

**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
HIGIENE VETERINÁRIA E PROCESSAMENTO
TECNOLÓGICO DE PRODUTOS DE ORIGEM ANIMAL**

PEDRO HENRIQUE NUNES PANZENHAGEN

**RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS E AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA
ANTIMICROBIANA DE *SALMONELLA* SPP. ISOLADAS EM FRANGOS DE
CORTE ABATIDOS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO**

**UNIVERSIDADE
FEDERAL
FLUMINENSE**

NITERÓI

2014

PEDRO HENRIQUE NUNES PANZENHAGEN

RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS E AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA
ANTIMICROBIANA DE *SALMONELLA* SPP. ISOLADAS EM FRANGOS DE CORTE
ABATIDOS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para aquisição do Grau de Mestre. Área de concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

ORIENTADORA: Prof. Dra Maria Helena Cosendey de Aquino - UFF

CO-ORIENTADORA: Prof. Dra. Virginia Léo de Almeida - UFF

Niterói

2014

PEDRO HENRIQUE NUNES PANZENHAGEN

RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS E AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA
ANTIMICROBIANA DE *SALMONELLA* SPP. ISOLADAS EM FRANGOS DE CORTE
ABATIDOS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para aquisição do Grau de Mestre. Área de concentração: Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Helena Cosendey de Aquino
UFF

Prof^a. Dr^a. Virginia Léo de Almeida
UFF

Prof. Dr. Thiago da Silveira Álvares
UFRJ

Prof^a. Dr^a. Mariana Costa Monteiro
UFRJ

Prof^a. Dr^a. Dayse Lima da Costa Abreu
UFF

Niterói
2014

À minha querida avó, Niesi dos Santos Panzenhagen, por toda ajuda, amor, carinho, dedicação e confiança creditados à mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus, acima de tudo, por guiar meus passos e tornar tudo em minha vida possível.

Aos meus pais Elisabete Nunes e Carlos Henrique Panzenhagen pelo carinho, amor, paciência, dedicação, amizade, compreensão, e o mais importante, pela educação que tornou tudo isso possível.

Ao meu Irmão Paulo Augusto pelo companheirismo, apoio e amizade.

À família Viana Barbosa: Paulo, Tininha, Luana, Alessandro, e especialmente à minha namorada Lílian por me receberem com tanto carinho, amor, dedicação, incentivo e por compartilharem cada minuto dessa conquista. Obrigado meu amor, por cada dia!

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Maria Helena Cosenday de Aquino, pela disponibilidade, paciência, compreensão e ensinamentos.

À minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Virginia Léo de Almeida, à Prof^a. Dr^a Dayse Lima da Costa Abreu e ao Prof. Dr. Elmiro Rosendo do Nascimento pelo auxílio e contribuição na execução dos trabalhos.

Aos amigos do Laboratório de Sanidade Avícola, Waldemir, Felipe, Raquel, Lídia, Camila, Hugo, Mariza, Tiago, Daniela, Leandro, pelo companheirismo e contribuição no desenvolvimento desse trabalho.

À todos amigos do LANAGRO Pedro Leopoldo e Porto Alegre, por me receberem com carinho, entusiasmo e dedicação. Por tornarem o trabalho tão divertido e por contribuírem com o enriquecimento e melhora do mesmo. Agradeço especialmente à Dr^a Andrea Melo Garcia e Dr. Fabiano Barreto por possibilitarem a realização de etapas fundamentais desse estudo.

Aos queridos amigos da pós-graduação, Bruna Leal Rodrigues, Eduardo Bruno Nogueira, Hugo Oliveira, Marion Pereira da Costa, Celso Fasura e Guilherme Sicca

Sampaio, por compartilharmos momentos de dificuldades, alegrias, sofrimentos e conquistas em função de um ideal comum.

Aos meus eternos amigos da Graduação Thatiana Leito Pinto, Mário Balaro e Celso Fasura pelo nosso crescimento juntos e por nossa grande amizade.

À equipe da Pós-Graduação, Mariana, André, especialmente ao Dráusio pela atenção, ajuda, confiança e incentivo durante a realização do Curso de Mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo auxílio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram na realização do presente trabalho.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS, p. 5

SUMÁRIO, p. 7

LISTA DE ILUSTRAÇÕES, p. 8

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS, p. 11

RESUMO, p. 13

ABSTRACT, p. 14

1 INTRODUÇÃO, p. 15

2 OBJETIVOS, p. 17

2.1 OBJETIVO GERAL, p. 17

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS, p. 17

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA, p. 18

3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA *SALMONELLA* SPP. , p. 18

3.2 SALMONELOSE, p. 19

3.3 MICROBIOLOGIA CONVENCIONAL, p. 22

3.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR), p. 23

3.5 O USO DE ANTIMICROBIANOS NA AVICULTURA INDUSTRIAL, p. 24

3.6 RESISTÊNCIA DA *SALMONELLA* SPP FRENTE A ANTIMICROBIANOS, p. 25

3.7 RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS NA CARNE DE FRANGO, p. 26

3.8 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO ESPECTÔMETRO DE MASSAS, p. 27

4 MATERIAL E MÉTODOS, p. 30

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL, p. 30

4.2 AQUISIÇÃO DAS AMOSTRAS, p. 31

4.3 ANÁLISES, p. 31

4.3.1 *Deteção de Salmonella spp. pelo método convencional*, p. 31

4.3.2 *Deteção de Salmonella spp. através da Reação em Cadeia da Polimerase*, p. 34

