



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

MARIA EDUARDA SANTOS DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE
ESCHERICHIA COLI ISOLADAS DE CARNES DE FRANGO COMERCIALIZADAS
NO DISTRITO FEDERAL**

BRASÍLIA, 2023

MARIA EDUARDA SANTOS DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE
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.

Orientadora: Profa. Dra. Daniela Castilho Orsi

Co-orientadora: Profa. Msc. Letícia Fernandes
Silva Rodrigues

BRASÍLIA, 2023

MARIA EDUARDA SANTOS DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE CEPAS DE
ESCHERICHIA COLI ISOLADAS DE CARNES DE FRANGO COMERCIALIZADAS
NO DISTRITO FEDERAL**

BANCA EXAMINADORA

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

Farmacêutica Especialista Karolina Oliveira Gomes
(FCE/ Universidade de Brasília)

Farmacêutica Especialista Marta Oliveira de Araújo
(FCE/ Universidade de Brasília)

BRASÍLIA, 2023

AGRADECIMENTOS

Me lembro bem do dia em que vi meu nome na lista de aprovados na Universidade de Brasília para o curso de Farmácia e de todas as emoções que invadiram meu ser naquele momento. Foi uma conquista pessoal muito desejada e hoje, ao entregar esse trabalho de conclusão de curso, as emoções também são enormes. Sou muito grata por todas as oportunidades de desenvolvimento pessoal, intelectual e crítico que a UnB me proporcionou durante minha formação acadêmica.

A jornada que se encerra agora não foi fácil de ser percorrida, mas todos os desafios foram superados com auxílio de anjos maravilhosos que Deus, cuidadosamente, colocou em meu caminho.

Aos meus colegas de turma, André Luiz, Ana Júlia e Stéphanie Mayumi, deixo um agradecimento muito especial por terem feito parte dessa jornada ao meu lado. Vocês são amigos incríveis e agora as Gostóxicas são todas farmacêuticas. Quero cultivar vocês sempre comigo.

Aos meus pais, Iolanda e Marcio, minha eterna gratidão por todo apoio e suporte que me deram durante todo esse período. Vocês, mais do que quaisquer pessoas, aguentaram a Maria Eduarda estressada e ansiosa devido as demandas do curso. Não só aguentaram, mas cuidaram e deram todo o amor que tenho nessa vida. Eu amo muito vocês.

Aos meus amigos e familiares, obrigada por serem esse porto seguro onde tenho carinho e apoio. Com vocês por perto me sinto em paz e segura para percorrer todos os propósitos que Deus tem para minha vida.

Por fim, à minha orientadora desse trabalho, professora Daniela Orsi, que me encantou desde que tive o primeiro contato. Deixo a ti minha verdadeira admiração e agradecimento por ter me acolhido nessa etapa final. Profissional impecável e um ser humano doce. Me deu todo auxílio necessário para concluir esse trabalho, sempre disponível e aberta as minhas ideias. Sem dúvidas, fez dessa etapa mais leve. Você é sinônimo de educadora e a prova disso é a equipe maravilhosa que possui em seu laboratório. Te desejo muito sucesso.

Sei que todas essas pessoas maravilhosas foram enviadas por Ti, meu Pai Supremo. Gratidão pelo dom da vida, toda glória ao Teu santo nome.

RESUMO

Atualmente a carne de frango é uma das proteínas mais consumidas pelos brasileiros e por isso a vigilância da sua qualidade é uma questão de saúde pública. Além disso, as cepas de *Escherichia coli* contaminantes isoladas de carnes de frango têm apresentado alto perfil de resistência a antimicrobianos. Assim, o objetivo desse estudo foi quantificar Coliformes Termotolerantes em carnes de frango resfriadas comercializadas no Distrito Federal, isolar cepas de *Escherichia coli* para avaliação de resistência antimicrobiana e realizar a confirmação das cepas produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL). As amostras foram analisadas pela técnica de tubos múltiplos para identificar o Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Termotolerantes e as cepas de *E. coli* foram isoladas em meio de cultura Ágar MacConkey. O perfil de suscetibilidade a antimicrobianos foi feito pelo método de difusão em disco (Kirby-Bauer). A detecção de produção de ESBL foi feita pela técnica de sinergia de disco duplo e confirmação do gene *bla_{CTX}* por PCR. Foram estudadas 12 amostras de diferentes cortes de frango e delas foram isoladas 45 cepas de *E. coli*. Foi observado que 100% das amostras de carne de frango analisadas tiveram a presença de Coliformes Termotolerantes dentro dos limites aceitáveis pela legislação brasileira. As cepas de *E. coli* apresentaram resistência maior à Sulfonamida (88,89%), Ciprofloxacina (57,78%) e houve 75,56% de resistência somado a resistência intermediária para a Amoxicilina/Ácido Clavulânico. Entre as 45 cepas de *E. coli* isoladas, 24 (53,33%) se classificaram como multirresistentes. Das 32 cepas de *E. coli* que foram classificadas previamente como suspeitas de serem produtoras de ESBL, 56,25% (18) apresentaram resultado positivo para o teste de sinergia, o que sugere a produção de ESBL. Das 28 amostras de *E. coli* analisadas como produtoras de ESBL nenhuma apresentou o gene *bla_{CTX-M}*. Dessa forma, é possível afirmar que a testagem de outros genes *bla* nas cepas de *E. coli* são necessárias para se ter um resultado mais preciso. O aumento da incidência de *E. coli* ESBL na carne está associado com a utilização excessiva de antimicrobianos na criação de frangos e esses animais são vistos como reservatórios de cepas multirresistentes com potencial risco de serem transmitidas para os seres humanos por meio da cadeia alimentar.

Palavras-chave: *Escherichia coli*, frango, resistência antimicrobiana, β -lactamases de espectro estendido.

ABSTRACT

Currently, chicken meat is one of the proteins most consumed by Brazilians and therefore monitoring its quality is a public health issue. Furthermore, contaminating *Escherichia coli* strains isolated from chicken meat have shown a high profile of resistance to antimicrobials. Thus, the objective of this study was to quantify thermotolerant coliforms in chilled chicken meat sold in the Federal District, isolate strains of *Escherichia coli* to evaluate antimicrobial resistance and confirm the strains producing extended spectrum β -lactamases (ESBL). The samples were analyzed using the multiple tube technique to identify the Most Probable Number (MPN) of Thermotolerant Coliforms and the *E. coli* strains were isolated on MacConkey Agar culture medium. The antimicrobial susceptibility profile was performed using the disk diffusion method (Kirby-Bauer). ESBL production was detected using the double-disk synergy technique and confirmation of the *bla*_{CTX} gene by PCR. So, 12 samples of different cuts of chicken were studied and 45 strains of *E. coli* were isolated from them. It was observed that 100% of the chicken meat samples analyzed had the presence of Thermotolerant Coliforms within the limits acceptable by Brazilian legislation. The *E. coli* strains showed greater resistance to Sulfonamide (88.89%), Ciprofloxacin (57.78%) and there was 75.56% resistance plus intermediate resistance to Amoxicillin/Clavulanic Acid. Among the 45 *E. coli* strains isolated, 24 (53.33%) were classified as multidrug-resistant. Of the 32 *E. coli* strains that were previously classified as suspected of producing ESBL, 56.25% (18) presented a positive result for the synergy test, which suggests the production of ESBL. Of the 28 *E. coli* samples analyzed as ESBL producers, none showed the *bla*_{CTX-M} gene. Therefore, it is possible to state that testing other *bla* genes in *E. coli* strains is necessary to obtain a more accurate result. The increased incidence of *E. coli* ESBL in meat is associated with the excessive use of antimicrobials in chicken farming and these animals are seen as reservoirs of multi-resistant strains with a potential risk of being transmitted to humans through the food chain.

Keywords: *Escherichia coli*, chicken, antimicrobial resistance, extended-spectrum β -lactamases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Perfis resistente e intermediário aos antimicrobianos das cepas de <i>Escherichia coli</i> isoladas das amostras de carnes de frango	28
Figura 2 – Teste de sinergia para identificação de β -lactamases de espectro estendido em cepas de <i>Escherichia coli</i>	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Quantificação de Coliformes Termotolerantes nas amostras de carne de frango	25
Tabela 2 – Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das cepas de <i>Escherichia coli</i> provenientes das amostras de carne de frango.....	27
Tabela 3 – Porcentagem de cepas de <i>Escherichia coli</i> isoladas das amostras de carnes de frango com resistência aos antimicrobianos testados.....	30

