mecanismos de ação e patogenicidade, essas bactérias foram classificadas nos seguintes patótipos: enteropatogênicos (EPEC), enterotoxigênicos (ETEC), enteroinvasivos (EIEC), enterohemorrágicos (EHEC), enteroagregativos (EAGGEC), uropatogênicos (UPEC), meningite neonatal (MNEC), patogênicos para coelhos (REDEC) e patogênicos para aves (APEC) (GOMES e MARTINEZ, 2017).

As bactérias *E. coli* podem ser isoladas em diversos meios de cultivo. Comumente nas análises de alimentos, antes da utilização de meios de cultivo sólidos, identifica-se se há presença da bactéria, em meios líquidos como: caldo lactosado e caldo *E. coli* (EC). A *E. coli* em ágar MacConkey apresenta colônias de cor rosa e em ágar eosina azul de metileno (EMB) produz colônias com brilho metálico. Em ambos os meios, as colônias possuem a característica de serem pequenas e secas, equivalentes à medida de 1 a 3 mm de diâmetro. Alguns dos testes bioquímicos que podem ser realizados são: os testes de indol e reação de vermelho de metila, que são testes positivos para *E. coli* e os testes de Voges Proskauer e a utilização de citrato, que são, por sua vez, negativos para *E. coli*. Podem ser usadas, também, provas como motilidade e lisina, que são positivas para *E. coli* e de oxidase e hidrólise de ureia, que são negativas para *E. coli* (CORREA, 2012).

A *E. coli* tem sido muito estudada devido ao aumento dos seus mecanismos de virulência, ao aumento da sua resistência aos antimicrobianos e por estar relacionada com diversas doenças que tem acometido os homens e animais

(CARDOSO et al., 2015). Devido a esses microrganismos estarem envolvidos com seres humanos por se multiplicarem no seu trato intestinal, tem-se a necessidade de estudar continuamente seus mecanismos de virulência e determinar sua resistência aos antimicrobianos (OLIVEIRA et al., 2011).

1.2 Escherichia coli na cadeia produtiva do frango de corte

Carnes cruas são os alimentos mais comumente implicados em surtos por *E. coli* enteropatogênica, embora qualquer alimento exposto à contaminação fecal possa oferecer risco à saúde (OLIVEIRA et al., 2011). A contaminação da carne de frango com bactérias *E. coli* geralmente se inicia durante o abate, através do contato da carne com vestígios de fezes e águas contaminadas (MUCHINSKI e DEGENHARDT, 2016). Essa contaminação pode se dar desde a criação, abatedouro e até mesmo no açougue, devido à falta de higiene dos manipuladores e dos equipamentos utilizados (OLIVEIRA e SALVADOR, 2011).

Dessa forma, a contaminação microbiana presente na ave pode ser modificada ou aumentada no abatedouro e durante o processo de manuseio do produto até chegar ao consumidor final (PENTEADO e EMERINO, 2011). E muitas vezes, devido ao fato da carne não sofrer alterações físicas e sensoriais, apesar da elevada contaminação microbiana, esta acaba sendo consumida, podendo representar risco à saúde do consumidor (OLIVEIRA e SALVADOR, 2011).

É importante salientar que a legislação brasileira estabelece limites para a presença de coliformes termotolerantes na carne de frango. Para coliformes a 45°C em carnes resfriadas ou congeladas, "in natura", de aves (carcaças inteiras, fracionadas ou cortes) o limite tolerável para amostra indicativa é de $1,0 \times 10^4$ NMP/g, quando é aplicado um plano de amostragem de duas classes, que separa o produto aceitável do inaceitável (BRASIL, 2001). Para quantificar os coliformes termotolerantes em amostras de alimentos, como a carne de frango, normalmente é utilizada a técnica de Tubos Múltiplos, que determina o NMP (número mais provável) (OLIVEIRA e SALVADOR, 2011).

Na cadeia produtiva do frango de corte, as bactérias *E. coli* patogênicas mais prevalentes são as chamadas APEC (patogênicos para aves). Estas são responsáveis por causar diversas doenças nas aves (ABREU et al., 2010). Dentre elas, a infecção mais conhecida é denominada colibacilose. Esta é causada por *E. coli* extra intestinal e tem acarretado muitas preocupações à avicultura devido aos

grandes prejuízos econômicos que têm sido gerados (GONÇALVES e ANDREATTI FILHO, 2010).

Os principais sintomas clínicos nas aves devido à colibacilose são doenças respiratórias. Outros sintomas inespecíficos apresentados pelas aves são: aumento de mortalidade, sonolência, prostração, diarreia, baixo consumo de ração e perda de peso. As aves mais jovens são mais susceptíveis aos sintomas clínicos mais graves (GOMES e MARTINEZ, 2017).

Para que possam ser reduzidos os riscos de contaminações das aves é necessário que sejam realizados programas de biossegurança. O intuito desses programas é garantir a qualidade do produto final, diminuindo as perdas econômicas para os avicultores, as doenças para as aves e o risco para os seres humanos quanto à contaminação por meio do consumo desses alimentos (OLIVEIRA e SALVADOR, 2011).

1.3 Escherichia coli e resistência aos antimicrobianos

Pelo fato da carne de frango ser uma fonte de proteína com melhor custo benefício, o seu consumo nos últimos anos cresceu consideravelmente. Com isso, intensificou-se a criação dos animais de produção, o que aumentou conseqüentemente as infecções das aves (TESSARI et al., 2008). Com o aumento da contaminação das aves pela APEC e conseqüentemente o aumento da colibacilose aviária, intensificou-se o uso dos antibióticos para tratar as aves (TAVARES, LIMA e BRITO, 2015). Como agravante, além do uso de antibióticos para tratar infecções, iniciou-se o uso profilático do mesmo, para reduzir a mortalidade e para minimizar danos causados por infecções (CARDOSO et al., 2015). Os antibióticos conhecidos como promotores de crescimento também estão sendo usados na alimentação das aves para prevenir patógenos intestinais (FRANCO et al., 2010; TAVARES, LIMA e BRITO, 2015).

O uso indiscriminado dos antimicrobianos, as subdosagens e a adição desses promotores de crescimento, fazem com que as aves permaneçam em contato com pequenas quantidades de medicamento por longos períodos. Em conseqüência disso, ocorre uma seleção de bactérias resistentes a diversos antimicrobianos (GONÇALVES e ANDREATTI FILHO, 2010). Essa resistência se dá em decorrência de alteração genética advinda de mutações cromossômicas ou por aquisição de plasmídeos (FRANCO et al., 2010). Os plasmídeos normalmente são mediadores de

múltipla resistência, permitindo que os microrganismos se tornem resistentes a drogas de diferentes classes. E esse tipo de resistência pode ser transferido entre diferentes gêneros e espécies de bactérias (VAZ, 2009).

A *E. coli* possui predisposição para transferência de genes de resistência devido à quantidade de suas cepas e a capacidade de sobrevivência dentro e fora do trato gastrointestinal dos homens e dos animais (GOMES e MARTINEZ, 2017). A resistência pode resultar em um aumento na virulência das cepas em decorrência da aquisição de novos genes (GONÇALVES e ANDREATTI FILHO, 2010), o que torna os animais portadores dessas bactérias resistentes um problema e preocupação de saúde pública (GOMES e MARTINEZ, 2017). Vários estudos como o de Cardoso et al. (2015); Tavares, Lima e Brito (2015); Franco et al. (2010) e Gomes e Martinez (2017) apresentaram a possibilidade da transferência de fatores de resistência entre bactérias. Segundo tais autores a capacidade de transferência de genes de resistência entre bactérias vai além das bactérias presentes nas aves, podendo também ser transferida através dos alimentos contaminados para a microbiota dos seres humanos.