4.3.3 *Perfil de Sensibilidade pelo Teste de Difusão em Disco*, p. 35

4.3.4 *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Espectrômetro de Massas (CLAE -EM/EM)*, p. 35

4.3.4.1 Triagem de resíduos de antibióticos por CLAE - EM/EM, p. 35

4.3.4.2 Quantificação de resíduos de Oxitetraciclina em rim e fígado por CLAE - EM/EM, p. 42

4.3.4.3 Quantificação de resíduos de Oxitetraciclina em músculo (peito) por CLAE - EM/EM, p. 43

4.3.4.4 Quantificação de resíduos de Enrofloxacin em rim e fígado por CLAE - EM/EM, p. 45

4.3.4.5 Quantificação de resíduos de Enrofloxacin em músculo (peito) por CLAE - EM/EM, p. 46

4.3.4.6 Análise Estatística dos Resultados, p. 48

5 RESULTADOS, p. 49

5.1 PESQUISA DE *SALMONELLA* SPP. , p. 49

5.2 PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DAS CEPAS ISOLADAS, p. 50

5.3 PESQUISA DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM RIM, FÍGADO E MÚSCULO DOS FRANGOS ABATIDOS POR CLAE, p. 53

6 DISCUSSÃO, p. 55

6.1 OCORRÊNCIA DE *SALMONELLA* SPP EM CARNE DE FRANGO RESFRIADA, p. 55

6.2 OCORRÊNCIA DE *SALMONELLA* SPP EM CARNE DE FRANGO CONGELADA, p. 56

6.3 JUSTIFICATIVAS PARA VARIAÇÕES DA OCORRÊNCIA DE *SALMONELLA* NO AMBIENTE DE ABATE, p. 57

6.4 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE DETECÇÃO DE *SALMONELLA* SPP. , p. 58

6.5 OCORRÊNCIA DOS SOROTIPOS DE *SALMONELLA* SPP EM PRODUTOS AVÍCOLAS, p. 58

6.6 RESISTÊNCIA DE *SALMONELLA* SPP FRENTE AOS ANTIMICROBIANOS, p. 59

6.7 PESQUISA POR RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM FRANGOS DE CORTE, p. 60

7 CONCLUSÕES, p. 62

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS, p. 63

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Tabela 1 Concentração do controle positivo e sua relação com o limite máximo residual utilizados na triagem dos 44 antibióticos analisados. LANAGRO/MG. Pedro Leopoldo, 2013, f. 37
- Tabela 2 Condições cromatográficas utilizadas na quantificação de oxitetraciclinas em amostras de rim e fígado de aves. LANAGRO/MG, Pedro Leopoldo, 2013, f.43
- Tabela 3 Parâmetros analíticos, razões monitoradas e tempos de retenção na análise de oxitetraciclinas em CLAE - EM/EM. LANAGRO/RS, Porto Alegre, 2013, f.44
- Tabela 4 Preparação da curva de calibração para quantificação de oxitetraciclina em matriz músculo. LANAGRO/RS, Porto Alegre, 2013, f.45
- Tabela 5 Parâmetros analíticos, razões monitoradas e tempos de retenção na análise de enrofloxacina em CLAE - EM/EM. LANAGRO/RS, Porto Alegre, 2013, f.47
- Tabela 6 Preparação da curva de calibração para quantificação de enrofloxacina em matriz músculo. LANAGRO/RS, Porto Alegre, 2013, f.48
- Tabela 7 Comparação entre PCR e Isolamento Microbiológico, identificação dos sorotipos isolados e ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos abatidos no estado do Rio de Janeiro. Laboratório de Sanidade Avícola, Uff, Niterói, 2013, f.49
- Tabela 8 Perfil de resistência antimicrobiana das cepas de *Salmonella* spp. isoladas em carcaças de frango ao abate frente a 14 antimicrobianos. Laboratório de Doenças Infecciosas, UFF, Niterói, 2013, f.51
- Tabela 9 Teores de resíduos de oxitetraciclina e enrofloxacina encontrados em rim, fígado e músculo dos frangos do matadouro B. LANAGRO/MG/RS, Pedro Leopoldo/Porto Alegre, 2013, f.53
- Figura 1 Equipamento típico de CLAE. a) reservatório da fase móvel; b) bomba de alta pressão; c) válvula de injeção; d) coluna; e) detector e f) registrador, f.28
- Figura 2 Fluxograma geral do experimento apresentando as análises das amostras coletadas em matadouros frigoríficos do Estado do Rio de Janeiro, f.30
- Figura 3 Fluxograma da detecção de resíduos de antimicrobianos por CLAE - EM/EM apresentando os procedimentos analíticos realizados nas

amostras coletadas em matadouros frigoríficos do Estado do Rio de Janeiro, f.30

Figura 4 Tubos contendo Selenito - Cistina e Rappaport Vassiliadis inoculados com 1mL e 0,1mL de amostras pré- enriquecidas, respectivamente. Laboratório de Sanidade Avícola da Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2013, f.32

Figura 5 Colônias translúcidas com morfologia compatível com *Salmonella* spp selecionadas do meio Ágar Bile Peptona Lactose Sacarose para realização de provas bioquímicas. Laboratório de Sanidade Avícola da Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2013, f.33