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação funcional e molecular das β -lactamases.....	18
Quadro 2 – Valores de referência para enterobactérias (<i>Escherichia coli</i>).....	22
Quadro 3 – Sequência dos oligonucleotídeos e tamanho do produto amplificado para identificação do gene <i>bla_{CTX-M}</i>	23
Quadro 4 – Quantidades padronizadas dos reagentes utilizados para a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase.....	24
Quadro 5 – Teste de sinergia de disco duplo para detecção de cepas de <i>Escherichia coli</i> produtoras de β -lactamases de espectro estendido.....	32
Quadro 6 – Perfil fenotípico e genotípico (gene <i>bla_{CTX-M}</i>) das cepas de <i>Escherichia coli</i> confirmadas como β -lactamases de espectro estendido pelo teste de sinergia.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
AMC	Amoxicilina/ácido clavulânico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APEC	<i>Escherichia coli</i> Patogênica para Aves
CAZ	Ceftazidima
CIP	Ciprofloxacina
CLO	Cloranfenicol
CRO	Ceftriaxona
CTX	Cefotaxima
DTHA	Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESBL	β-lactamases de espectro estendido
g	Gramas
GEN	Gentamicina
IMP	Imipenem
KPC	Carbapenemases
MAPA	Ministério da Agricultura e Pecuária
MDR	Microrganismo Multirresistente
mL	Mililitros
mm	Milímetros
ng	Nanograma
NMP/g	Número Mais Provável por grama
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia de polimerase
SUL	Sulfonamida
TET	Tetraciclina
UFC/g	Unidade Formadora de Colônia por grama

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	QUALIDADE E CONTAMINAÇÃO DA CARNE DE FRANGO POR <i>Escherichia coli</i>	14
2.2	<i>Escherichia coli</i> E DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS	15
2.3	RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE <i>Escherichia coli</i>	16
2.4	GENÉTICA MOLECULAR E GENES DE RESISTÊNCIA AOS β -LACTÂMICOS	17
3	OBJETIVOS	19
3.1	OBJETIVO GERAL	19
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
4	JUSTIFICATIVA	20
5	MATERIAIS E MÉTODOS	21
5.1	COLETA DAS AMOSTRAS	21
5.2	PREPARO DAS AMOSTRAS E ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	21
5.3	PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS	21
5.4	TESTE DE DETECÇÃO DE <i>Escherichia coli</i> PRODUTORA DE β -LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO	22
5.5	EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO E ANÁLISES MOLECULARES	23
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
6.1	QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES DAS AMOSTRAS DE CARNE DE FRANGO	25
6.2	PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DAS CEPAS DE <i>Escherichia coli</i> ISOLADAS DAS AMOSTRAS DE CARNE DE FRANGO	26
6.3	TESTE DE DETECÇÃO DE <i>Escherichia coli</i> PRODUTORA DE β -LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL)	30
6.4	CONFIRMAÇÃO GENÉTICA DAS <i>Escherichia coli</i> PRODUTORAS DE β -LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL)	33
7	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
	ANEXOS	40

1 INTRODUÇÃO

A carne de frango é uma das proteínas mais consumidas em todo o mundo, assim, garantir a segurança microbiológica desse produto é uma questão de saúde pública (Kataria and Morey, 2020; Rouger *et al.*, 2017). Durante e após o abate dos frangos a exposição à contaminação microbiológica pode se dar pelas bactérias da microbiota desse animal, do ambiente do matadouro e dos equipamentos utilizados durante o processamento da carne (Rouger *et al.*, 2017).

As comunidades bacterianas contaminantes da carne de aves podem incluir cepas patogênicas como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp.; *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* (Bhaisare *et al.*, 2014; Gonçalves-Tenorio *et al.*, 2018).

A intensificação da criação de frango para abate contribui para o aumento das infecções de aves criadas em condições impróprias e para o uso irracional de antimicrobianos para tratar esses animais, e esses cenários favorecem a seleção de bactérias resistentes a diversos antimicrobianos (MOHAMED, M. A.; SHEHATA, M. A.; RAFEEK, E., 2014). Além disso, o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) reconhece que muitos criadouros de aves no Brasil utilizavam antimicrobianos como aditivo melhorador de desempenho na alimentação animal levando ao desenvolvimento de resistência a essas substâncias. Portanto, ao longo dos anos o MAPA restringiu o uso de diversos antimicrobianos com intuito de reduzir o impacto à saúde humana e promover saúde e bem-estar ao animal (Brasil, 2023).

A microbiota comensal do trato intestinal do frango é composta por diversas espécies bacterianas, e entre elas *Escherichia coli* se destaca por ter sorotipos causadores de diferentes processos infecciosos nas aves. A infecção por *E. coli* em aves é denominada colibacilose aviária e é uma das principais doenças da avicultura industrial moderna. Sua ocorrência causa grandes prejuízos econômicos no mundo inteiro, pois gera perdas de animais e investimentos em tratamentos (Cardoso *et al.*, 2015; Carvalho *et al.*, 2015).

Escherichia coli possui predisposição para transferência de genes de resistência a diversos antimicrobianos devido à quantidade de cepas existentes e a capacidade que elas possuem de sobreviver dentro e fora do trato gastrointestinal tanto dos seres humanos quanto dos animais. A aquisição de resistência antimicrobiana pode resultar em aumento na virulência das cepas devido a presença de novos genes e isso torna

os animais portadores dessas bactérias resistentes um problema de saúde pública (MOHAMED, M. A.; SHEHATA, M. A.; RAFEEK, E., 2014).

Nas últimas décadas, as tendências de resistência a antimicrobianos aumentaram em cepas de *E. coli* isoladas de frangos. Essas bactérias são vistas como um importante reservatório de genes de resistência antimicrobiana que pode se espalhar para outras cepas patogênicas. Um dos mecanismos de resistência mais comuns relatados nos membros da família Enterobacteriaceae é a produção de enzimas β -lactamases que hidrolisam antimicrobianos β -lactâmicos de espectro estendido (ESBLs). As β -lactamases são um grupo heterogêneo de enzimas que hidrolisam eficientemente Cefalosporinas de terceira e quarta geração e Monobactâmicos (por exemplo, Aztreonam) (Fernandes *et al.*, 2014; Parvin *et al.*, 2020).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 QUALIDADE E CONTAMINAÇÃO DA CARNE DE FRANGO POR *Escherichia coli*

Diversos fatores justificam o aumento da aceitação dos consumidores pela carne de frango como preço acessível, fácil disponibilidade, ausência de tabus religiosos, sabor e frequente recomendação de consumo por nutricionistas devido à alta qualidade proteica, menor teor de gorduras e menor valor calórico de alguns cortes de frango quando comparados a outros tipos de carne (Bhaisare *et al.*, 2014). Todavia, a carne de frango possui características que favorecem o crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos, como o alto teor de umidade, alto teor proteico e pH neutro. Portanto, ela é considerada um produto perecível e seu prazo de validade é de 3 a 5 dias em refrigeração (Chaillou *et al.*, 2015; Shin *et al.*, 2022).

A carne de frango está entre os alimentos com maior frequência nos surtos de doenças transmitidas por alimentos (Gonçalves-Tenorio *et al.*, 2018). Sua qualidade e segurança se tornaram uma questão de saúde pública e um objetivo primordial das indústrias produtoras, pois, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), “a alimentação deve ser disponível em quantidade e qualidade nutricionalmente adequadas, além de ser livre de contaminações que possam levar ao desenvolvimento de doenças de origem alimentar” (Souza *et al.*, 2014). E impactos econômicos também são observados, pois as bactérias deteriorantes em níveis elevados diminuem a vida útil da carne, levando a perda dos produtos (Bhaisare *et al.*, 2014; Klaharn *et al.*, 2022).

O frango é hospedeiro de diferentes microrganismos e estes residem em sua pele, penas ou no trato alimentar. Normalmente, a superfície da carne se apresenta ausente de microrganismos patogênicos, porém, eles podem ser adquiridos da matéria fecal do próprio animal ou por meio da contaminação cruzada (Bhaisare *et al.*, 2014). Estudos afirmam que em um grama de fezes de frango podem ser detectados aproximadamente 10^6 UFC de *E. coli* e estima-se que 10 a 20% das cepas são potencialmente patogênicas e contaminam o ambiente (Carvalho *et al.*, 2015).

A eliminação da *E. coli* do ambiente de criação de aves é, dessa forma, quase impossível e a contaminação da carne pode ocorrer em todas as etapas do processo de produção. Durante o abate as etapas mais críticas são a escaldagem, a depenagem e a evisceração (Maharjan *et al.*, 2019; Perez-Arnedo *et al.*, 2020). Além

disso, condições de higiene inadequadas durante a manipulação, transporte, armazenamento, comercialização e até mesmo durante o consumo favorecem a contaminação da carne de frango (Pacholewicz *et al.*, 2016; Parvin *et al.*, 2020; Souza *et al.*, 2014).

2.2 *Escherichia coli* E DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

A bactéria *Escherichia coli* compõe a microbiota do trato gastrointestinal de diversos animais, como mamíferos e aves. Ela faz parte da família *Enterobacteriaceae*, portanto, é um bacilo Gram-negativo e possui capacidade de crescimento em condições aeróbicas e anaeróbicas (Carvalho *et al.*, 2015; Davis *et al.*, 2018). A relação da *E. coli* com diversas doenças no homem e nos animais tem chamado a atenção de estudiosos, pois esse microrganismo apresenta diferentes mecanismos de virulência (Cardoso *et al.*, 2015).

Os Coliformes são um grupo de bactérias compostos pelos gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Escherichia*. Eles são subdivididos em Coliformes Totais e Coliformes Termotolerantes, a partir da temperatura de fermentação da lactose com produção de gás (Freitas *et al.*, 2019). A bactéria *E. coli* pertence aos Coliformes Termotolerantes e a presença desse grupo em alimentos é um indicador de contaminação fecal, pois são bactérias de origem no trato intestinal de homens e animais de sangue quente (Pereira *et al.*, 2020; Pimentel *et al.*, 2019).