Essa possível transferência de genes de resistência dos antimicrobianos presentes nos animais para seres humanos por meio dos alimentos, tem se tornado uma preocupação internacional. Grandes organizações tais como Organização Mundial da Saúde (WHO) e Organização Internacional de Saúde Animal (OIE) têm se mobilizado e se preocupado com as consequências desse fato, como o aumento da dificuldade no tratamento de infecções humanas (TAVARES, LIMA e BRITO, 2015). A possibilidade de haver uma resistência aos antimicrobianos transferível por meio dos alimentos, fez com que a União Europeia proibisse o uso de antibióticos nas rações dos animais. No Brasil, baseado nas recomendações das organizações internacionais de referência para ao uso racional de antimicrobianos em animais, o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), proibiu o uso de diversos antimicrobianos com finalidade de aditivo melhorador de desempenho. Desta forma, foram proibidas no Brasil, desde 1998 até 2016, as classes e/ou substâncias antimicrobianas: avoparcina (1998); cloranfenicol e nitrofuranos (2003); anfenicóis, tetraciclina, b-lactâmicos (penicilinas e cefalosporinas), quinolonas e sulfonamidas sistêmicas (2009); eritromicina e espiramicina (2012) e, mais recentemente, a colistina (2016) (BRASIL, 2017).

O grande número de cepas de *E. coli* resistentes aos antimicrobianos e o fato de alguns genes de resistência serem transmitidos para outras bactérias, aumentam a necessidade de conhecer o perfil de resistência das cepas de *E. coli* que pode ser realizado através de antibiograma (TAVARES, LIMA e BRITO, 2015; CARDOSO et al., 2015). Esta é uma técnica destinada à determinação da sensibilidade bacteriana *in vitro* frente a agentes antimicrobianos, também conhecida por Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos. O seu princípio básico é a difusão do antimicrobiano na superfície do ágar, a partir de um disco impregnado com o mesmo antimicrobiano. A difusão do antimicrobiano leva à formação de um halo de inibição do crescimento bacteriano. Quando os halos de inibição são correlacionados aos valores logarítmicos da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pela análise de regressão linear, encontra-se uma relação linear consistente demonstrando que o halo de inibição é inversamente proporcional à CIM daquele antimicrobiano. Para fins de simplificação, foi introduzido um esquema padronizado de avaliação baseado em limiar, no qual a amostra é classificada em "susceptível", "intermediário" ou "resistente", dependendo do valor da CIM (BRASIL, 2008).

No estudo de Abreu et al. (2010), na tipificação de 20 cepas de *E. coli* patogênicas para aves (APEC) isoladas de codornas de corte sob inspeção sanitária, foi realizado o perfil de resistência a agentes antimicrobianos das cepas isoladas e posterior detecção, por reação em cadeia da polimerase (PCR), do gene *iss*. As cepas APEC podem apresentar aumento de resistência aos efeitos líticos do soro (increased serum survival - *iss*), sendo esta característica determinada pelo gene plasmidial *iss*. O gene *iss* pode ser considerado como marcador de virulência de cepas APEC pois, comparado a outros fatores de virulência, o gene *iss* é citado como o mais prevalente em cepas oriundas de aves doentes. A detecção do gene *iss* ocorreu em 55% (11/20) dos isolados. A maioria dos isolados foi resistente à Tetraciclina (16/20) seguida pela Cefotaxima (13/20) e Ácido Nalidíxico (12/20). Segundo os autores a presença do gene *iss* e a resistência a múltiplos antimicrobianos dos isolados obtidos pode indicar um possível potencial patogênico das cepas de *E. coli* tanto para codornas quanto para outros tipos de aves e animais e mesmo para o ser humano que fique em contato com as mesmas.

Na literatura, vários estudos foram realizados sobre o perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *E. coli* isoladas de frango (CARDOSO et al., 2015;

CARVALHO et al., 2015; GONÇALVES e ANDREATTI FILHO, 2010; TAVARES, LIMA e BRITO, 2015). Em todos esses trabalhos, foram encontradas cepas com resistência aos antimicrobianos testados. Gonçalves e Andreatti Filho (2010) isolaram 27 amostras de *E. coli* oriundas de aves com suspeita de colibacilose e encontraram maior taxa de resistência para os antimicrobianos a Sulfonamida (59,2%) e a Tetraciclina (44,4%). No trabalho de Cardoso et al. (2015) foram isoladas 60 cepas de *E. coli* de aves comerciais com quadros de colibacilose e notou-se maior taxa de resistência contra amoxicilina (96,7%) e tetraciclina (71,7%). E no estudo de Carvalho et al. (2015) foi avaliado o perfil de resistência antimicrobiana de 109 cepas de *E. coli* isoladas do ambiente de manipulação da carne de frango (as amostras foram coletadas através de swabs esfregados nos locais de comercialização da carne de frango) e os maiores percentuais de resistência foram encontrados para os antimicrobianos ácido nalidíxico e tetraciclina (>75%).

Segundo Mohamed et al. (2014), visto que a *E. coli* pode ser considerada um reservatório de genes de resistência e que há a possibilidade destes genes serem transferidos para outras bactérias, inclusive humanas, existe a necessidade de uma vigilância sanitária mais rigorosa na produção avícola. Vigilância esta que inclua uma regulamentação mais rígida sobre uso de antimicrobianos na prática veterinária e melhores práticas de produção avícola, levando dessa forma a uma redução da contaminação dos produtos avícolas com bactérias resistentes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi realizar a quantificação de coliformes termotolerantes em amostras de carnes de frango resfriadas comercializadas no Distrito Federal e avaliar a resistência antimicrobiana das bactérias *Escherichia coli* isoladas.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar genotipagem através da técnica de PCR para confirmação da espécie *E. coli*.
- Realizar teste de susceptibilidade antimicrobiana utilizando o método de difusão com disco.

3. JUSTIFICATIVA

O consumo, no Brasil, de carne de frango tem aumentado nas últimas décadas em função do seu alto valor nutritivo e de seu custo acessível, quando comparado a outras carnes. Com o consumo de carne de frango aumentando, cresce também a preocupação com a qualidade dessa carne. Alguns microrganismos como *Escherichia coli* podem ser veiculados por este alimento e causam preocupação pelo potencial de causar doenças transmitidas por alimentos. Dessa forma, estudos da qualidade microbiológica e da incidência de microrganismos potencialmente patogênicos têm importância para a saúde pública e permitem determinar se a carne de frango resfriada e exposta ao consumo na cidade de Brasília e região apresenta segurança alimentar.