Figura 6 Colônias róseas com morfologia compatível com *Salmonella* spp selecionadas do meio Ágar *Salmonella* Diferencial para realização de provas bioquímicas. Laboratório de Sanidade Avícola da Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2013, f.33

Figura 7 Cepas que apresentaram características compatíveis com o gênero *Salmonella* em Ágar TSI e Ágar LIA. Esquerda para direita: TSI antes da incubação, TSI após incubação, LIA antes da incubação, LIA após inoculação. Laboratório de Sanidade Avícola da Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2013, f.34

Figura 8 Pesagem e preparo das amostras de rim para procedimento de extração. LANAGRO/MG, Pedro Leopoldo, 2013, f.39

Figura 9 Cópia do protocolo de extração utilizado no método de multirresíduos. LANAGRO/MG, Pedro Leopoldo, 2013, f.40

Figura 10 Espectrômetro de massas triplo quadrupolo/Ion Trap Linear (4000 QTRAP®) da AB Sciex equipado com fonte de ionização electrospray. LANAGRO/MG, Pedro Leopoldo, 2013, f.41

Figura 11 Valores da curva de calibração e reta de calibração utilizadas na quantificação de oxitetraciclina em rim e fígado de frangos. LANAGRO/MG, Pedro Leopoldo, 2013, f.42

Figura 12 Valores da curva de calibração e reta de calibração utilizadas na quantificação de Enrofloxacina em rim e fígado de aves. LANAGRO/MG, Pedro Leopoldo, f.46

Figura 13 Eletroforese em Gel de Agarose de produtos amplificados pela PCR para pesquisa de *Salmonella* spp. Marcador de DNA de 100pb (M), controle negativo (-), controle positivo (+). Amostras 11, 12, 14 positivas. Laboratório de Biologia Molecular, UFF, Niterói, 2013, f.50

Figura 14 Eletroforese em Gel de Agarose de produtos amplificados pela PCR para pesquisa de *Salmonella* spp. Marcador de DNA de 100pb (M), controle negativo (-), controle positivo (+), Amostras 51 e 52 positivas.

Laboratório de Biologia Molecular, UFF, Niterói, 2013, f.50

Perfil cromatográfico de todos os 44 antibióticos pesquisados e dos resíduos de Oxitetraciclina e Enrofloxacina encontrados nos rins de frangos abatidos no matadouro B. LANAGRO/MG, Pedro Leopoldo, 2013, f.52

Figura 15

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BPLS	Ágar Bile Peptona Lactose Sacarose
CLAE-EM/ EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência associada a Espectrometria de Massas
CMS	Carne Mecanicamente Separada
EC	<i>European Comission</i>
EM - EM	Espectrometria de Massas acoplada à Espectrometria de Massas
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FS	Fator de Segurança
IDA	Ingestão Diária Aceitável
LANAGRO	Laboratório Nacional Agropecuário
LIA	<i>Lysine Iron Agar</i>
LMR	Limite Máximo Residual
LPS	Lipopolissacarídeos
LRM	Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
NOEL	<i>No Observed Effect Level</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PIB	Produto Interno Bruto
PNCRC	Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes
PRP	Programa de Redução de Patógenos
S.I.E	Serviço de Inspeção Estadual
S.I.F	Serviço de Inspeção Federal
SD	Ágar <i>Salmonella</i> Diferencial
SIM	<i>Sulphur Indol Motility</i>
SSP	Solução Salina Tamponada
TCA	<i>Trichloro Acetic Acid</i>

TSI

Triple Sugar Iron

UBABEF

União Brasileira de Avicultura

XLT4

Xilose Lisina Tergitol Ágar 4

RESUMO

O frango de corte, é reconhecido como importante reservatório de *Salmonella* spp., e participa da cadeia epidemiológica como fonte de infecção para o ser humano. O uso indiscriminado de antimicrobianos na avicultura industrial aumenta a possibilidade de que resíduos estejam presentes na carne de frango e pode promover a seleção de patógenos resistentes, sendo crescente a seleção de cepas de *Salmonella* spp. resistentes a diversos antimicrobianos. Nesse sentido, o presente trabalho teve como objetivo investigar a presença de *Salmonella* spp. em frangos de corte abatidos no Estado do Rio de Janeiro, avaliar a resistência das cepas isoladas e pesquisar e quantificar resíduos de antimicrobianos através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada ao Espectrômetro de Massas (CLAE – EM/EM). Um total de 6 estabelecimentos de abate foram visitados. Em cada um deles foram coletadas 10 carcaças inteiras e 500g de rim e fígado oriundos dos frangos abatidos. A ocorrência de *Salmonella* spp. detectados pelo método convencional e pela PCR foi de 6,67% e 8,33% respectivamente, e os sorotipos identificados foram *S. Albany* e *S. Typhimurium*. A resistência das cepas de *Salmonella* spp. foi testada frente à 14 antimicrobianos de 9 classes diferentes e todas as cepas apresentaram perfil de multirresistência a pelo menos 3 antibióticos testados. Um total de 44 antimicrobianos de 7 classes diferentes foram pesquisados nas amostras de peito, rim e fígado onde resíduos de Enrofloxacin e Tetraciclina foram detectados em frangos de apenas um dos estabelecimentos. No entanto, os resíduos detectados e quantificados estavam abaixo do Limite Máximo Residual preconizado pela legislação brasileira.