Entre os patógenos alimentares em humanos, *E. coli* se destaca por estar associada a infecções importantes, geralmente agudas e invasivas. A Doença de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA) causada por essa bactéria pode ocorrer via contato direto durante o preparo de alimentos ou através do consumo de produtos cárneos mal-cozidos ou crus. Os principais sintomas identificados nessas infecções alimentares são cólicas abdominais, vômitos, diarreia e em casos mais graves diarreia sanguinolenta. Em alguns casos de infecção por *E. coli* produtora de toxina Shiga, pode se observar a síndrome hemolítico-urêmica que leva ao desenvolvimento de insuficiência renal, tornando o quadro grave (Parvin *et al.*, 2020).

A espécie de *E. coli* patogênica para ave de maior importância é o sorotipo APEC. Ele pode atuar como agente primário ou secundário e promove quadros infecciosos intestinais e extraintestinais, denominados colibacilose aviária. O sorotipo APEC não possui capacidade de infectar humanos, porém a preocupação está na troca de genes

de resistência de antimicrobianos entre os sorotipos APEC e outras cepas de *E. coli* comensais do trato gastrointestinal das aves e humanos (Cardoso *et al.*, 2015).

2.3 RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE *Escherichia coli*

Nas últimas décadas, as taxas de resistência a antimicrobianos aumentaram mais rapidamente entre isolados de *Escherichia coli* de frangos em comparação com os isolados clínicos humanos (Parvin *et al.*, 2020). Por ser frequentemente encontrado em alimentos, esse microrganismo é tido como um indicador de resistência antimicrobiana de patógenos alimentares. Além disso, a alta prevalência de isolados multirresistentes mostra que *E. coli* pode ser um reservatório de genes de resistência, que em um segundo momento podem ser transferidos para outros microrganismos patogênicos (Lazarus *et al.*, 2015; Rahman *et al.*, 2020; Shousha *et al.*, 2015).

O aumento da resistência a antimicrobianos apresentado por *E. coli* é decorrente de diferentes fatores, mas se destaca a facilidade que ela adquire e transporta diferentes genes de resistência antimicrobiana (Shousha *et al.*, 2015). O principal mecanismo de aquisição de resistência bacteriana é a transferência horizontal de genes. Esse mecanismo ocorre a partir da transferência de elementos genéticos móveis, como os plasmídeos e os íntegrons, de uma célula para outra por meio de conjugação, transformação e transdução (Rahman *et al.*, 2020).

O uso irracional de agentes antimicrobianos na produção da carne de frango, com finalidades terapêuticas e profiláticas é uma das principais causas do desenvolvimento de populações bacterianas resistentes a antimicrobianos (Cardoso *et al.*, 2015). Além disso, o uso de um único antimicrobiano pode levar à seleção e co-seleção de múltiplos genes de resistência, pois ele pode atuar como um potencial marcador de co-seleção para outros agentes antimicrobianos (Rahman *et al.*, 2020).

O mecanismo de resistência a β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) é um dos mais relatados nos membros da família Enterobacteriaceae. Ele foi registrado pela primeira vez na Europa em 1980 e desde então é tido como um problema de saúde mundial. As bactérias ESBLs são caracterizadas pela produção de enzimas β -lactamases que hidrolisam antimicrobianos β -lactâmicos e conferem resistência ao Aztreonam, Cefotaxima, Ceftazidima e Oxiimino- β -lactamas relacionados, bem como a outras Penicilinas e Cefalosporinas (Fernandes *et al.*, 2014; Parvez *et al.*, 2016).

A carne de frango é uma fonte potencial de cepas de *E. coli* produtoras de ESBL multirresistentes, que são responsáveis por sérios problemas de saúde humana em todo o mundo. A superexpressão de ESBL em bactérias gram-negativas pode reduzir as opções terapêuticas para o tratamento das infecções por fornecer resistência à maioria dos antimicrobianos β -lactâmicos. Portanto, é preciso prudência na utilização de antimicrobianos na criação de frangos, a fim de preservar o uso terapêutico em animais e seres humanos (Cardoso *et al.*, 2015; Ghodousi *et al.*, 2015; Rahman *et al.*, 2020).

Os β -lactâmicos compõem uma grande classe de antimicrobianos e são caracterizados pela presença do anel β -lactâmico em sua estrutura química. Eles possuem ação bactericida, ou seja, são capazes de matar a célula bacteriana e fazem isso por meio da inibição da biossíntese do peptidoglicano presente na parede celular bacteriana. Esses antimicrobianos são os mais utilizados em muitos quadros de infecção, pois apresentam baixa toxicidade e amplo espectro de ação (Arruda *et al.*, 2019).

2.4 GENÉTICA MOLECULAR E GENES DE RESISTÊNCIA AOS β -LACTÂMICOS

As β -lactamases compõem um grupo diversificado de enzimas e, por isso, algumas classificações foram criadas por estudiosos para identificá-las. Ambler realizou em 1980 uma classificação de acordo com a sequência de aminoácidos e agrupou as β -lactamases em classes A, B, C e D. As β -lactamases de espectro estendido (ESBL) são enzimas da classe molecular A, classe caracterizada por possuir um aminoácido serina no sítio ativo da enzima e da classe molecular D (Quadro 1). Bush e Jacoby também classificam essas enzimas baseado em características bioquímicas e funcionais. Dessa forma, de acordo com a classificação de Bush e Jacoby, as ESBLs pertencem as classes 2b, 2ber ou 2de (Sejas, 2015).

Quadro 1 – Classificação funcional e molecular das β -lactamases.

GRUPO FUNCIONAL (Bush-Jacoby)	CLASSE MOLECULAR (Ambler)	ENZIMAS	CARACTERÍSTICAS
2b	A	SHV-1, TEM-1, TEM-2, TEM-90	Enzimas que possuem hidrólise eficiente de penicilinas e cefalosporinas de primeira geração, inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
2ber	A	TEM-50, TEM-68, TEM-89	Enzimas que promovem a hidrólise de penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e são pouco inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
2de	D	OXA-11, OXA-15	Hidrólise de penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro, pouco inibidas por ácido clavulânico.

Fonte: Adaptado de Sejas, 2015.

As ESBLs são codificadas a partir do plasmídeo que compõe a sua estrutura molecular e as mais encontradas são TEM, SHV e CTX-M. A prevalência desses grupos varia entre as regiões geográficas e a enzima CTX-M é a mais disseminada e dominante na América do Sul e no mundo (Casella *et al.*, 2016). Ela é caracterizada por hidrolisar Cefotaxima e inativar Ceftriaxona e Aztreonam e, por isso, recebe esse nome. Além disso, também é subdividida em CTX-M1, CTX-M2, CTX-M8, CTX-M9 e CTX-M25 (Tran *et al.*, 2021).

O gene *bla*_{CTX-M} foi isolado pela primeira vez na Alemanha em 1990 de uma cepa clínica de *Escherichia coli*. Ele possui capacidade de disseminação extremamente rápida, e sua taxa de mobilização para plasmídeos é 10 vezes maior comparada a taxa de outros genes codificadores de ESBL (Casella *et al.*, 2016). Esse fato é justificado pela ligação desse gene a dispositivos genéticos móveis como os plasmídeos conjugativos, transposons e sequências de inserção por transposição. Portanto, o gene *bla*_{CTX-M} é o mais prevalente em *E. coli* produtoras de ESBL (Been *et al.*, 2014; Nahar *et al.*, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi quantificar Coliformes Termotolerantes em carnes de frango resfriadas comercializadas no Distrito Federal e isolar cepas de *Escherichia coli* das amostras, com posterior avaliação da sua resistência antimicrobiana e confirmação das cepas produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o Número Mais Provável (NMP) de Coliformes Termotolerantes em amostras de carne de frango resfriadas;
- Isolar cepas de *E. coli* das amostras analisadas;
- Realizar teste de susceptibilidade antimicrobiana das cepas de *E. coli* isoladas, utilizando o método de difusão em disco (Kirby-Bauer);
- Analisar teste de sinergia de disco duplo para detecção de *E. coli* produtora de ESBL;
- Realizar a técnica de PCR para detecção do gene de resistência a classe dos β -lactâmicos *bla*_{CTX-M} nas cepas de *E. coli*.

4 JUSTIFICATIVA

A carne de frango apresentou consumo crescente nas últimas décadas pelos brasileiros, e entre os motivos está o baixo custo e a alta qualidade proteica. Sabe-se que a carne de frango está entre os alimentos com maior frequência nos surtos de doenças transmitidas por alimentos e por isso a vigilância da sua qualidade é uma questão de saúde pública. Além disso, as cepas de *Escherichia coli* contaminantes isoladas de carnes de frango têm apresentado alto perfil de resistência a antimicrobianos, devido ao uso indiscriminado desses medicamentos na criação de aves. Portanto, estudos da qualidade microbiológica, da incidência e do perfil resistência antimicrobiana de microrganismos potencialmente patogênicos como *E. coli* se fazem necessários para determinação da qualidade e segurança alimentar da carne de frango oferecida para o consumo em mercados do Distrito Federal.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 COLETA DAS AMOSTRAS

As 12 amostras de carne de frango (peito, coxa e outros cortes) embaladas em bandejas e expostas ao consumo nos balcões refrigerados foram coletadas em diferentes estabelecimentos comerciais como supermercados e padarias do Distrito Federal. Todas as amostras foram transportadas resfriadas dos locais de estudo para o laboratório no tempo de 30 a 50 minutos. No prazo máximo de 1 hora após a coleta foram iniciadas as análises microbiológicas. As amostras foram analisadas em duplicata e os resultados expressos como média.