4. ARTIGO ELABORADO CONFORME AS NORMAS DE SUBMISSÃO DA REVISTA HIGIENE ALIMENTAR

SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS DE BACTÉRIAS *ESCHERICHIA COLI* ISOLADAS DE CARNES DE FRANGO COMERCIALIZADAS NO DISTRITO FEDERAL

Raabe Andrade Veloso, Daniela Castilho Orsi, Izabel Cristina Rodrigues da Silva

Universidade de Brasília (UNB/FCE), Faculdade de Farmácia, Laboratório de Controle de Qualidade, Ceilândia, Brasília - DF, Brasil.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi realizar a quantificação de coliformes termotolerantes em amostras de carnes de frango resfriadas comercializadas no Distrito Federal e avaliar a resistência antimicrobiana das bactérias *Escherichia coli* isoladas. As 14 amostras de carnes de frango analisadas neste estudo (diferentes cortes como coxa, coxinha da asa, peito inteiro com osso e pele, filé de peito e sobrecoxa, embalados em bandejas de isopor e expostas ao consumo nos balcões refrigerados) foram coletadas em 5 supermercados do Distrito Federal. Para a determinação do Número Mais Provável de coliformes termotolerantes as amostras foram inoculadas em tubos de ensaio contendo caldo *Escherichia coli* (caldo EC). Do caldo EC foram isoladas as cepas de *E. coli* no meio Agar Mac Conkey. As colônias suspeitas de *E. coli* foram submetidas à identificação molecular através da técnica de PCR e ao teste de susceptibilidade a antimicrobianos. Das 14 amostras de carnes de frango analisadas, 10 amostras (71,4%) apresentaram coliformes termotolerantes, porém a enumeração dessas amostras estava dentro dos limites permitidos pela legislação brasileira (máximo de $1,0 \times 10^4$ NMP/g). Das 10 amostras de carnes de frango que apresentaram enumeração positiva para coliformes termotolerantes, foi possível isolar cepas características de *E. coli* em 7 amostras. As bactérias isoladas foram identificadas através de PCR pela amplificação do gene *MalB*. O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das 17 cepas de *E. coli* isoladas das amostras de carnes de frango mostrou que as cepas apresentaram mais resistência a Sulfonamida (52,9%), a Tetraciclina (35,2%) e a Ciprofloxacina (35,2%). Das 17 cepas de *E. coli* testadas, três cepas (17,5%) classificaram-se como

multirresistentes, isto é, cepas resistentes a três classes de antibióticos ou mais. Sendo possível concluir que, apesar da quantidade de coliformes termotolerantes estar dentro do permitido pela legislação brasileira, a existência de cepas com resistência microbiana representa um risco ao consumidor, pela possibilidade da transmissão dessa resistência aos seres humanos.

Palavras-chave: carne de frango; coliformes termotolerantes; *Escherichia coli*; resistência antimicrobiana; técnica de PCR.

ABSTRACT

The objective of this work was to quantify thermotolerant coliforms in samples of cooled chicken meat commercialized in the Federal District and to evaluate the antimicrobial resistance of the isolated *Escherichia coli* bacteria. The 14 chicken meat samples analyzed in this study (different cuts such as thigh, wingtip, whole breast with bone and skin, breast fillet and over thigh, packaged in Styrofoam trays and exposed to consumption in refrigerated counters) were collected in 5 supermarkets of the Federal District. For the determination of the most probable number of thermotolerant coliforms the samples were inoculated in test tubes containing *Escherichia coli* broth (EC broth). From the EC broth *E. coli* strains were isolated on MacConkey Agar medium. The *E. coli* suspected colonies were submitted to molecular identification by the PCR technique and the antimicrobial susceptibility test. Of the 14 chicken samples analyzed, 10 samples (71.4%) had thermotolerant coliforms, but the enumeration of these samples was within the limits allowed by Brazilian legislation (maximum of 1.0×10^4 NMP / g). Of the 10 chicken meat samples that showed positive enumeration for thermotolerant coliforms, it was possible to isolate strains characteristic of *E. coli* in 7 samples. Bacteria isolated were identified by PCR amplification of the *MalB* gene. The antimicrobial susceptibility profile of the 17 *E. coli* strains isolated from the chicken meat samples showed that the strains showed more resistance to Sulfonamide (52.9%), Tetracycline (35.2%) and Ciprofloxacin (35, 2%). And of the 17 strains of *E. coli* tested, three strains (17.5%) were classified as multiresistant, that is strains resistant to three classes of antibiotics or more. Thus, is possible to conclude that, although the amount of thermotolerant coliforms is within the limits allowed by the Brazilian legislation, the

presence of strains with microbial resistance represents a risk to the consumer, due to the possibility of transmitting this resistance to humans.

Keywords: chicken meat; thermotolerant coliforms; *Escherichia coli*; antimicrobial resistance; PCR technique.

INTRODUÇÃO

No Brasil, a produção de frangos para abate em 2016 foi de aproximadamente 13,0 milhões de toneladas e o consumo de carne de frango per capita foi de 40 Kg/habitante. Esse crescimento da avicultura brasileira pode ser explicado pelo fato de o Brasil estar entre os primeiros maiores produtores e o principal exportador mundial de carne de frango (ABPA, 2017). O crescente aumento da produção avícola tem despertado a conscientização e o interesse popular sobre os riscos de contaminação da carne de frango com microrganismos patogênicos (BRASIL, 2012).

A carne de frango é uma excelente fonte de proteínas, vitaminas do complexo B e minerais e, devido a suas características intrínsecas, como elevada atividade de água e pH próximo da neutralidade, torna-se um excelente meio para desenvolvimento de microrganismos (MOURA FILHO et al., 2010). Segundo o ICMSF (2005), microrganismos potencialmente patogênicos como a *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* podem estar presentes na carne de frango.

A presença das bactérias do grupo dos coliformes termotolerantes, cujo habitat da maioria é o trato intestinal do ser humano e de outros animais homeotermos, indica contaminação de origem fecal do alimento. A detecção de elevado número de bactérias dos coliformes termotolerantes é interpretada como indicativo da presença de patógenos intestinais, visto que a população deste grupo é constituída de alta proporção de *E. coli* (GERMANO e GERMANO, 2008).

E. coli é uma bactéria residente comum do trato intestinal das aves, sendo que alguns sorotipos provocam diferentes processos infecciosos, os quais são coletivamente denominados colibacilose aviária. A infecção por *E. coli* (colibacilose) é uma das principais doenças da avicultura industrial moderna e, dessa forma, causa grandes prejuízos econômicos no mundo inteiro (ABREU et al., 2010; CARVALHO et al.; 2015; GONÇALVES e ANDREATTI FILHO, 2010).

Devido à elevada prevalência da colibacilose aviária, a terapêutica com antibióticos tem sido abusivamente adotada para o controle dessas bactérias, e consequentemente tem sido registrada a resistência de microrganismos como *E. coli* a vários princípios antimicrobianos (ABREU et al., 2010; CARVALHO et al.; 2015; GONÇALVES e ANDREATTI FILHO, 2010).

A emergência de patógenos possuidores de genes de resistência a antibióticos tem sido uma das principais preocupações em saúde pública, tornando-se um sério problema do ponto de vista clínico (WHO, 2012). A possível transmissão de genes de resistência de bactérias resistentes a antimicrobianos em animais para seres humanos, através do consumo de alimentos, é um assunto de relevância internacional. Uma das principais preocupações é a disseminação dos fenótipos multirresistentes de patógenos, dificultando as opções de tratamento de infecções tanto em humanos como em animais (ABREU et al., 2010; CARVALHO et al.; 2015).

Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar a quantificação de coliformes termotolerantes em amostras de carnes de frango resfriadas comercializadas no Distrito Federal e avaliar a resistência antimicrobiana das bactérias *Escherichia coli* isoladas.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta, preparo das amostras e análises microbiológicas

As 14 amostras de carnes de frango analisadas neste estudo (diferentes cortes como coxa, coxinha da asa, peito inteiro com osso e pele, filé de peito e sobrecoxa, embalados em bandejas de isopor e expostas ao consumo nos balcões refrigerados) foram coletadas em 5 supermercados do Distrito Federal. As amostras foram adequadamente acondicionadas e conduzidas ao Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia (UNB/FCE), onde foram imediatamente analisadas.

Para o preparo das amostras, foram pesadas 25 g de cada amostra e diluídas em 225 mL de água peptonada 0,1% (p/v). O material foi homogeneizado, obtendo-se desta forma a primeira diluição (10^{-1}). A partir da primeira diluição obtiveram-se as demais diluições decimais (até 10^{-3}).