Palavras - chave: *Salmonella* spp., Frango, Resistência, Resíduos, Antibióticos

ABSTRACT

The broiler is an important reservoir of *Salmonella* spp. and participates in the epidemiological chain as a source of infection for humans. The indiscriminate use of antimicrobials in poultry industry raises the possibility that residues are present in chicken and may promote the selection of resistant pathogens increasing the selection of *Salmonella*'s strains resistance to several antibiotics. Therefore, the present study aimed to investigate the presence of *Salmonella* spp. in broiler slaughtered in the State of Rio de Janeiro, evaluate the resistance of isolated strains and to research and quantify antimicrobial residues by Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometer (HPLC - MS / MS). We visited six slaughterhouses. In each, we collected 10 whole carcasses and 500g of kidney and liver derived from slaughtered broiler. The occurrence of *Salmonella* spp. detected by the conventional method and PCR was 6.67% and 8.33% respectively, and the serotypes detected were *S. Typhimurium* and *S. Albany*. The resistance of the *Salmonella*'s strains was tested against 14 antimicrobials of nine different classes and all strains showed multidrug resistance profile at least three antibiotics tested. We also investigated Forty-four antimicrobials of seven different classes in samples of breast, kidney and liver. Tetracycline and Enrofloxacin residues were detected in only one of the slaughterhouse. However, the detected and quantified residues level were below the Maximum Residue Limit established by Brazilian legislation.

Keywords: *Salmonella* spp., Broiler, Antibiotics resistance and residues.

1 INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira emprega mais de 4,5 milhões de pessoas, direta e indiretamente, e responde por quase 1,5% do Produto Interno Bruto (PIB) nacional. O setor é representado por milhares de produtores integrados, centenas de empresas beneficiadoras e dezenas de empresas exportadoras. Nas exportações, o Brasil mantém, desde 2004, a posição de maior exportador mundial, tendo terminado 2009 com a marca de 3,6 milhões de toneladas embarcadas para mais de 150 países (UBABEF, 2012).

O uso de antimicrobianos em produção animal, de forma terapêutica, preventiva e promotora de crescimento, especialmente na avicultura industrial, trouxe inúmeras vantagens, como o aumento da produtividade e melhora da conversão alimentar, promovendo o barateamento do custo dos produtos avícolas para o consumidor, redução do período de criação para o mercado e diminuição da incidência de patologias nos animais. Entretanto a utilização de antibióticos, de maneira excessiva e descontrolada na produção animal intensiva, tem desencadeado o aumento do número de microrganismos resistentes, os quais podem ser disseminados não somente para os alimentos mas também para o solo e mananciais aquáticos.

É crescente o interesse pelas questões relativas à saúde do consumidor associadas à ingestão de antimicrobianos através do consumo de produtos de origem animal. As possíveis relações entre o uso de antimicrobianos em medicina veterinária e o desenvolvimento de resistência bacteriana devem ser avaliadas dentro de dois enfoques: pelos possíveis efeitos do contato da microbiota intestinal humana com resíduos de antibióticos e pelo aparecimento de cepas resistentes aos antimicrobianos em alimentos derivados de animais tratados com os mesmos. Sob esse segundo enfoque, trabalhos recentes vêm demonstrando a presença da *Salmonella* spp. entre as bactérias que mais demandariam preocupação, por serem patogênicas para o homem e frequentemente encontradas no trato intestinal das aves, sendo um possível risco potencial de disseminação através da contaminação da carne desses animais durante o abate.

O controle de resíduos é uma exigência cada vez mais crescente do comércio internacional de produtos agropecuários. Dessa forma, o Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes (PNCRC) se constitui em uma ferramenta

de “Gerenciamento de Risco” com o objetivo precípua de promover a garantia da qualidade do sistema de produção de alimentos de origem animal ao longo das cadeias produtivas (BRASIL, 1999).

O consumo de produtos de origem animal, especialmente a carne de frangos abatidos sob o Serviço de Inspeção Estadual (S.I.E) dos diversos estados da federação, representa uma grande parte do mercado consumidor de carnes no país. Nesse aspecto, o controle de resíduos de medicamentos veterinários, principalmente de antibióticos na carne desses animais, é extremamente importante para a saúde do consumidor. Portanto, torna-se relevante um estudo sobre a presença e a quantificação desses medicamentos, uma vez que o PNCRC é um plano de controle aplicado e executado somente em Produtos de Origem Animal inspecionados pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Pesquisar resíduos de antimicrobianos em rins, fígado e peito de frangos de corte abatidos em abatedouros sob Inspeção Estadual no Estado do Rio de Janeiro. Verificar a presença de *Salmonella* spp. na carcaça desses animais e avaliar a resistência, frente a antimicrobianos, das cepas isoladas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Isolar e identificar cepas de *Salmonella* spp. a partir de carcaças de frangos de corte abatidos em abatedouros sob Inspeção Estadual (S.I.E) do Estado do Rio de Janeiro.
- b) Utilizar a Reação em Cadeia da Polimerase como método complementar de detecção de *Salmonella* spp. comparando sua eficiência com o método convencional de isolamento.
- c) Avaliar o perfil de sensibilidade das cepas de *Salmonella* spp. frente a antimicrobianos pelo Teste de Difusão em Disco.
- d) Investigar e quantificar a presença de resíduos através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência associada a Espectrometria de Massas (CLAE -EM/EM) em fígado, rins e peito de animais abatidos sob Inspeção Estadual (S.I.E) do Estado do Rio de Janeiro.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA *SALMONELLA* SPP.