5.2 PREPARO DAS AMOSTRAS E ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

Para o preparo das amostras, foram pesadas, assepticamente, 25 g de cada amostra e diluídas em 225 mL de água peptonada 0,1% (p/v) e realizou-se a diluição seriada 10^{-2} e 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 Lauril Sulfato Triptose. Os tubos foram incubados a 37°C por 24 horas. A positividade do teste caracteriza-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) para a confirmação de Coliformes Termotolerantes. Os tubos foram incubados em banho-maria a 45°C por 24 horas. Os resultados obtidos foram expressos em NMP/g ou log NMP/g. Por fim, dos tubos positivos do caldo EC, alíquotas foram inoculadas no meio de cultura Ágar *MacConkey*, do qual foram isoladas as cepas de *E. coli*.

5.3 PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

A susceptibilidade das cepas *Escherichia coli* aos antimicrobianos foi avaliada pela técnica de disco difusão, utilizando protocolo recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2020). As zonas de inibição foram medidas e

classificadas como sensível, intermediário e resistente de acordo com recomendações do CLSI (2020) (Quadro 2). Os antimicrobianos e as concentrações em microgramas testados foram: Amoxicilina com Ácido Clavulânico (10 µg) (β-lactâmico/Penicilina), Cefotaxima (30 µg) (β-lactâmico/cefalosporina), Ceftazidima (30 µg) (β-lactâmico/Cefalosporina), Ciprofloxacina (5 µg) (Quinolona), Cloranfenicol (30 µg) (Fenicol), Gentamicina (10 µg) (Aminoglicosídeo), Imipenem (10 µg) (β-lactâmico/Carbapenem), Sulfonamida (300 µg) (Sulfonamida) e Tetraciclina (30 µg) (Tetraciclina) (NEWPROV®).

Quadro 2 – Valores de referência para enterobactérias (*Escherichia coli*).

Antimicrobianos	Halo R (mm)	Halo I (mm)	Halo S (mm)
Amoxicilina*	≤13	14-17	≥ 18
Cefotaxima	≤ 22	23-25	≥ 26
Ceftazidima	≤ 17	18-20	≥ 21
Ciprofloxacina	≤ 21	22-25	≥ 26
Cloranfenicol	≤ 12	13-17	≥ 18
Gentamicina	≤ 12	13-14	≥ 15
Imipenem	≤ 19	20-22	≥ 23
Sulfonamida	≤ 12	13-16	≥ 17
Tetraciclina	≤ 11	12-14	≥ 15

Fonte: CLSI (2020).

Legenda: *Amoxicilina e ácido clavulânico; Halo R: resistente; Halo I: intermediário; Halo S: sensível; mm: milímetro.

5.4 TESTE DE DETECÇÃO DE *Escherichia coli* PRODUTORA DE β-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO

Foram avaliadas nesse teste as cepas de *E. coli* suspeitas de serem produtores de ESBL (aquelas que apresentaram resistência a pelo menos um β-lactâmico no perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos). A detecção de produção de ESBL foi feita pela técnica de sinergia de disco duplo, na qual um disco de Amoxicilina/Ácido Clavulânico (Amoxicilina 20 µg e Ácido Clavulânico 10 µg) foi colocado no centro de uma placa e discos de Cefotaxima (30 µg), Ceftazidima (30 µg) e Ceftriaxona (30 µg) foram colocados a 30 mm do disco de Amoxicilina/Ácido Clavulânico. O resultado positivo foi considerado com o aumento do halo da zona de inibição (Parvin *et al.*, 2020).

5.5 EXTRAÇÃO DE DNA BACTERIANO E ANÁLISES MOLECULARES

Antes de iniciar a extração de DNA bacteriano foi feito o preparo das amostras, que consistiu em cultivar por 16-24 horas as colônias das bactérias isoladas em caldo Luria Bertani. A extração de DNA bacteriano foi realizada utilizando o kit NucleoSpin – Plasmid® MN Macherey – Nagel™ - Molecular Biotecnologia (Lote n° 2212-002 – Ref n° 740588.250), seguindo o protocolo do fabricante para extração de bactérias Gram-negativas.

Para confirmação de resistência foi utilizado o gene *bla*_{CTX-M} que codifica a enzima β-lactamase CTX-M (Gundran *et al.*, 2019). As análises moleculares foram realizadas por meio da técnica de PCR, que ao amplificar várias cópias da região genômica selecionada, possibilita a visualização do material genético analisado. A sequência de oligonucleotídeos está descrita no Quadro 3.

Quadro 3 – Sequência dos oligonucleotídeos e tamanho do produto amplificado para identificação do gene *bla*_{CTX-M}.

Gene	Oligonucleotídeos	Tamanho(pb)	Referência
<i>bla</i> _{CTX-M}	F: ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC R: TGGGTRAARTARGTSACCAGAAAYCAGCGG	592	(Gundran <i>et al.</i> , 2019)

Fonte: Autoria própria (2023).

Legenda: F: *forward* (5'→3'); R: *reverse* (5'→3'); pb: pares de base.

As condições de termociclagem na PCR para o gene de resistência *bla*_{CTX-M} foram de 94°C por 1 minuto, 30 ciclos de desnaturação 94°C por 1 minuto, 30 ciclos de anelamento a 55°C por 1 minuto, 30 ciclos de extensão à 72°C por 1 minuto, seguido por 72°C por 1 minuto para extensão final. A amplificação de fragmentos de genes foi realizada utilizando os termocicladores Life Express Thermal Cycler modelo TC-96/G/H(b), Swift MiniPro Thermal Cycler modelo SWT-MIP-0-2-1 e Life Touch Thermal Cycler modelo TC~96/G/H(b)B.

Em cada reação foram usadas quantidades padronizadas dos reagentes para o protocolo de identificação do gene *bla*_{CTX-M}, que podem ser visualizados no Quadro 4. Todas as reações foram completadas com água ultrapura para um volume final de 25 µL por reação.

Quadro 4 – Quantidades padronizadas dos reagentes utilizados para a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase.

Reagente	Concentração final	<i>Bla_{CTX-M}</i> (µL)
Água MiliQ®	q.s.p 25 µL	14,40
Tampão Taq	10x	2,50
MgCl ₂ (mM)	50 mM	1,25
dNTP (mM)	2,5 mM	1,25
Oligo <i>F</i> (µM)	10 pmol/µL	0,50
Oligo <i>R</i> (µM)	10 pmol/µL	0,50
Taq DNA pol (U/µL)	5 U/ µL	0,40
DNA molde	10 ng	4,00

Fonte: Autoria própria (2023).

Legenda: q.s.p: quantidade suficiente para; MgCl₂: Cloreto de magnésio; pmol: picomolar; mM: milimolar; µM: micromolar; U/µL: unidade de massa atômica por microlitro; ng: Nanograma; µL: microlitro.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 QUANTIFICAÇÃO DE COLIFORMES TERMOTOLERANTES DAS AMOSTRAS DE CARNE DE FRANGO

Nesse estudo foram realizadas análises para verificar a qualidade microbiológica das amostras de carne de frango. Foram estudadas 12 amostras de diferentes cortes de frango e delas foram isoladas 45 cepas de *Escherichia coli*. A Tabela 1 apresenta os resultados encontrados nas análises microbiológicas de quantificação de Coliformes Termotolerantes e da presença do microrganismo *E. coli*.

Tabela 1 – Quantificação de Coliformes Termotolerantes nas amostras de carne de frango.

Amostra de Frango Número	Corte da Carne de Frango	Quantidade de Coliformes Termotolerantes (NMP/g)*	Presença de <i>Escherichia coli</i> †
1	Coxa c/ Sobrecoxa	$3,9 \times 10^1$	Presente
2	Coxa c/ Sobrecoxa	$1,3 \times 10^1$	Presente
3	Filé de Peito	$5,6 \times 10^2$	Presente
4	Filé de Peito	$2,4 \times 10^1$	Presente
5	Coxinha da asa	$8,1 \times 10^1$	Não Detectada
6	Coxinha da asa	$2,0 \times 10^1$	Presente
7	Filé de Peito	$1,9 \times 10^1$	Presente
8	Filé de Peito	$1,2 \times 10^2$	Presente
9	Coxinha da asa	$5,1 \times 10^1$	Presente
10	Coxinha da asa	$2,5 \times 10^1$	Presente
11	Coxinha da asa	$1,4 \times 10^2$	Presente
12	Coxinha da asa	$7,8 \times 10^2$	Presente

Fonte: Própria Autoria (2023).

Legenda: *NMP/g: número mais provável por grama de amostra; †: Considerando o crescimento de colônias características em meio seletivo e diferencial Ágar MacConkey; Valor de referência: 5×10^3 NMP/g (Brasil, 2022).