Para a determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes termotolerantes as amostras foram analisadas conforme a técnica de tubos

múltiplos, iniciando-se com o teste presuntivo, que consiste na inoculação de cada diluição das amostras em caldo Lactosado. Os tubos foram incubados a 37°C por 24 h. A positividade do teste caracterizou-se pela turvação do caldo com a produção de gás nos tubos de Durham. Alíquotas dos tubos positivos no teste presuntivo foram inoculadas em tubos de ensaio contendo caldo *Escherichia coli* (caldo EC). Os tubos foram incubados em banho-maria a 45°C por 24 h. A positividade do teste caracterizou-se pela turvação do caldo com a produção de gás nos tubos de Durham. Os resultados obtidos foram expressos em NMP/g.

Do caldo EC foram isoladas as cepas de *E. coli* no meio Agar Mac Conkey. As colônias suspeitas de *E. coli* foram submetidas à identificação molecular através da técnica de PCR e ao teste de susceptibilidade a antimicrobianos.

Identificação molecular de *Escherichia coli*

As bactérias isoladas suspeitas de serem *E. coli* foram identificadas através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Para a identificação de *E. coli* foi utilizado o fragmento de 113 pares de base referente ao gene *MalB*. O primer construído para este estudo está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência do primer e tamanho do produto amplificados na PCR para identificação do gene *MalB*

Primer	Sequência 5´- 3´	Produto amplificado	Espécie
<i>MalB</i> foward	TCTATGGGCTGTGACTGCTG		
<i>MalB</i> reverse	GGCATCCCCATGATGTAGTT	113 pb	<i>E. coli</i>

As colônias isoladas suspeitas de serem *E. coli* foram inoculadas, individualmente, em caldo Brain Heart Infusion e incubadas a 37°C por 18 h. A extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo proposto no kit comercial Plasmid DNA purification MACHEREY-NAGEL®. A qualidade e a quantidade de DNA extraído foram determinadas por eletroforese em gel de agarose, em comparação com o padrão de massa molecular DNA/HindIII marcador de 100 pb (JENA®). Após a extração do DNA, a amplificação de fragmentos de genes foi realizada utilizando o termociclador Techne® modelo TC-512. As condições de termo ciclagem foram 50°C

por 2 min., 95°C por 2 min. e 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 seg., seguida de 60°C por 30 seg., para o anelamento dos oligonucleotídeos e 72°C por 30 seg. para a extensão dos fragmentos. Foram utilizados 2,5 µL de tampão (10 mM de Tris e 50 mM de KCl), 0,7 µL de MgCl₂, 1,5 µL de dNTPs (2,5 mM), 0,5 µL de Taq-Polimerase (Cenbiot[®], 5 U/µL), 1,5 µL de oligonucleotídeos forward e reverse (10 µM), completando com água Milli-Q para um volume final de 25 µL por reação, com a amplificação de 10 ng de DNA extraído da amostra bacteriana. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose, contendo brometo de etídio e visualizados sob iluminação ultravioleta. O marcador de massa molecular utilizado foi o 100 pb DNA/HindIII (JENA[®]).

Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das bactérias *E. coli* isoladas

A susceptibilidade das cepas de *E. coli* aos antimicrobianos foi avaliada pela técnica de disco-difusão (método Kirby-Bauer), utilizando protocolo recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013). Os antimicrobianos e as concentrações em microgramas testados foram: Amoxicilina com Ácido Clavulânico (10 µg) (β-lactâmico/Penicilina), Ceftazidima (30 µg) (β-lactâmico/Cefalosporina), Cefotaxima (30 µg) (β-lactâmico/Cefalosporina), Gentamicina (10 µg) (Aminoglicosídeo), Cloranfenicol (30 µg) (Fenicol), Imipenem (10 µg) (β-lactâmico/Carbapenem), Tetraciclina (30 µg) (Tetraciclina), Ciprofloxacina (5 µg) (Quinolona) e Sulfonamida (300 µg) (Sulfonamida) (NEWPROV[®]). As zonas de inibição foram medidas e classificadas como sensível e resistente de acordo com recomendações do CLSI (2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 está apresentada a quantificação de coliformes termotolerantes nas amostras de carnes de frango avaliadas neste estudo. Das 14 amostras de carnes de frango analisadas, 10 amostras (71,4%) apresentaram coliformes termotolerantes, porém a enumeração dessas amostras estava dentro dos limites permitidos tanto pela legislação brasileira (máximo de 1,0 x 10⁴ NMP/g), quanto pela legislação da Nova Zelândia (máximo de 2,0 x 10³ NMP/g).

Tabela 2. Quantificação de coliformes termotolerantes nas amostras de carnes de frango

Amostras de frango	Cortes de carne de frango	Coliformes termotolerantes (NMP/g)
1	Coxinha da asa	$1,3 \times 10^1$
2	Peito	$2,2 \times 10^1$
3	Coxinha da asa	$0,4 \times 10^1$
4	Sobrecoxa	ND
5	Filé de peito	$2,9 \times 10^2$
6	Coxa	$0,4 \times 10^1$
7	Peito	ND
8	Coxinha da asa	$1,1 \times 10^1$
9	Coxa	ND
10	Coxinha da asa	$4,3 \times 10^1$
11	Sobrecoxa	ND
12	Sobrecoxa	$1,1 \times 10^3$
13	Coxa	$3,5 \times 10^1$
14	Coxinha da asa	$1,5 \times 10^2$

ND = não detectado. Limites da legislação brasileira para coliformes termotolerantes = $1,0 \times 10^4$ NMP/g. Limites da legislação da Nova Zelândia para coliformes termotolerantes = $2,0 \times 10^3$ NMP/g.

Outros estudos reportaram resultados similares a este trabalho. No trabalho de Oliveira e Salvador (2011), foram analisadas 10 amostras de carnes de frango (cortes de coxa e sobrecoxa), compradas nos supermercados das cidades de Apucarana e Califórnia, PR e todas as amostras apresentaram coliformes termotolerantes, porém dentro dos limites permitidos pela legislação. No trabalho de Muchinski e Degenhardt (2016), foram analisadas 35 amostras de carnes de frango coletadas em sete estabelecimentos da cidade de Xanxerê, SC e todas as amostras apresentaram coliformes termotolerantes, porém dentro dos limites permitidos pela legislação. Ainda, no estudo de Penteado e Esmerino (2011), foram analisadas 50

amostras de cortes de frangos resfriados (coxa, sobrecoxa, frango a passarinho e asas), comercializadas em cinco pontos de venda no município de Ponta Grossa, PR, essas apresentaram coliformes termotolerantes e estavam dentro dos limites permitidos pela legislação.

Nesse estudo, das 10 amostras de carnes de frango que apresentaram enumeração positiva para coliformes termotolerantes, foi possível isolar cepas características de *E. coli* em 7 amostras. As bactérias isoladas foram identificadas através de PCR pela amplificação do gene *MalB* (Tabela 3).

Tabela 3. Identificação molecular das bactérias *Escherichia coli* isoladas das amostras de carnes de frango

Amostras de frango	Cortes de carne de frango	Gene amplificado na PCR para <i>E. coli</i>
1	Coxinha da asa	<i>MalB</i>
3	Coxinha da asa	<i>MalB</i>
5	Filé de peito	<i>MalB</i>
6	Coxa	<i>MalB</i>
8	Coxinha da asa	<i>MalB</i>
10	Coxinha da asa	<i>MalB</i>
12	Sobrecoxa	<i>MalB</i>

O gene *MalB* é específico para a formação de acetaldeído e amônia a partir de etanolamina. Wang et al. (1997) usaram o gene *MalB* para detecção de *E. coli* em amostras de frutos do mar. Todos os sorotipos de *E. coli* testados tiveram amplificação para o fragmento de DNA correspondente ao gene *MalB* e não foi obtido amplificação de DNA para outras *Enterobacteriaceae* testadas (*Enterobacter* spp., *Samonella* spp. e *Yersinia enterocolitica*).

O perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das 17 cepas de *E. coli* isoladas das amostras de carnes de frango, está apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das bactérias *E. coli* isoladas das amostras de carnes de frango

Antibióticos	S n (%)	I n (%)	R n (%)	HALO S (mm)	HALO I (mm)	HALO R (mm)
Amoxicilina	15 (88,2%)	-	2 (11,7%)	>18	-	< 18
Sulfonamida	8 (47,0%)	0%	9 (52,9%)	>17	12-17	< 12
Gentamicina	14 (82,3%)	2 (11,7%)	1 (5,8%)	>15	12-15	< 12
Tetraciclina	11 (64,7%)	0%	6 (35,2%)	>21	17-21	< 17
Cloranfenicol	15 (88,2%)	1 (5,8%)	1 (5,8%)	>18	12-18	< 12
Ciprofloxacina	8 (47,0%)	3 (17,6%)	6 (35,2%)	>21	15-21	< 15
Imipenem	17 (100%)	0%	0%	>23	19-23	< 19
Ceftazidima	16 (94,1%)	1 (5,8%)	0%	>26	22-26	< 22
Cefotaxima	16 (94,1%)	0%	1 (5,8%)	>21	17-21	< 17

S = sensível; I = intermediário; R = resistente; n = número de cepas; % = porcentagem em relação ao total de 17 cepas.

No presente estudo, as cepas apresentaram mais resistência a Sulfonamida (52,9%), a Tetraciclina (35,2%) e a Ciprofloxacina (35,2%). Os antibióticos aos quais as cepas apresentaram maior sensibilidade, foram: Imipenem (100% de sensibilidade), Cefotaxima (94,1 % de cepas sensíveis), Ceftazidima (94,1 % de cepas sensíveis), Cloranfenicol (88,2 % de cepas sensíveis), Amoxicilina com ácido clavulânico (88,2 % de cepas sensíveis) e Gentamicina (82,3 % de cepas sensíveis).

Resultados similares foram reportados por Gonçalves e Andreatti Filho (2010), onde foram isoladas 27 amostras de *E. coli* oriundas de quadros de colibacilose e as cepas apresentaram mais resistência a Sulfonamida (59,2%) e a Tetraciclina (44,4%). Os antibióticos aos quais as cepas apresentaram maior sensibilidade foram Norfloxacina, Gentamicina, Ampicilina e Cloranfenicol. No estudo de Carvalho et al. (2015) foi avaliado o perfil de resistência antimicrobiana de 109 cepas de *E. coli* isoladas do ambiente de manipulação da carne de frango (as amostras foram coletadas através de swabs esfregados nos locais de comercialização da carne de frango) e os maiores percentuais de resistência foram encontrados para os antimicrobianos ácido nalidíxico e tetraciclina (>75%).

No estudo de Yassin et al. (2017), com 644 cepas de *E. coli* extra intestinais isoladas das amostras de frango, as cepas apresentaram maiores taxas de resistência (>75%) aos antibióticos Tetraciclina, Ácido Nalidíxico, Sulfametoxazol, Ampicilina, Enrofloxacina e Trimetoprim-sulfametoxazol. Os antibióticos aos quais as cepas apresentaram maior sensibilidade foram Ertapenem e Amoxicilina com Ácido Clavulânico. Segundo os autores do estudo, os altos níveis de resistência às Sulfonamidas (78,9%) encontrados não são inesperados, já que as Sulfonamidas têm sido usadas em larga escala e continuamente por mais de 80 anos como agentes antimicrobianos em humanos e animais. Assim a resistência as Sulfonamidas se espalhou extensivamente entre as bactérias.

A resistência dos bacilos gram negativos às Sulfonamidas geralmente vem da aquisição dos genes sul1, sul2 ou sul3. No trabalho de Soufi et al. (2011), 82% das 166 cepas de *E. coli* testadas mostraram resistência à Sulfonamida, sendo que 50% das cepas apresentaram o gene sul1, 48,5% das cepas apresentaram o gene sul2 e 33,8% das cepas apresentaram o gene sul3. A presença de 2 genes sul na mesma cepa foi detectado em 42% das amostras e somente 8,8% das amostras apresentaram os 3 genes sul.

De acordo com Ljubojević et al. (2017), as Tetraciclina têm sido amplamente utilizadas na produção avícola há décadas. No estudo de Álvarez-Fernández et al. (2013), foram analisadas amostras de frango orgânico e de frango convencional de oito pontos de venda na província de León, no noroeste da Espanha e os autores observaram que a resistência à Tetraciclina foi de 40,0% em frangos convencionais e 46,7% em frango orgânico. Segundo os autores, a elevada resistência à Tetraciclina em *E. coli* isolada de carne de frango do sistema orgânico de criação foi inesperada e surpreendente e pode possivelmente ser explicada pelo fato de as Tetraciclina terem sido usadas em granjas na Espanha por um longo período de tempo. Isso pode ter levado a *E. coli* evoluir para se tornar resistente às Tetraciclina, o que contribuiu para a ampla distribuição desta cepas resistentes em animais como reservatório, independentemente do tipo de produção e do uso de antibióticos na criação.

Van et al. (2008) investigaram os genes de resistência à Tetraciclina de cepas de *E. coli* isoladas dos alimentos comumente vendidos nas feiras do Vietnã. Foi reportado que 84,2% dos isolados de *E. coli* foram resistentes a tetraciclina e foi

achado o gene tetA em 71,43% dos isolados, tetB em 28,57% e tetC em 14,29%. Koo and Woo (2011) coletaram 55 cepas de *E. coli* resistentes a tetraciclina de amostras de frango na Coreia. Foi encontrado tetA em 26,4% dos isolados, tetB em 17,4%, tetC em 0,8%, tetD em 0,8% e tetA e tetB juntos em 0,8% dos isolados.

No Brasil, o uso dos antimicrobianos Sulfonamida e Tetraciclina com finalidade de aditivo melhorador de desempenho está proibido (BRASIL, 2017). No entanto, de acordo com Gonçalves e Andreatti Filho (2010), o uso abusivo desses antimicrobianos como promotores de crescimento ou como conservantes de alimentos para animais até 1998 certamente contribuiu para gerar a resistência dos microrganismos a esses antimicrobianos.

Corroborando com o resultado do presente trabalho, Mohamed et al. (2014) encontraram elevada taxa de resistência à Enrofloxacina (antimicrobiano da classe das quinolonas) em amostras de *E. coli* isoladas de frango de corte. No trabalho de Kmet & Kmetova (2010), isolados de *E. coli* de frangos de corte saudáveis também apresentaram níveis elevados de resistência a Ácido Nalidíxico (média de 79,3%), a Ciprofloxacina (média de 44%) e a Enrofloxacina (média de 38,7%). A resistência das cepas às Quinolonas como Ácido Nalidíxico, Ciprofloxacina e Enrofloxacina provavelmente se deve ao uso excessivo dessa classe de antibiótico para fins terapêuticos e de prevenção. As Fluoroquinolonas são extremamente importantes para o tratamento de infecções graves por *E. coli* em humanos e uma supervisão contínua é necessária para detectar fenótipos resistentes às Quinolonas emergentes (VAN DER WESTHUIZEN & BRAGG, 2012).