O gênero *Salmonella* foi nomeado como tal em homenagem ao bacteriologista Daniel E. Salmon em 1885 (HOLT et al., 1994; GAST, 2003). Pertence à família *Enterobacteriaceae*, cresce sob temperaturas entre 8°C e 45°C, em pH de 4,0 a 8,0 e não resiste a temperaturas superiores a 70°C (OPAS, 2003). Apresenta-se como bacilos Gram negativos em esfregaços corados pelo método de Gram. Não produz esporos, é anaeróbio facultativo e não fermenta lactose, ao contrário da maioria das espécies da família *Enterobacteriaceae* (HOLT et al., 1994). Todavia, algumas salmonelas podem ser fermentadoras de lactose, a partir da aquisição de plasmídeos transportadores de genes codificadores de enzimas que permitem a fermentação da lactose (plasmídeos lac+), e produzem colônias lactose positivas (CAMPOS, 2005). Outra característica peculiar da família *Enterobacteriaceae* e, portanto, das *Salmonellas*, é a capacidade de reduzir nitratos a nitritos e produzirem gás a partir da fermentação da glicose. A maioria é móvel, por meio de flagelos peritríquios, com exceção de *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, que são imóveis (HOLT et al., 1994). Os sorotipos móveis são usualmente descritos como salmonelas paratíficas (GAST, 2003).

Levantamentos epidemiológicos realizados em vários países citam as Salmonelas entre os agentes patogênicos mais frequentes encontrados em surtos de toxinfecção de origem alimentar, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (ACHA et al.; SZYFRES et al., 1986). Em trabalho conduzido no Rio Grande do Sul, foi verificada a ocorrência de surtos de salmonelose em 99 relatórios de investigação onde a salmonelose correspondeu a 74,7% dos surtos (NADVORNY et al., 2004). No Estado do Rio de Janeiro, em estudo de 53 surtos que acometeram 461 pessoas, a *Salmonella* spp. foi responsável por 7% e atingiu maior número de indivíduos (15,8%), inclusive levando à um óbito (FERNANDEZ et al., 2001).

O padrão de nomenclatura atualmente melhor aceito é o proposto por Kauffmann-White, padrão também adotado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (SILVA et. al., 2000). Após várias alterações na taxonomia de *Salmonella*

spp., a classificação atual divide o gênero em *S. enterica* e *S. bongori*. A *S. enterica* é subdividida em seis subespécies, a saber: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* and *S. enterica* subsp. *indica* (HOLT et al., 1994). Até a presente data, já foram identificados 2579 sorotipos de *Salmonella* spp. Destas, 2557 pertencem à espécie *Salmonella enterica* e apenas 22 à *Salmonella bongori* (GRIMONT; WEILL, 2007). A subespécie *enterica* engloba os sorotipos clinicamente mais importantes para humanos e animais.

3.2 SALMONELOSE

A salmonelose é uma das doenças infecciosas mais comuns no mundo e uma das zoonoses mais problemáticas para a saúde coletiva, em função da elevada endemicidade e morbidade e pela dificuldade no controle (HOFER et al., 1997). Tem sido motivo de preocupação para todos os segmentos da sociedade, uma vez que é causadora da salmonelose humana e sua transmissão está relacionada principalmente ao consumo de alimentos de origem animal (OLIVEIRA.; CARVALHO, 2003). Pode ainda comprometer a sanidade dos rebanhos, gerando grandes prejuízos ao produtor pelos transtornos que causa, levando em algumas ocasiões, a cursos fatais (ROOF et al., 1992).

A doença nas aves pode ocorrer, muitas vezes, na forma clínica ou na manutenção do estado de portador assintomático, tornando-se fonte de disseminação da bactéria pelas fezes das aves infectadas ou por seus produtos contaminados para seres humanos, animais e ambiente (GAST, 2003; HOFER et al., 1997).

Hofer et al. (1997) afirmaram que a ocorrência de salmonelose decorre, na maioria dos países, do grande crescimento da indústria avícola, dentro da visão econômica típica de produção. Segundo Berchieri Júnior e Oliveira (2006), em virtude do desenvolvimento do setor industrial, a avicultura passou a produzir volumes muito superiores e em menor espaço de tempo e, para isto, foi preciso concentrar um número maior de aves por metro quadrado, o que favoreceu a instalação, multiplicação e disseminação de agentes patogênicos como a *Salmonella* spp.

Uma das principais infecções que comprometem a avicultura são as salmoneloses causadas por *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorotipos Pullorum, Gallinarum, Typhimurium, e Enteritidis. As duas primeiras são sorotipos espécie-específicas, ou seja, acometem apenas as aves, enquanto as demais acometem aves e seres humanos. Os sorotipos Gallinarum e Pullorum ocasionam perdas de produção na indústria avícola, causando a diminuição no desempenho e até morte das aves. Já os sorotipos Typhimurium, e Enteritidis, são um problema para saúde pública pois consumidores de carne e ovos contaminados podem apresentar toxinfecções alimentares (BUCHALA et. al., 2006).