Foi observado que 100% das amostras de carne de frango analisadas tiveram a presença de Coliformes Termotolerantes e o número mais provável por grama (NMP/g) das amostras ficaram no intervalo de $1,3 \times 10^1$ - $7,8 \times 10^2$. Além disso, das 12 amostras analisadas, 91,66% apresentaram contaminação por *E. coli*.

A legislação brasileira (Brasil, 2022) estabelece o limite microbiológico de *E. coli* aceito para carne de aves cruas de 5×10^3 NMP/g. Dessa forma, mesmo que na maioria das amostras tenha sido identificada a presença de *E. coli*, a quantidade de Coliformes Termotolerantes está dentro dos padrões microbiológicos aceitáveis.

Pimentel *et al.* (2019) avaliaram amostras de carne de frango comercializadas no município de Castanhal, Pará, e obtiveram resultados semelhantes. Os autores constataram que 66,66% das amostras estavam contaminadas por Coliformes Termotolerantes, porém a enumeração estava dentro dos padrões microbiológicos aceitáveis. Freitas *et al.* (2019) analisaram a qualidade da carne de frango no município de Sinop, Mato Grosso, e relataram que 100% das amostras tiveram a presença de Coliformes Termotolerantes dentro dos limites aceitáveis, sendo que somente 8,30% das amostras apresentaram contaminação por *E. coli*.

Alimentos contaminados por Coliformes Termotolerantes e *E. coli* estão diretamente relacionados com problemas higiênico-sanitários durante o processo de produção, manipulação e preparo (Pereira *et al.*, 2020; Pimentel *et al.*, 2019). A presença de cepas de *E. coli* patogênicas nas carnes de frango podem ocasionar o desenvolvimento DTHA, como infecções intestinais (Elbehiry *et al.*, 2023). Cerca de 550 milhões de episódios de diarreia são relatados por ano devido ao consumo de alimentos contaminados. Esse cenário se agrava em consumidores de grupos de risco (crianças, idosos e imunocomprometidos), pois seus organismos são mais vulneráveis e possuem maior dificuldade de repor os nutrientes perdidos durante um quadro de infecção alimentar (Hauser *et al.*, 2022; Yu *et al.*, 2021).

6.2 PERFIL DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS DAS CEPAS DE *Escherichia coli* ISOLADAS DAS AMOSTRAS DE CARNE DE FRANGO

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das 45 cepas de *Escherichia coli*, isoladas das amostras de carne de frango foi realizado contra nove antimicrobianos, considerando seis classes terapêuticas, e está apresentado na Tabela 2. No presente estudo, as cepas de *E. coli* apresentaram resistência maior à Sulfonamida (88,89%), seguida da Ciprofloxacina (57,78%). Os antimicrobianos aos quais as cepas apresentaram maior sensibilidade foram ao Imipenem (95,56%) e ao Cloranfenicol (66,67%).

Tabela 2 – Perfil de suscetibilidade antimicrobiana das cepas de *Escherichia coli* provenientes das carnes de frango.

Antimicrobianos	R % (n)	I % (n)	S % (n)
Amoxicilina* (AMC)	35,56 (16)	40,00 (18)	24,44 (11)
Cefotaxima (CTX)	35,56 (16)	6,67 (3)	57,78 (26)
Ceftazidima (CAZ)	26,67 (12)	15,56 (7)	57,78 (26)
Ciprofloxacina (CIP)	57,78 (26)	11,11 (5)	31,11 (14)
Cloranfenicol (CLO)	33,33 (15)	0 (0)	66,67 (30)
Gentamicina (GEN)	35,56 (16)	0 (0)	64,44 (29)
Imipenem (IMP)	0 (0)	4,44 (2)	95,56 (43)
Sulfonamida (SUL)	88,89 (40)	0 (0)	11,11 (5)
Tetraciclina (TET)	44,44 (20)	6,67 (3)	48,89 (22)

Fonte: Autoria própria (2023).

Legenda: *Amoxicilina e ácido clavulânico; R= resistente; I = intermediário; S = sensível; n = número de cepas; % = porcentagem em relação ao total de 45 cepas.

Vounba *et al.* (2019) testaram a suscetibilidade antimicrobiana de cepas de *E. coli* isoladas de aves no Senegal, África e observaram alta resistência à classe das Sulfonamidas (80,80% Sulfisoxazol e 76,70% Sulfametoxazol-trimetoprim). A alta resistência a Sulfonamida também foi observada por Rasmussen *et al.* (2015) que investigaram a ocorrência de *E. coli* em carnes de frango locais e importadas em Gana, África. Foi relatado resistência à Sulfonamida de 75,00% para frangos locais e 46,60% para frangos importados.

Dan *et al.* (2015) relataram resultados semelhantes a esse estudo nas análises de cepas de *E. coli* isoladas de carnes de frango na Romênia com 55,55% de resistência a Quinolonas e Fluorquinolonas. Mandal *et al.* (2022) relataram resistência de 65,10% para Ciprofloxacina em cepas de *E. coli* isoladas de frango em Bangladesh. E Sadat *et al.* (2022) reportaram 88,20% de resistência para o Ácido Nalidíxico em cepas de *E. coli* isoladas de frango no Egito.

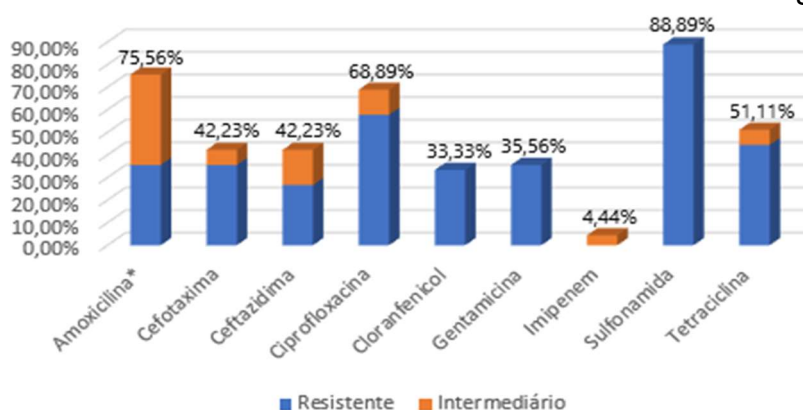
Os estudiosos afirmam que a resistência em *E. coli* é maior para agentes antimicrobianos que estão em uso por mais tempo na medicina humana e veterinária. As Sulfonamidas foram introduzidas em 1936 e as Quinolonas em 1960 (Vounba *et al.*, 2019). Além disso, Ribeiro *et al.* (2023) observaram que essas classes de antimicrobianos estão entre as resistências mais prevalentes em *E. coli* em todos os países do mundo.

Com relação a sensibilidade aos antimicrobianos, Mudenda *et al.* (2023) analisaram cepas de *E. coli* isoladas de aves na Zâmbia, África e obtiveram maior sensibilidade ao Meropenem (94,70%) e ao Cloranfenicol (85,80%). Resultado semelhante foi apresentado por Aworth *et al.* (2021) que relataram sensibilidade de 83,30% ao Imipenem em cepas de *E. coli* isoladas de frango.

A sensibilidade apresentada pelas cepas de *E. coli* aos Carbapenêmicos é esperada, pois entre os β -lactâmicos, eles são os mais eficazes contra bactérias Gram-negativas produtoras de β -lactamase. Os Carbapenêmicos possuem atividade antibacteriana de amplo espectro e sua estrutura molecular apresenta um carbapenem ligado ao anel β -lactâmico que confere proteção a maioria das β -lactamases, inclusive a ESBL (Codjoe and Donkor, 2018; Meletis, 2016). Em contrapartida, sabe-se que a resistência aos Carbapenêmicos não é ausente e diversos estudos mostram a sua ocorrência em cepas multirresistentes. Esse cenário é preocupante, pois as opções de escolha terapêutica para essas cepas multirresistentes são limitadas ou inexistentes (Amancha *et al.*, 2023).

A Figura 1 mostra o quantitativo em porcentagem do somatório dos perfis resistente e intermediário das cepas de *E. coli*. É observado que, quando o perfil intermediário é interpretado como um potencial de risco para o desenvolvimento de resistência, o risco de resistência aumenta expressivamente no caso de alguns antimicrobianos.

Figura 1 – Perfis resistente e intermediário aos antimicrobianos das cepas de *Escherichia coli* isoladas das amostras de carnes de frango.



Fonte: Própria Autoria (2023).

Legenda: *Amoxicilina com ácido clavulânico.

Foi observado que os perfis de resistência se mantiveram elevados para Sulfonamida e Ciprofloxacina. Porém, ao considerar o potencial risco de resistência

representado pelo perfil de resistência intermediária, houve um destaque importante para a Amoxicilina/Ácido Clavulânico que teve seu quantitativo aumentado significativamente (75,56%).

Nhung *et al.* (2022) obtiveram resistência de 68,80% para Amoxicilina/Ácido Clavulânico para cepas de *E. coli* isoladas de frango no Vietnã. Musa *et al.* (2020) observaram resistência de 35,70% para Amoxicilina/Ácido Clavulânico e esse valor foi aumentado para 52,00% quando considerado os resultados intermediários em cepas de *E. coli* isoladas de carnes de frango.