Por outro lado, no estudo de Cardoso et al. (2015), o teste de suscetibilidade a antimicrobianos das 60 cepas de *E. coli* isoladas de aves comerciais (frangos de corte, reprodutoras de postura e pintinhos), mostrou elevada resistência à Amoxicilina (96,7%), à Tetraciclina (71,7%) e à Gentamicina (48,3%). No estudo de Tavares, Lima e Brito (2015), o perfil de resistência antimicrobiana de cepas de *E. coli* isoladas de carne de frango comercializada em mercados públicos maranhenses apresentou 96% de resistência à Gentamicina e 76% de resistência à Amoxicilina.

Os estudos sugerem que o uso das Tetraciclinas, Sulfas, Cefalosporinas e Penicilinas servem como fator de disseminação de *Escherichia coli* resistentes. Isto deve-se, principalmente, pelo uso indiscriminado e prolongado em concentrações subterapêuticas e terapias inadequadas de antimicrobianos (BARROS et al., 2012).

A Tabela 5 apresenta a quantidade de cepas com resistência aos antimicrobianos testados. Das 17 cepas de *E. coli* testadas, seis cepas (35,2%) mostraram-se sensíveis a todos os antimicrobianos testados. Oito cepas (47,0%) apresentaram-se resistentes a um ou dois tipos de antimicrobianos. E três cepas (17,5%) classificaram-se como multirresistentes, isto é, cepas resistentes a três antibióticos ou mais.

Tabela 5. Número de cepas de *E. coli* isoladas das amostras de carnes de frango com resistência aos antimicrobianos testados

Número de cepas	Cepas (%) *	Números de antimicrobianos aos quais as cepas apresentaram resistência
6	35,2%	0
3	17,6%	1
5	29,4%	2
2	11,7%	3
1	5,8%	4
17	100	Total

* % = porcentagem em relação ao total de 17 cepas

No estudo de Gonçalves e Andreatti Filho (2010), das 27 amostras de *E. coli* isoladas de quadros de colibacilose, somente uma amostra mostrou-se sensível a todos os antibióticos testados. Observou-se que sete amostras (25,9%) apresentaram resistência somente a uma droga, 14 amostras (51,6%) apresentaram resistência a duas ou três drogas e cinco amostras (18,5%) apresentaram multirresistência entre seis e oito drogas.

No estudo de Yassin et al. (2017), com 644 cepas de *E. coli* extra intestinais isoladas das amostras de frango, 88,2% (568/644) das amostras isoladas mostraram resistência a pelo menos 3 antimicrobianos. No estudo de Barros (2012) observou-se a existência de perfil de multirresistência em 94,2% das amostras estudadas (cepas de *E. coli* APEC isoladas de frangos de corte e poedeiras comerciais). Segundo os autores, a presença de resistência a diferentes antimicrobianos em linhagens APEC tem preocupado os vários segmentos da avicultura mundial.

A Tabela 6 apresenta os nove perfis de resistência antimicrobiana das cepas de *E. coli* desse estudo, sendo o perfil mais prevalente o que enquadra as cepas resistentes a SUL e a TET (23,5%). No estudo de Gonçalves e Andreatti Filho (2010), das amostras resistentes notou-se que o perfil mais prevalente (44,5%, 12 cepas de 27 amostras testadas) também foi resistência a SUL e a TET.

Tabela 6. Perfis de resistência antimicrobiana das cepas de *E. coli* isoladas das amostras de carnes de frango

Perfis	Resistência Antimicrobiana	Número de antimicrobianos*	Número de cepas (%)**
1	SUL	1	1 (5,8%)
2	CIP	1	2 (11,7%)
3	SUL, CLO	2	1 (5,8%)
4	SUL, TET	2	4 (23,5%)
5	SUL, AMC	2	2 (11,7%)
6	TET, CIP	2	2 (11,7%)
7	SUL, TET, GEN	3	1 (5,8%)
8	SUL, TET, CIP	3	1 (5,8%)
9	SUL, TET, AMC, CIP	4	1 (5,8%)

* Número de antimicrobianos aos quais as cepas apresentaram resistência; Número de cepas (%) ** = número de cepas com perfil de resistência e porcentagem em relação ao total de 17 cepas; AMC = Amoxicilina, SUL = Sulfonamida, TET = Tetraciclina, CLO = Cloranfenicol, CIP = Ciprofloxacina, GEN = Gentamicina.

A principal consequência do uso indiscriminado de antibióticos é a propagação da resistência como resultado da seleção positiva contínua de clones bacterianos resistentes, sejam estes patógenos, bactérias comensais ou ambientais. Resultados obtidos por Diarra et al. (2007) mostraram que até 75% dos antibióticos passam inalterados nas fezes, portanto, seu uso regular em rações para aves aumenta o risco de patógenos resistentes serem excretados pelas aves. Esses patógenos resistentes tornam-se disponíveis no ambiente e podem ser transmitidos para seres humanos via alimentos ou água, bem como pela contaminação ambiental da carne de frango e contato direto com animais (LJUBOJEVIĆ et al., 2016).

CONCLUSÃO

Neste estudo foi realizada a quantificação de coliformes termotolerantes em quatorze amostras de carnes de frango resfriadas comercializadas no Distrito Federal. Dessas amostras, dez (71,4%) apresentaram coliformes termotolerantes e foi possível isolar cepas características de *E. coli* em sete amostras. Essas cepas foram analisadas por genotipagem, através da técnica de PCR, para confirmação da espécie *E. coli*, com amplificação do gene *MalB*.

Também foi avaliado o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das bactérias *E. coli* isoladas das amostras de carne de frango. Observou-se que as cepas apresentaram maior resistência a Sulfonamida (52,9%), a Tetraciclina (35,2%) e a Ciprofloxacina (35,2%). Sendo que do total de cepas testadas, 17,5% apresentaram perfil de multirresistência. O perfil de resistência mais identificado foi a Sulfonamida e a Tetraciclina (23,5%).

Sendo assim, foi possível concluir que apesar da quantificação de coliformes termotolerantes nas amostras de carnes de frango comercializadas no Distrito Federal estar dentro dos limites permitidos pela legislação brasileira (máximo de $1,0 \times 10^4$ NMP/g), a existência de cepas com resistência antimicrobiana representa um risco ao consumidor, pela possibilidade da transmissão dessa resistência aos seres humanos. Os estudos continuados da incidência de microrganismos potencialmente patogênicos e de sua resistência a antimicrobianos em alimentos como a carne de frango são importantes para monitorar a dispersão de resistência antimicrobiana e tentar garantir a segurança alimentar do consumidor.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO

ABPA. 2017. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório anual 2017. Disponível em: http://abpa-br.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzido.pdf

ABREU, D. L. C. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana e detecção do gene ISS pela reação em cadeia da polimerase na tipificação de *Escherichia coli* patogênica em codornas de corte sob inspeção sanitária. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 5, p. 406-410, 2010.

ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, E., CANCELO, A., DÍAZ-VEGA, C., CAPITA, R. and ALONSO-CALLEJA, C. Antimicrobial resistance in *E. coli* isolates from conventionally and organically reared poultry: A comparison of agar disc diffusion and Sensi Test Gram-negative methods. **Food Control**, v. 30, n. 1, p. 227-234, 2013.

BARROS, M. R.; SILVEIRA, W. D.; ARAUJO, J. M.; COSTA, E. P. Resistência antimicrobiana e perfil plasmidial de *Escherichia coli* isolada de frangos de corte e poedeiras comerciais no Estado de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 5, p. 405-410, 2012.

BRASIL, MAPA, Lista de substâncias proibidas e legislação correspondente (Atualizado em 02/10/2017). Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/arquivos-de-insumos-pecuarios/Substanciasproibidas.pdf>

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Relatório do monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil**, Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango. Brasília, 2012.171 p.

CARDOSO, A. L. S. P. et al. Avaliação do perfil de resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isolada de aves comerciais. **Revista Nutritime**, Viçosa, v. 12, n. 5, p.4216-4222, 2015.