A mortalidade e a morbidade em ambas as salmoneloses aviárias (tíficas e paratíficas) são variáveis e são influenciadas pela idade, nutrição, manejo, doenças concomitantes e pela dose bacteriana (GAST et al., 2003). As perdas podem ser altas nos quadros graves, onde a consequência, em sua maioria, é a eliminação das aves infectadas (HOFER et al., 1997).

A maioria dos casos de salmonelose humana decorre do consumo de alimentos contaminados. Contudo, muitos pesquisadores concordam que a carne de frango e seus derivados são umas das mais importantes fontes de *Salmonella* spp. A ocorrência e a quantidade deste gênero presentes na carne de frango ao abate variam em função das condições de manejo na criação e com os cuidados higiênicos nas operações de abate e manipulação das carcaças (CARVALHO; CORTEZ, 2005).

O controle da *Salmonella* sp. na indústria avícola é oneroso devido à sua complexa epidemiologia, uma vez que galpões encontram-se contaminados por bactérias trazidas por pintos de um dia ou remanescentes de lotes anteriores, o que favorece a contaminação de carcaças de forma indireta (BONI et. al., 2011).

Lopes et. al. (2007) mostraram que a contagem de microrganismos em abatedouros não diminuiu após a passagem das carcaças pelos tanques, na água do *pre-chiller* e *chiller*. Isso demonstra a necessidade de novos estudos para a redução da contaminação de carcaças por *Salmonella* sp. e a fiscalização de abatedouros, visando averiguar irregularidades na higienização de equipamentos e nos procedimentos de abate, os quais são fontes de contaminação. Conforme Boni et al., (2011) aproximadamente 11% das carcaças de frango são contaminadas por *Salmonella* sp. Devido a este elevado resultado faz-se necessário um programa sanitário específico para o controle da *Salmonella* sp., pois a maioria dos sorotipos

são potencialmente patogênicos ao homem (TESSARI et. al., 2008). Nesse aspecto, o MAPA criou o Programa de Redução de Patógenos (PRP), cujo objetivo é implementar a análise laboratorial sistemática e contínua de carcaças de frangos e perus *in natura*, para pesquisa de *Salmonella* spp, envolvendo todos os estabelecimentos de abate registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF). (BRASIL, 2003).

A principal via de infecção para aves e humanos é a oro fecal. Quando há ingestão de *Salmonella sp.*, ela sofrerá ação da imunidade inata, em que ocorre a ação de pH estomacal, motilidade intestinal, e ação da micriobiota do trato intestinal. Passando esta primeira barreira, a bactéria inicia rapidamente a colonização do trato intestinal e se liga a células hospedeiras (WRAY E WRAY, 2003). A adesão da bactéria à parede intestinal depende de diversos fatores de associação, como: lipopolissacarídeos (LPS), flagelos, fímbrias e proteína de membrana externa, porém o papel destes fatores na patogênese permanece controverso (MIZUMOTO et al., 2005).

Os sintomas da salmonelose no homem são inespecíficos e surgem em 12 a 14 horas após a ingestão do alimento contaminado e geralmente são caracterizados por náuseas, vômitos, dores abdominais, cefaleia, calafrios e diarreia. Os sintomas podem também ser acompanhados por fraqueza, fadiga muscular e febre. A taxa de mortalidade, em média, é de 4,1%, sendo de 5,8% durante o primeiro ano de vida e 15% em pessoas acima de 50 anos (JAY, 2005). A salmonelose geralmente tem cura espontânea e a recuperação clínica se dá em até quatro dias, no entanto, o indivíduo portador convalescente pode eliminar a bactéria por semanas ou até por alguns meses (OPAS, 2003).

Na avicultura a salmonelose geralmente não é tratada, pois os gastos com antibióticos são elevados e desnecessários, associado a isso, também há a desvantagem da resistência aos antibióticos por parte da bactéria. No homem, o tratamento com antimicrobianos geralmente não é indicado, pois prolonga o período de eliminação da bactéria pelas fezes e pode determinar o aparecimento de cepas multirresistentes. Contudo, o tratamento pode ser indicado nos casos de salmoneloses com complicações sistêmicas e na febre tifoide (CAMPOS, 2005).

3.3 MICROBIOLOGIA CONVENCIONAL

A microbiologia convencional utiliza para o diagnóstico: isolamento, identificação bioquímica e caracterização antigênica. Para o isolamento e identificação de *Salmonella* spp são necessárias as etapas de pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo em meios líquidos, isolamento e seleção de colônias suspeitas em meios sólidos e sorologia. No isolamento em meio sólido, alguns meios de cultivo, dentre os vários disponibilizados pelos laboratórios, são indicados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA): o ágar Hektoen, ágar Rambach, MacConkey, verde brilhante suplementado com novabiocina, e o XLT4 (chamado de ágar xilose lisina tergitol 4) (BRASIL, 2003). Além de seletivos, esses meios são diferenciais, porque as bactérias se multiplicam formando colônias com diferentes características. Nas etapas de detecção, os testes bioquímicos utilizados apresentam características que nos permitem observar a mudança de pH e alteração de coloração dos meios de cultura, quando houver crescimento bacteriano.