O presente estudo apresentou 4,44% das cepas de *E. coli* com perfil intermediário para o Imipenem. O Imipenem está entre os antimicrobianos de última escolha para tratamentos clínicos considerando seu amplo espectro de atuação, mas a disseminação acelerada de cepas ESBL acarretou o aumento do seu uso mundialmente. Como consequência há o surgimento de cepas produtoras de enzimas carbapenemases (KPC) que conferem resistência a essa classe terapêutica. Esse cenário pode acarretar a ausência de opções de tratamento (Meletis, 2016; Moniz *et al.*, 2016).

O potencial de risco que a resistência intermediária representa para a saúde pública está relacionado a tendência de desenvolvimento de resistência antimicrobiana. Muitos estudiosos afirmam que o uso inadequado de antimicrobianos, com o passar do tempo, favorece a resistência antimicrobiana. Portanto, a ocorrência de resistência intermediária para o Imipenem é preocupante (Rabello *et al.*, 2020; Ribeiro *et al.*, 2023).

As seis classes de antimicrobianos consideradas nesse estudo foram β -lactâmicos, Quinolonas, Fenicolis, Aminoglicosídeos, Sulfonamidas e Tetraciclina. A Tabela 3 apresenta a quantificação das cepas resistentes a partir das classes dos antimicrobianos. Entre as 45 cepas de *E. coli* isoladas, 24 (53,33%) se classificaram como multirresistentes. Segundo a ANVISA, microrganismos multirresistentes (MDR) são aqueles que apresentam resistência a três ou mais classes de antimicrobianos, independente do mecanismo de resistência (Brasil, 2021). Somente, 4,44% das cepas apresentaram sensibilidade a todos os antimicrobianos.

Tabela 3 – Porcentagem de cepas de *Escherichia coli* isoladas das amostras de carnes de frango com resistência aos antimicrobianos testados.

Número de classes de antimicrobianos aos quais as cepas apresentaram resistência	Número de cepas (%)
0 (sensível a todos os antimicrobianos)	2 (4,44)
1	13 (28,88)
2	6 (13,33)
3	3 (6,66)
4	7 (15,55)
5	4 (8,88)
6	10 (22,22)
Cepas multirresistentes (3,4,5 ou 6)	24 (53,33)
Total	45 (100)

Fonte: Própria Autoria (2023).

Sarba *et al.* (2019) observaram que 78,10% das cepas de *E. coli* isoladas de frango na Etiópia eram multirresistentes. No Egito, os isolados de *E. coli* originados de carne de frango apresentaram 61,90% de multirresistência (Moawad *et al.*, 2017). Amancha *et al.* (2023) relataram a multirresistência em 68,00% das cepas de *E. coli* isoladas de aves no Equador.

O desenvolvimento de resistência em cepas bacterianas é favorecido pelo uso excessivo e indevido de antimicrobianos na criação de animais destinados à alimentação. Esses animais podem atuar como reservatórios de cepas resistentes e o consumo dessa carne pode levar a transmissão de resistência antimicrobiana para os seres humanos por contato direto ou indireto (Sudatip *et al.*, 2023).

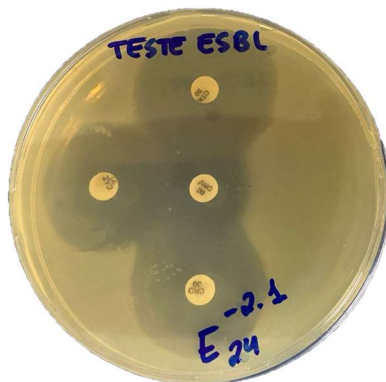
A presença de multirresistência a antimicrobianos em *E. coli* é uma questão de saúde pública global, pois as cepas patogênicas desses microrganismos são capazes de gerar uma variedade de doenças e essa condição dificulta, significativamente, o tratamento de infecções e resulta em aumento morbidade e mortalidade em humanos (Liu *et al.*, 2021; Rahman *et al.*, 2020).

6.3 TESTE DE DETECÇÃO DE *Escherichia coli* PRODUTORA DE β -LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL)

O teste de sinergia de disco duplo para detecção de *Escherichia coli* produtora de β -lactamases de espectro estendido considerou 32 cepas de *E. coli* que foram classificadas previamente como suspeitas de serem produtoras de ESBL por apresentarem resistência à pelo menos um β -lactâmico no perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos. Na Figura 2 é possível observar macroscopicamente o resultado

positivo de uma cepa de *E. coli* isolada para o teste de sinergia em meio Ágar Mueller Hinton (Kasvi®).

Figura 2 – Teste de sinergia para identificação de β -lactamases de espectro estendido em cepas de *Escherichia coli*.



Fonte: Própria Autoria (2023).

Legenda: *Escherichia coli* em placa de Petri meio Ágar Mueller Hinton (Kasvi®). AMC: Amoxicilina/Ácido Clavulânico; CTX: Cefotaxima; CAZ: Ceftazidima; CRO: Ceftriaxona (30 µg).

A sinergia apresentada nesse teste de detecção de produção de enzima ESBL está associada a interação de β -lactâmicos com o Ácido Clavulânico, que é um inibidor dessas enzimas. Ao considerar o gene de resistência *bla* como o principal componente genotípico das ESBLs, é adequado usar a Cefotaxima e a Ceftriaxona, que são consistentemente suscetíveis a identificação do gene *bla*_{CTX-M}. A Ceftazidima, por sua vez, é um substrato para identificação do gene *bla*_{TEM} e variantes do gene *bla*_{SHV}. Dessa forma, a cepa teste que possuir o gene *bla* em seu genoma apresentará aumento da zona de inibição, devido sinergismo entre β -lactâmicos e Ácido Clavulânico (Hassuna *et al.*, 2020; Parvin *et al.*, 2020; Olowe *et al.*, 2015).

O resultado desse teste mostra a análise da sinergia de disco duplo entre os antimicrobianos e está descrito no Quadro 5. Das 32 cepas de *E. coli* analisadas 56,25% (18) apresentaram resultado positivo para sinergia, o que sugere a presença de produção de ESBL.

Quadro 5 – Teste de sinergia de disco duplo para detecção de cepas de *Escherichia coli* produtoras de β -lactamases de espectro estendido.

Cepas de <i>Escherichia coli</i>	AMC Halo (mm)		CTX Halo (mm)		CAZ Halo (mm)		CRO Halo (mm)		Sinergia [†]
	ANTB	TESTE	ANTB	TESTE	ANTB	TESTE	ANTB*	TESTE	
1	10	10	10	10	19	19	-	10	Não
2	10	10	17	19	15	17	-	18	Sim
3	10	10	10	10	17	14	-	10	Não
4	10	10	10	10	14	10	-	10	Não
5	10	12	10	10	19	22	-	10	Sim
6	10	10	10	17	13	18	-	16	Sim
7	10	10	10	16	10	10	-	17	Sim
8	10	10	30	30	25	28	-	33	Sim
9	15	10	10	10	10	10	-	10	Não
10	14	14	10	10	10	10	-	10	Não
11	13	15	30	29	23	26	-	25	Sim
12	16	15	27	30	18	24	-	27	Sim
13	10	10	27	28	23	16	-	19	Não
14	15	10	30	10	22	10	-	10	Não
15	17	20	24	23	11	18	-	19	Sim
16	17	17	29	28	22	27	-	30	Sim
17	15	20	30	34	24	28	-	32	Sim
18	16	10	29	10	24	10	-	10	Não
19	12	10	10	10	10	10	-	10	Não
20	15	13	10	10	19	19	-	10	Não
21	15	14	10	10	18	25	-	10	Sim
22	10	15	10	10	20	22	-	10	Sim
23	12	15	10	10	16	19	-	10	Sim
24	17	15	30	30	28	24	-	30	Não
25	15	16	29	19	26	18	-	18	Não
26	15	17	28	35	26	30	-	33	Sim
27	17	17	30	31	25	10	-	24	Não
28	14	18	29	29	24	26	-	30	Sim
29	10	10	27	31	25	29	-	28	Sim
30	15	16	10	10	15	15	-	10	Não
31	15	15	12	15	22	26	-	10	Sim
32	14	20	25	33	28	30	-	30	Sim

Fonte: Própria Autoria (2023).

Legenda: AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima; CRO: ceftriaxona (30 µg); ANTB: Antibiograma. *Não foi feito antibiograma para esse antibiótico. Grifos meus: Halos que tiveram aumento em seu tamanho. †Sinergia: amoxicilina e ácido clavulânico (20 +10 µg) + CTX: cefotaxima (30 µg) + CAZ: ceftazidima (30 µg) + CRO: ceftriaxona (30 µg).

Moniz *et al.* (2016) estudaram a prevalência de ESBL em cepas clínicas de *E. coli* utilizando o teste de sinergia de disco duplo com os antimicrobianos Amoxicilina/Ácido Clavulânico (20 + 10 µg), Cefotaxima (30 µg) e Ceftazidima (30 µg) e relataram que 4,75% das amostras apresentaram positividade para sinergia. Badr *et al.* (2022) utilizando os mesmos antimicrobianos do estudo anterior obtiveram produção de ESBL no teste de sinergia de disco duplo em 75,00% das cepas de *E. coli* isoladas de frango.