CARVALHO, D. et al. Antimicrobial susceptibility and pathogenicity of *Escherichia coli* strains of environmental origin. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 7, p. 1249-1255, 2015.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-third informational supplement.** CLSI M100-S23, Wayne.

DIARRA, M.S., SILVERSIDES, F.G., DIARRASSOUBA, F., PRITCHARD, J., MASSON, L., BROUSSEAU, R., BONNET, C., DELAQUIS, P., BACH, S., SKURA, B.J. and TOPP, E. Impact of feed supplementation with antimicrobial agents on growth performance of broiler chickens, *Clostridium perfringens* and *Enterococcus* counts, and antibiotic resistance phenotypes and distribution of antimicrobial resistance determinants in *Escherichia coli* isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 20, p. 6566-6576, 2007.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, P. M. L. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos.** 3. ed. São Paulo: Manole, 2008. 986 p.

GONÇALVES, G. A. M.; ANDREATTI FILHO, R.L. Susceptibilidade antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de frango industrial (*Gallus gallus Domesticus Linnaeus, 1758*) com colibacilose. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.4, p.715-718, 2010.

ICMSF. 2005. **Microorganisms in foods 6: microbial ecology of food commodities**, 2 ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2005.

KMET V.; KMETOVA M. High levels of quinolone resistance in *Escherichia coli* from healthy chicken broilers. **Folia Microbiology**, v. 55, p. 79-82, 2010.

KOO, H.J. and WOO, G.J. Distribution and transferability of tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 2, p. 407-41, 2011.

LJUBOJEVIĆ, D., PELIĆ, M., PUVAČA, N., MILANOV, D. Resistance to tetracycline in *Escherichia coli* isolates from poultry meat: epidemiology, policy and perspective. **World's Poultry Science Journal**, v. 73, p. 409-417, 2017.

LJUBOJEVIĆ, D., PUVAČA, N., PELIĆ, M., TODOROVIĆ, D., PAJIĆ, M., MILANOV, and VELHNER, M. Epidemiological significance of poultry litter for spreading the antibiotic resistant. **World's Poultry Science Journal**, v. 72, n. 03, p. 485-494, 2016.

MOHAMED, M. A.; SHEHATA, M. A.; RAFEEK, E. Virulence genes content and antimicrobial resistance in *Escherichia* coliform broiler chickens. **Veterinary Medicine International**, p.1-6, 2014.

MOURA FILHO, L.G.M.; BEZERRA, S.S.; BARROS, G.C.; MELO, H.M.G.; MENDES, E.S. Perfil microbiológico da carne de frangos abatidos artesanalmente e na indústria, comercializados na grande Recife-PE, **Medicina Veterinária**, Recife, v.4, n.1, p.12-17, 2010.

MUCHINSKI, M.; DEGENHARDT, R. Qualidade microbiológica de carne de frango temperada comercializada em açougues. **Jornada Integrada em Biologia**, p. 91-97, 2016.

SOUFI, L. et al. *Escherichia coli* of poultry food origin as reservoir of sulphonamide resistance genes and integrons. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 497–502, 2011.

TAVARES, G. S.; LIMA, R. M. S.; BRITO, D. A. P. Perfil de resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isolada da carne de frango comercializada em mercados públicos maranhenses. 2015, Lavras. **Anais...** Lavras: III Congresso Mineiro de Engenharia de Alimentos, 2015.

VAN, T.T.H., CHIN, J., CHAPMAN, T., TRAN, L.T. and COLOE, P.J. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, n. 3, p. 217-223, 2008.

WANG, R. F.; CAO, W. W.; CERNIGLIA, C. E. A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, n. 6, p. 727-736, 1997.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. The evolving threat of antimicrobial resistance Options for action. 2012. 119p. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241503181_eng.pdf.

YASSIN, A. K. et al. Antimicrobial resistance in clinical *Escherichia coli* isolates from poultry and livestock, China, **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p.e0185326

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA REVISÃO DE LITERATURA

ABPA. 2017. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório anual 2017. Disponível em: http://abpa-br.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzido.pdf

ABREU, D. L. C. et al. Perfil de sensibilidade antimicrobiana e detecção do gene ISS pela reação em cadeia da polimerase na tipificação de *Escherichia coli* patogênica em codornas de corte sob inspeção sanitária. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 30, n. 5, p. 406-410, 2010.

ALVES, A. R. **Doenças alimentares de origem bacteriana**. 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Faculdade Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012.

BRASIL, MAPA, Lista de substâncias proibidas e legislação correspondente (Atualizado em 02/10/2017). Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/arquivos-de-insumos-pecuarios/Substanciasproibidas.pdf>

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Relatório do monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil**, Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango. Brasília, 2012. 171 p.

BRASIL. Interpretação de dados microbiológicos. **Agencia Nacional de Vigilância Sanitária**. 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo2/metodos5.htm

BRASIL. Resolução RDC n. 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.

CARDOSO, A. L. S. P. et al. Avaliação do perfil de resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isolada de aves comerciais. **Revista Nutritime**, Viçosa, v. 12, n. 5, p.4216-4222, 2015.

CARVALHO, D. et al. Antimicrobial susceptibility and pathogenicity of *Escherichia coli* strains of environmental origin. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 7, p. 1249-1255, 2015.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2013. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-third informational supplement**. CLSI M100-S23, Wayne.

CORREA, F A F. **Características dos patótipos de *E. coli* e implicações de *E. coli* patogênica para aves em achados de abatedouros frigoríficos**. 2012. 37 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência Animal, Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

FRANCO, R. M. et al. Resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas de carne e dejetos suínos. **Acta Veterinária Brasileira**, Recife, v. 4, n. 1, p.31-36, 2010.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, P. M. L. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**.3. ed. São Paulo: Manole, 2008. 986 p.

GOMES, D. S.; MARTINEZ, A. C. **Colibacilose aviária em frangos de corte: revisão de literatura**. 2017, Umuarama. **Anais...** Umuarama: II Simpósio Produção Sustentável e Saúde Animal, 2017.

GONÇALVES, G. A. M.; ANDREATTI FILHO, R.L. Susceptibilidade antimicrobiana de amostras de *Escherichia coli* isoladas de frango industrial (*Gallus gallus Domesticus Linnaeus*, 1758) com colibacilose. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.77, n.4, p.715-718, 2010.

ICMSF. 2005. **Microorganisms in foods 6: microbial ecology of food commodities**, 2 ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, 2005.

MOHAMED, M. A.; SHEHATA, M. A.; RAFEEK, E. Virulence genes content and antimicrobial resistance in *Escherichia* coliform broiler chickens. **Veterinary Medicine International**, p.1-6, 2014.

MOURA FILHO, L.G.M.; BEZERRA, S.S.; BARROS, G.C.; MELO, H.M.G.; MENDES, E.S. Perfil microbiológico da carne de frangos abatidos artesanalmente e na indústria, comercializados na grande Recife-PE, **Medicina Veterinária**, Recife, v.4, n.1, p.12-17, 2010.

MUCHINSKI, M.; DEGENHARDT, R. Qualidade microbiológica de carne de frango temperada comercializada em açougues. **Jornada Integrada em Biologia**, p. 91-97, 2016.

OLIVEIRA, A. V. B. de et al. Padrões microbiológicos da carne de frango de corte – referencial teórico. **Revista Verde**, Mossoró, v. 6, n. 3, p.1-16, 2011.

OLIVEIRA, F. A.; SALVADOR, F. C. Determinação da contaminação microbiológica da carne de frango comercializada na cidade de Apucarana e Califórnia – PR. **Revista F@pciência**, Apucarana, v. 8, n. 15, p.159-171, 2011.