O meio *Sulphur Indol Motility* (SIM) determina se os microrganismos têm motilidade ou não, sendo positivo para a maioria das Salmonelas. Na presença de *Salmonella* spp. o meio *Triple Sugar Iron* (TSI) apresenta bisel alcalino com produção de gás positiva ou negativa e o meio *Lysine Iron Agar* (LIA) mostra-se alcalino na base com ou sem presença de gás H₂S. O caldo ureia apresenta reação de urease-negativa para a presença de *Salmonella* spp. A interpretação dos resultados dos testes é realizada após a incubação a 37°C por 24 horas. As colônias que apresentarem a leitura dos testes bioquímicos preliminares compatíveis com *Salmonella* spp. passam pela caracterização bioquímica definitiva com testes para utilização do citrato e malonato, desidrolação da arginina, transformação da fenilalanina, descarboxilação da lisina e ornitina, fermentação de carboidratos, prova de Voges-Proskauer e prova do vermelho de metila. Após a confirmação do perfil esperado para *Salmonella* spp., prossegue-se a caracterização antigênica com soro antissomático O polivalente de *Salmonella* spp. (ANDRADE et al., 2010).

A microbiologia convencional, no entanto, possui uma grave desvantagem, pois embora seja um método bastante barato e que não requer nenhuma infraestrutura sofisticada, é bastante trabalhosa, exige uso de grandes volumes de reagentes e meios de cultura sólidos além de englobar numerosos processos de

operacionalização e coleta de dados. Enfim, a demora do resultado das análises e a necessidade de muita mão de obra levou durante as últimas décadas, ao interesse pela busca de métodos mais rápidos de diagnóstico (JASSON et al., 2010).

3.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase tem sido aplicada com sucesso para detectar patógenos de origem alimentar, principalmente a *Salmonella*, a partir de diferentes produtos alimentares. (MANDRELL; WACHTEL, 1999). A rapidez na identificação de agentes etiológicos pela detecção do seu DNA, em comparação ao método bacteriológico, torna a PCR uma alternativa prática, além da sua alta sensibilidade e especificidade, dentre os métodos de diagnóstico das salmoneloses. (GOUVÊA, 2008). Desde a criação dessa técnica, vários protocolos já foram descritos para a detecção de *Salmonella* spp. Dentre os pioneiros e mais citados estão os trabalhos dos autores Rahn et al. (1992), Aabo et al. (1993) e Jones et al. (1993). O primeiro desenvolveu protocolo de detecção de *Salmonella* spp. baseado na amplificação de uma região do gene *invA*, que está envolvido na transcrição de proteínas relacionadas à invasão celular, utilizando o par de *primers* 139/141. O segundo desenhou oito oligonucleotídeos a partir de um fragmento cromossomal de *Salmonella* spp. Após testes de hibridização, o par de *primers* ST11/ST15 foi selecionado como o mais eficiente. O último testou protocolo de PCR para detecção de *Salmonella* spp. em ostras, e utilizaram como alvo da amplificação uma região do gene *hns*, que codifica uma proteína de ligação ao DNA. Os primers testados, LHNS-531 e RHNS-682, resultavam em um produto de 152 pb.

O método convencional de PCR, apesar de mais rápido do que a metodologia microbiológica tradicional, ainda demanda espaço e trabalho pós-amplificação, com a eletroforese em gel e análise. No entanto, várias técnicas foram desenvolvidas para aprimorar a PCR e aumentar ainda mais a velocidade de análise. Entre elas estão o sistema automatizado BAX PCR (Dupont Qualicon, EUA) no qual as culturas são adicionadas a tubos contendo os reagentes de PCR liofilizados, incluindo DNA Polimerase, desoxirribonucleotídeos, *primers*, controle interno positivo e o corante fluorescente SybrGreen. Após a amplificação, o sistema automatizado começa a fase de detecção, no qual o sinal fluorescente é mensurado,

e uma curva é gerada e interpretada pelo software. Com o desenvolvimento dos ensaios fluorogênicos automatizados de PCR, tornou-se possível o monitoramento em tempo real das amplificações (PCR em Tempo Real), levando à capacidade de quantificar a concentração de DNA inicialmente presente na amostra. (ALMEIDA et al., 2012).

3.5 O USO DE ANTIMICROBIANOS NA AVICULTURA INDUSTRIAL

As justificativas para o uso de antimicrobianos em veterinária são: promoção do bem-estar animal, prevenção da propagação epidêmica de doenças infecciosas, melhora da eficácia da produção animal, prevenção da transferência de zoonoses e segurança dos produtos de origem animal. Assim, os antimicrobianos são fármacos vitais em medicina veterinária e dificilmente podem ser substituídos se não existirem alternativas viáveis (UNGEMACH et al., 2006). Basicamente, os principais propósitos são para uso terapêutico, uso preventivo e principalmente como promotores de crescimento (TYLOVA et al., 2010).

A administração de antimicrobianos na avicultura promove o barateamento final do produto para o consumidor, pois causa o encurtamento dos dias de abate dos animais, fazendo com que haja mais ciclos produtivos por unidade de tempo, e diminuindo o desperdício com perdas de animais por motivo de doença (GÓRNIAK ; SPINOSA, 2007).