E. coli produtora de ESBL é comumente isolada de animais e humanos e sua presença limita o tratamento de infecções devido a resistência aos principais

antimicrobianos de escolha clínica e veterinária, como Penicilina e Cefalosporinas de terceira geração (Li *et al.*, 2022). Muitos estudiosos associam o aumento da incidência de *E. coli* ESBL com a utilização excessiva de antimicrobianos na criação de frangos e esses animais são vistos como reservatórios dessas cepas multirresistentes com potencial risco de serem transmitidas para os seres humanos por meio da cadeia alimentar (Been *et al.*, 2014; Ramadan *et al.*, 2019).

A alta prevalência da produção de ESBL está relacionada a resistência de diferentes classes terapêuticas devido a ocorrência de mutações genéticas entre as cepas de *E. coli* produtoras de ESBL. Esse cenário favorece a multirresistência e novas resistências são desenvolvidas, como AmpC e KPC (Rabello *et al.*, 2020). A resistência a antimicrobianos de primeira escolha terapêutica é um problema de saúde pública e reflete no aumento do consumo de outras opções terapêuticas que deveriam funcionar como última escolha (Meletis, 2016; Mudenda *et al.*, 2023).

6.4 CONFIRMAÇÃO GENÉTICA DAS *Escherichia coli* PRODUTORAS DE β -LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL)

Os resultados de sinergia obtidos no teste de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) de disco duplo foram comparados com a presença do gene de resistência *bla*_{CTX-M} por meio da informação genética dessas cepas (Quadro 6). Das 28 amostras de *E. coli* analisadas como produtoras de ESBL nenhuma apresentou o gene *bla*_{CTX-M}.

Quadro 6 – Perfil fenotípico e genotípico (gene *bla_{CTX-M}*) das cepas de *Escherichia coli* confirmadas como β -lactamases de espectro estendido pelo teste de sinergia.

AMOSTRAS	SINERGIA*	Gene <i>bla_{CTX-M}</i>	AMOSTRAS	SINERGIA*	Gene <i>bla_{CTX-M}</i>
1	Não	Não	15	Não	Não
2	Sim	Não	16	Não	Não
3	Não	Não	17	Sim	Não
4	Não	Não	18	Sim	Não
5	Sim	Não	19	Sim	Não
6	Sim	Não	20	Não	Não
7	Sim	Não	21	Não	Não
8	Não	Não	22	Sim	Não
9	Não	Não	23	Não	Não
10	Sim	Não	24	Sim	Não
11	Sim	Não	25	Sim	Não
12	Não	Não	26	Não	Não
13	Sim	Não	27	Sim	Não
14	Sim	Não	28	Sim	Não

Fonte: Própria Autoria (2023).

Legenda: *SINERGIA: amoxicilina e ácido clavulânico (20 +10 µg) + CTX: cefotaxima (30 µg) + CAZ: ceftazidima (30 µg) + CRO: ceftriaxona (30 µg).

Albo-Almagd *et al.* (2023) estudaram a genética de cepas de *E. coli* produtoras de ESBL isoladas de frango no Egito e relataram a presença do gene *bla_{CTX-M}* em 25,88% das cepas. Hassuna *et al.* (2020) relataram que 56,25% das cepas de *E. coli* isoladas das amostras de carne de frango apresentaram o gene *bla_{CTX-M}*. A presença desse gene em cepas de *E. coli* ESBL também foi estudada por Li *et al.* (2022) que consideraram cepas clínicas e de galinhas de granja na China. Os autores relataram que 24,24% das cepas de galinha de granja e 43,47% das cepas clínicas apresentavam o gene *bla_{CTX-M}* em sua composição genotípica.

Apesar de muitos estudiosos afirmarem que o gene *bla_{CTX-M}* é, atualmente, o gene mais prevalente entre as cepas de *E. coli* produtoras de ESBL, ele não é exclusivo. Associados a essa resistência há outros genes igualmente importantes como mostra Hassuna *et al.* (2020) que detectaram o gene *bla_{TEM}* em 75,00% e o gene *bla_{SHV}* em 18,75% dos isolados de *E. coli*. Além disso, também foi identificado a coexistência dos genes *bla_{TEM}* e *bla_{CTX}* em 21,25%, *bla_{SHV}* e *bla_{CTX}* em 10,00% e *bla_{TEM}* e *bla_{SHV}* em 6,25% dos isolados de *E. coli*. Dessa forma, é possível afirmar que a testagem de outros genes *bla* nas cepas de *E. coli* desse estudo seria necessária para se ter um resultado mais preciso.

7 CONCLUSÃO

As 12 amostras de carnes de frango resfriadas comercializadas no Distrito Federal analisadas nesse estudo foram positivas para Coliformes Termotolerantes, porém a enumeração estava dentro dos limites aceitáveis pela legislação brasileira.

As cepas de *E. coli* isoladas das carnes de frango apresentaram resistência maior à Sulfonamida (88,89%), Ciprofloxacina (57,78%) e houve 75,56% de perfil de resistência somado a resistência intermediária para a Amoxicilina/Ácido Clavulânico. Entre as 45 cepas de *E. coli* isoladas, 24 (53,33%) se classificaram como multirresistentes.

Além disso, foram identificadas 56,25% (18) cepas de *E. coli* produtoras de ESBL que apesar de não terem presença do gene *bla_{CTX}*, positivaram para o teste de sinergia de disco duplo para detecção de produção de ESBL.

Dessa forma, os resultados desse estudo confirmaram uma fragilidade na qualidade da carne de frango comercializada no Distrito Federal e confirmaram a presença de cepas de *E. coli* com multirresistência. Esse cenário é preocupante, pois o consumo de alimentos contaminados por cepas multirresistentes pode levar a disseminação dessa resistência para os microrganismos da microbiota dos consumidores e, conseqüentemente, diminuir as escolhas terapêuticas em caso de infecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABO-ALMAGD, E. E. *et al.* β -Lactamase Producing *Escherichia coli* Encoding blaCTX-M and blaCMY Genes in Chicken Carcasses from Egypt. **Foods**, v. 21, n. 598, 2023.
- AMANCHA, G. *et al.* High levels of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella* from poultry in Ecuador. **Pan American Journal of Public Health**, v. 47, 2023.
- ARRUDA, C. J. M. *et al.* Bibliographic review of Beta-lactam antibiotic. **Revista Saúde em Foco**, v. 11, 2019.
- AWORTH, M. K. *et al.* Genetic relatedness of multidrug resistant *Escherichia coli* isolated from humans, chickens and poultry environments. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 10, n. 58, 2021.
- BADR, H. *et al.* Multidrug-resistant and genetic characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* recovered from chickens and humans in Egypt. **Animals**, v. 12, n. 346, 2022.
- BEEN, M. *et al.* Dissemination of cephalosporin resistance genes between *Escherichia coli* strains from farm animals and humans by specific plasmid lineages. **PLOS Genetics**, v. 10, n. 12, 2014.
- BHAISARE, D. B. *et al.* Bacterial pathogens in chicken meat: review. **International Journal of Life Sciences Research**, v. 2, n. 3, 2014.
- BRASIL, 2022. **Instrução Normativa nº 161 de julho de 2022**. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Diário Oficial da União. Brasília, DF, v. 126, p. 235, seção 1, 2022.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA, Uso Responsável de Antimicrobianos – Saiba mais sobre a necessidade do uso responsável e prudente dos antimicrobianos em animais. Disponível em: < <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/resistencia-aos-antimicrobianos/uso-responsavel-de-antimicrobianos#:~:text=Essas%20restri%C3%A7%C3%B5es%20se%20iniciaram%20com%20a%20proibi%C3%A7%C3%A3o%20do,colistina%2C%20e%20mais%20recentemente%2C%20tilosina%2C%20lincomicina%2C%20e%20tiamulina> >. Acesso em: 01 nov 2023.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária Prevenção de infecções por microrganismos multirresistentes em serviços de saúde – Série Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Brasília: Anvisa, 2021, p. 103. Acesso em 10 nov 2023.
- CARDOSO, A. L. S. P. *et al.* Avaliação do perfil de resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isolada de aves comerciais. **Revista Nutritime**, 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**, v. 45, n. 7, p. 1249-1255, 2015.
- CASELLA, T. *et al.* **Caracterização molecular de genes de resistência a cefalosporina de espectro estendido em *Escherichia coli* isoladas de frango e carnes de frango**. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Biociência, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. São Paulo, p. 27-36, 2016.
- CHAILLOU, S. *et al.* Origin and ecological selection of core and food-specific bacterial communities associated with meat and seafood spoilage. **ISME Journal**, v. 9, p. 1105–1118, 2015.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2020. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-third informational supplement**. CLSI M100-S23, Wayne.
- CODJOE, F. S. and DONKOR, E. S. Carbapenem Resistance: A Review. **Medical Sciences**, v. 6, n. 1, 2018.