PENTEADO, F. R.; ESMERINO, L. A. Avaliação da qualidade microbiológica da carne de frango comercializada no município de Ponta Grossa - Paraná. **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 17, n. 1, p. 37-45, 2011.

ROVERI, V.; MUNIZ, C. C. Contaminação microbiológica por *Escherichia coli*: estudo, preliminar, no canal de drenagem urbana da av. Lourival Verdeiro do Amaral – São Vicente/SP. **Revista Eletrônica de Divulgação Científica da Faculdade Don Domênico**, Guarujá, p.1-9, 2016.

SANTOS, J. S. **Avaliação da qualidade microbiológica de carnes de rango comercializadas na cidade de Aracaju-SE**. 2009. 41 f. Dissertação (Mestrado) – Curso Gestão da Qualidade Vigilância Sanitária em Alimentos, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Recife, 2009.

SILVA, K. R. C., MENÃO, M.C. Avaliação microbiológica de cortes de frangos comercializados na cidade de São Paulo. **Atas de Saúde Ambiental**, São Paulo, v.3, n.2, p. 17-23, 2015.

TAVARES, G. S.; LIMA, R. M. S.; BRITO, D. A. P. Perfil de resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isolada da carne de frango comercializada em mercados públicos maranhenses. 2015, Lavras. **Anais...** Lavras: III Congresso Mineiro de Engenharia de Alimentos, 2015.

TESSARI, E. N. C. et al. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos industrialmente processadas, procedentes de explorações industriais do Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 9, p.2557-2560, 2008.

VAZ, E.K. Resistência antimicrobiana: como surge e o que representa para a suinocultura. **Acta Scientia Veterinária**, v. 37, n.1, p.147-150, 2009.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. The evolving threat of antimicrobial resistance Options for action. 2012. 119p. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2012/9789241503181_eng.pdf.

6. ANEXOS

ANEXO 6.1. Antibiograma das bactérias *E. coli* isoladas das amostras de carnes de frango

Antibióticos	Cepas isoladas (halo de inibição medido em mm)											
	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10	R11	R12
SUL	SH	SH	SH	30	SH	49	29	29	35	32	18	SH
CLO	30	21	40	31	15	36	43	36	31	35	23	29
CTX	35	28	38	37	15	46	44	45	46	46	36	29
TET	SH	SH	27	32	SH	38	44	25	30	33	29	SH
IMP	32	40	39	35	34	40	37	37	34	35	31	33
GEN	30	SH	23	30	31	27	25	36	23	24	30	12
AMC	SH	20	17	34	19	46	30	29	38	40	29	24
CIP	SH	35	45	SH	SH	31	SH	26	21	36	32	11
CAZ	35	40	35	39	25	36	40	30	33	36	31	29
	R13	R14	R15	R16	R17							
SUL	SH	23	SH	SH	SH							
CLO	31	30	10	32	31							
CTX	34	35	40	39	31							
TET	27	33	34	10	10							
IMP	33	35	33	31	38							
GEN	23	23	21	12	20							
AMC	25	25	40	26	27							
CIP	31	28	21	12	19							
CAZ	33	32	28	29	29							

SH = sem halo de inibição; SUL = sulfonamida, CLO = cloranfenicol, CTX = cefotaxima, TET = tetraciclina, IMP = imipenem, GEN = gentamicina, AMC = amoxicilina com ácido clavulânico, CIP = ciprofloxacina, CAZ = ceftazidima.

ANEXO 6.2. Normas de submissão para a revista Higiene Alimentar

01. As colaborações enviadas à Revista Higiene Alimentar na forma de artigos, pesquisas, comentários, revisões bibliográficas, notícias e informações de interesse para toda a área de alimentos, devem ser elaboradas utilizando *softwares* padrão IBM/PC (textos em *Word nas mais variadas versões do programa*; gráficos em *Winword, Power Point ou Excel*) ou *Page Maker 7*, ilustrações em *Corel Draw* nas mais variadas versões do programa (verificando para que todas as letras sejam convertidas para curvas) ou *Photo Shop*.

02. Os trabalhos devem ser digitados em caixa alta e baixa (letras maiúsculas e minúsculas), evitando títulos e/ou intertítulos totalmente em letras maiúsculas e em negrito. Tipo da fonte *Times New Roman*, ou similar, no tamanho 12.

03. Do trabalho deverão constar as seguintes partes: Título, Resumo, Palavras-chave, *Abstract*, keywords, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusão e Referências Bibliográficas. Os gráficos, tabelas e figuras devem fazer parte do corpo do texto e o tamanho total do trabalho deve ficar entre 6 e 9 laudas (aproximadamente 9 páginas em fonte TNR 12, com espaçamento entre linhas 1,5 e margens superior e esquerda 3 cm, inferior e direita 2 cm).

04. Resultados de pesquisas relacionados a seres humanos deverão ser apresentados acompanhados do número do parecer junto ao Comitê de Ética da instituição de origem ou outro relacionado ao Conselho Nacional de Saúde.

05. Do trabalho devem constar: o nome completo do autor e coautores (respeitando o máximo de quatro), e-mail de todos (será publicado apenas o e-mail do primeiro autor, o qual responde pelo trabalho) e nome completo das instituições às quais pertencem, com três níveis hierárquicos (Universidade, Faculdade, Departamento), também a cidade, estado e país.

06. As referências bibliográficas devem obedecer às normas técnicas da ABNT-NBR-6023 e as citações conforme NBR 10520 sistema autor-data.

07. Para a garantia da qualidade da impressão, são indispensáveis as fotografias e originais das ilustrações a traço. Imagens digitalizadas deverão ser enviadas mantendo a resolução dos arquivos em, no mínimo, 300 pontos por polegada (300 dpi).

08. Será necessário que os colaboradores mantenham seus programas anti-vírus atualizados.

09. Todas as informações são de responsabilidade do primeiro autor com o qual faremos os contatos, através de seu e-mail que será também o canal oficial para correspondência entre autores e leitores.

10. Juntamente com o envio do trabalho deverá ser encaminhada declaração garantindo que o trabalho é inédito e não foi apresentado em outro veículo de comunicação. Na mesma deverá constar que todos os autores estão de acordo com a publicação na Revista.

11. Não será permitida a inclusão ou exclusão de autores e coautores após o envio do trabalho. Após o envio do trabalho, só será permitido realizar mudanças sugeridas pelo Conselho Editorial.

12. Os trabalhos deverão ser encaminhados exclusivamente *on-line*, ao e-mail autores@higienealimentar.com.br.

13. Recebido o trabalho pela Redação, será enviada **declaração de recebimento** ao primeiro autor, no prazo de dez dias úteis; caso isto não ocorra, comunicar-se com a redação através do e-mail autores@higienealimentar.com.br

14. As colaborações técnicas serão devidamente analisadas pelo Corpo Editorial da revista e, se aprovadas, será enviada ao primeiro autor declaração de aceite, via e-mail.

15. As matérias serão publicadas conforme ordem cronológica de chegada à

Redação. Os autores serão comunicados sobre eventuais sugestões e recomendações oferecidas pelos consultores.

16. Para a Redação viabilizar o processo de edição dos trabalhos, o Conselho Editorial solicita, a título de colaboração e como condição vital para manutenção econômica da publicação, que pelo menos um dos autores dos trabalhos enviados seja assinante da Revista. Neste caso, por ocasião da publicação, será cobrada uma taxa de R\$ 50,00 por página diagramada. Não havendo autor assinante, a taxa de publicação será de R\$ 70,00 por página diagramada.

17. Quaisquer dúvidas deverão ser imediatamente comunicadas à Redação através do *e-mail* autores@higienealimentar.com.br