- DAN, S. D. *et al.* Antibiotic susceptibility and prevalence of foodborne pathogens in poultry meat in Romania. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 1, p. 35-41, 2015.
- DAVIS, G.S. *et al.* Antibiotic-resistant *Escherichia coli* from retail poultry meat with different antibiotic use claims. **BMC Microbiology**, v.18, 2018.
- ELBEHIRY, A. *et al.*, An overview of the public health challenges in diagnosing and controlling human foodborne pathogens. **Vaccines**, v. 11, n. 725, 2023.
- FDA - Food and Drug Administration. Laboratory Methods (Food). FDA, 2021. Disponível em: < <https://www.fda.gov/food/science-research-food/laboratory-methods-food> >. Acesso em: 04 nov 2023.
- FERNANDES, R. *et al.* Molecular characterization of ESBL-producing Enterobacteriaceae in northern Portugal. **Scientific World Journal**, p. 1–6, 2014.
- FREITAS, F. *et al.*, Microbiological evaluation of thigh and drumstick chicken sold in bulk in Sinop-MT. **Ciência Animal Brasileira**, v. 20, p. 1-9, 2019.
- GHODOUSI, A. *et al.* Extended-spectrum β -lactamase, AmpC-producing, and fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in retail broiler chicken meat, Italy. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, p. 619–625, 2015.
- GONÇALVES-TENORIO, A. *et al.* Prevalence of pathogens in poultry meat: a meta-analysis of European published surveys. **Foods**, v. 7, n. 5, 69, 2018.
- GUNDRAN, R.S. *et al.* Prevalence and distribution of *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} genes in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from broiler farms in the Philippines. **BMC Veterinary Research**, v. 227, 2019.
- HASSUNA, N. A. *et al.* Molecular characterization of Extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* recovered from community-acquired urinary tract infections in Upper Egypt. **Scientific Reports**, v. 10, n. 2772, 2020.
- HAUSER, A. M. *et al.* Key food hygiene behaviors to reduce microbial contamination of complementary foods in rural Bangladesh. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 107, n. 3, p. 709-719, 2022.
- KATARIA, J. and MOREY, A. Antimicrobial interventions in poultry processing to improve shelf life and safety of poultry meat: a review with special attention to *Salmonella* spp. **Journal of Food Quality and Hazards Control**, v. 7, n. 2, p. 52-59, 2020.
- KLAHARN, K. *et al.* Bacterial contamination of chicken meat in slaughterhouses and the associated risk factors: A nationwide study in Thailand. **PLoS ONE**, v. 17, p. 6, 2022.
- LAZARUS, B. *et al.* Extraintestinal *Escherichia coli* infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins originate from food-producing animals? A systematic review. **Clinical Infection Disease**, v.60, n. 3, p. 439–452, 2015.
- LI, C. *et al.* Comparative Analysis of Phylogenetic Relationships and Virulence Factor Characteristics between Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates Derived from Clinical Sites and Chicken Farms. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 6, 2022.
- LIU, C. *et al.* Longitudinal monitoring of multidrug resistance in *Escherichia coli* on broiler chicken fattening farms in Shandong, China. **Poultry Science**, v. 100, n. 100887, 2021.
- MAHARJAN, S. *et al.* Microbial quality of poultry meat in an ISO 22000: 2005 certified poultry processing plant of Kathmandu valley. **International Journal of Food Contamination**, v. 6, n. 1, p. 1–9, 2019.

MANDAL, A. K. *et al.* Epidemiology and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* in broiler chickens, farmworkers, and farm sewage in Bangladesh. **Veterinary Medicine and Science**, v. 8, p. 187-199, 2022.

MELETIS, G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v. 3, n. 1, p. 15-21, 2016.

MOAWAD, A. A. *et al.* Occurrence of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in raw chicken and beef meat in northern Egypt and dissemination of their antibiotic resistance markers. **Gut Pathogens**, v. 9, n. 57, 2017.

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

MONIZ, S. *et al.* The prevalence of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and carbapenemases (KPC) – A retrospective study 2011-2015 BMAC Laboratory. **Acta Farmacêutica Portuguesa**, v. 5, n. 1, p. 45-51, 2016.

MUDENDA, S. *et al.* Antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* isolated from laying hens in Zambia: implications and significance on one health. **JAC Antimicrobial Resistance**, v. 5, n. 3, 2023.

MUSA, L. *et al.* Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* and ESBL-producing *Escherichia coli* diffusion in conventional, organic and antibiotic-free meat chickens at slaughter. **Animals**, v. 10, n. 1215, 2020.

NAHAR, A. *et al.* Prevalence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in domestic and imported chicken meats in Japan. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 80, n. 3, p. 510-517, 2018.

NHUNG, N. T. *et al.* Antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* from humans and chickens in the Mekong Delta of Vietnam is driven by antimicrobial usage and potential cross-species transmission. **JAC Antimicrobial Resistance**, v. 4, n. 3, 2022.

LOWE, O. A. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* obtained from animal fecal samples in Ado Ekiti, Nigeria. **Journal of Environmental and Public Health**, v. 2015, n. 497980, 2015.

PACHOLEWICZ, E. *et al.* Influence of food handlers' compliance with procedures of poultry carcasses contamination: A case study concerning evisceration in broiler slaughterhouses. **Food Control**, v. 68, p. 367-78, 2016.

PARVIN, M. S. *et al.* Antimicrobial resistance pattern of *Escherichia coli* isolated from frozen chicken meat in Bangladesh. **Pathogens**, v. 9, n. 6, p. 420, 2020.

PARVEZ, M.A.K. *et al.* Prevalence of inhibitor resistant beta lactamase producing *Escherichia coli* in human and poultry origin of Bangladesh. **Journal of Bacteriology and Parasitology**, v. 7, p. 1-3, 2016.

PEREIRA, M. D. *et al.* Microbiological analysis of *Salmonella spp.* and coliforms at 45°C in chicken commercialized in a supermarket in Belo Horizonte – MG, Brazil. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 3, p. 14175-14189, 2020.

PEREZ-ARNEDO, I. *et al.* Effect of processing on the microbiological quality and safety of chicken carcasses at slaughterhouse. **International Journal of Food Science & Technology**, 2020.

PIMENTEL, C. N. M. *et al.* Microbiological evaluation of chicken meat sold in the municipality of Castanhal, Pará. **Brazilian Journal of Development**, v. 5, n. 10, p. 21848-21859, 2019.

RABELLO, R. F. *et al.* Antimicrobial resistance in farm animals in Brazil: an update overview. **Animals**, v. 10, n. 552, 2020.

- RAHMAN, M. *et al.* Isolation and molecular characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* from chicken meat. **Scientific reports**, v. 10, n. 21999, 2020.
- RAMADAN, A. A. *et al.* Novel blaCTX-M variants and genotype-phenotype correlations among clinical isolates of extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli*. **Scientific Reports**, v. 9, n. 4224, 2019.
- RASMUSSEN, M. M. *et al.* Beta-Lactamase producing *Escherichia coli* isolates in imported and locally produced chicken meat from Ghana. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, 2015.
- RIBEIRO, J. *et al.* Antibiotic resistance among gastrointestinal bacteria in broilers: a review focused on *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli*. **Animals**, v. 13, n. 1362, 2023.
- ROUGER, A. *et al.* Bacterial contaminants of poultry meat: sources, species, and dynamics. **Microorganisms**, v. 5, n. 3, 2017.
- SADAT, A. *et al.* Phylotypic profiling, distribution of pathogenicity island markers, and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolated from retail chicken meat and humans. **Antibiotics**, v. 11, n. 1197, 2022.
- SARBA, E. J. *et al.* Identification and antimicrobial susceptibility profile of *Escherichia coli* isolated from backyard chicken in and around ambo, Central Ethiopia. **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 85, 2019.
- SEJAS, C. G. F. **Avaliação da resistência aos antibióticos, a variabilidade genética e as relações clonais de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* produtoras de ESBL de cultura de vigilância de uma unidade de terapia intensiva no município do Rio de Janeiro.** Tese (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, p. 39-45, 2015.
- SHIN, D. *et al.* Effect of chitosan and duck fat-based emulsion coatings on the quality characteristics of chicken meat during storage. **Foods**, v. 11, p. 245, 2022.
- SHOUSHI, A. *et al.* Bacteriophages isolated from chicken meat and the horizontal transfer of antimicrobial resistance genes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 14, p. 4600-4606, 2015.
- SOUZA, G. *et al.* Característica microbiológica da carne de frango. **Agropecuária Científica no Semi-árido**, v. 10, n. 2, p. 12-17, 2014.
- SUDATIP, D. *et al.* The risk of pig and chicken farming for carriage and transmission of *Escherichia coli* containing extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and mobile colistin resistance (mcr) genes in Thailand. **Microbial Genomics**, v. 9, n. 951, 2023.
- TRAN, T. *et al.* Prevalence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in domestic and imported chicken meats in Japan. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, n. 622195, 2021.
- VOUNBA, P. *et al.* Prevalence of antimicrobial resistance and potential pathogenicity, and possible spread of third generation cephalosporin resistance, in *Escherichia coli* isolated from healthy chicken farm in the region of Dakar, Senegal. **PLoS ONE**, v. 14, n. 3, 2019.
- YU, C. *et al.* Surveillance of foodborne diseases in Taiwan. **Medicine**, v. 100, n. 5, 2021.

ANEXOS

ANEXO 1. Número mais provável (NMP) para três tubos e respectivos e intervalo de confiança a nível de 95% de probabilidade.

Tubos positivos			NMP/g	Limite de confiança		Tubos positivos			NMP/g	Limite de confiança	
0.10	0.01	0.001		Baixo	Alto	0.10	0.01	0.001		Baixo	Alto
0	0	0	<3.0	–	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	–

Fonte: FDA, 2021.