Muitos dos antimicrobianos não são plenamente metabolizados no organismo animal, sendo excretados na urina e nas fezes, tanto na forma do composto original ou já parcialmente metabolizados (HALLING-SORENSEN et al. ; NIELSEN et al., 1998). Nesse sentido, a utilização das fezes de aves para fins de adubação acaba sendo uma via de disseminação desses compostos no ambiente (CHRISTIAN et al., 2003). Uma vez no ambiente, os resíduos de antibióticos podem acumular-se no solo, sofrer lixiviação ou, ainda, ser transportados, via escoamento superficial, para os corpos hídricos (DÍAZ-CRUZ et al., 2003).

Atualmente, o uso de antibióticos como aditivos encontrou crescente resistência de grupos na sociedade preocupados com fatores como indução de resistência ou contaminação ambiental. A partir dessas pressões, a Comunidade Europeia banuiu o uso de antibióticos como promotores de crescimento a partir de

2005 (SOBESTIANSKY, 2007). No Brasil, INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 26, DE 9 DE JULHO DE 2009 da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), já havia determinado que as penicilinas, as tetraciclina e as sulfonamidas sistêmicas, fossem evitadas como aditivos alimentares e/ou promotores de crescimento, restringindo seu uso à terapêutica.

Diante desse cenário, o principal desafio da produção avícola hoje se refere à busca de um equilíbrio entre a microbiota e o hospedeiro. Esse equilíbrio baseia-se na presença de microrganismos benéficos ao animal e que não façam competição com o hospedeiro por nutrientes ou estejam envolvidos em toxinfecção em seres humanos. As principais alternativas que têm sido pesquisadas incluem pré-bióticos, pró-bióticos, enzimas, ácidos orgânicos e extratos vegetais como forma alternativa ao uso de antimicrobianos promotores de crescimento. (PICKLER *et al.*, 2011).

3.6 RESISTÊNCIA DA *SALMONELLA* SPP FRENTE A ANTIMICROBIANOS

O uso extensivo e a administração de doses subterapêuticas de antimicrobianos na alimentação de frangos de corte podem contribuir com o aumento da prevalência de bactérias resistentes a diversos antimicrobianos tanto em humanos quanto em medicina veterinária (PESSANHA; GONTIJO 2001). Essas bactérias podem se espalhar através da contaminação alimentar e grandes quantidades de genes de resistência podem ser trocados por transferência de plasmídeos para outros patógenos humanos, reduzindo cada vez mais o efeito de antimicrobianos no tratamento das doenças causadas por esses agentes (HASMAN *et al.*, 2005).

Os mecanismos pelos quais as bactérias produzem resistência a drogas antibacterianas incluem a produção de enzimas, que destroem ou inativam as drogas, e a redução da permeabilidade das células bacterianas. As bactérias também podem desenvolver rotas metabólicas alternativas para substituir aquelas inibidas pelas drogas. Os antibióticos podem ser eliminados da célula, ou o local de ação da droga pode ser estruturalmente alterado. A alteração do local de ação e a destruição enzimática do agente antimicrobiano são provavelmente os mecanismos mais comuns pelos quais a resistência pode ocorrer (QUINN *et al.*, 2005).

Tamanha a importância desse fato e devido à falta de estudos envolvendo a prevalência de *Salmonella* spp. resistente a antimicrobianos na avicultura, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA criou o Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência da Resistência Bacteriana em Frango. Nesse estudo um total de 2679 carcaças provenientes de 15 estados diferentes foram analisadas na tentativa de isolar *Salmonella* spp. e determinar a prevalência e a resistência antimicrobiana das cepas isoladas. Em um total de 250 cepas isoladas, todas apresentaram resistência a um ou mais antibióticos testados sendo, que mais de 50% apresentou resistência a mais de três antibióticos, simultaneamente (MEDEIROS et al.,2011).

Em Pelotas, Rio Grande do Sul, realizou-se análise em 120 amostras de produtos de frango. A prevalência de *Salmonella* spp. foi de 15,83%, e 86,8% dos isolados foram resistentes ao ácido nalidíxico e 65,8% foram resistentes à tetraciclina. Foram encontrados cinco (13,2%) isolados multirresistentes (CONCEIÇÃO et al., 2007).

3.7 RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS NA CARNE DE FRANGO

A presença de resíduos de antibióticos em produtos de origem animal tem potencial para ocasionar diferentes reações na saúde humana, dentre elas a ocorrência de episódios de hipersensibilidade, mutagenicidade, e modificações na microbiota normal e, no caso das tetraciclinas, reações de fotossensibilização (BRITO; PORTUGAL, 2003).

Quando se usa uma medicação rotineira envolvendo um grupo ou mesmo lotes inteiros de animais próximos à idade de abate, deve-se ter a preocupação com os resíduos que poderiam eventualmente permanecer nos gêneros alimentícios produzidos. Por isso, a noção dos períodos de carência para cada antimicrobiano usado deve ser conhecido e obedecido pelos médicos veterinários responsáveis pela elaboração do programa de medicação (SOBESTIANSKY, 2007).

Entende-se por período de carência, o tempo requerido para que o resíduo do medicamento em questão atinja uma concentração segura, de acordo com os níveis de tolerância estabelecidos por especialistas. Também pode-se referir ao

intervalo de tempo exigido para que se retire o medicamento antes do abate (BOOTH; MC DONALD, 1992).

Considerando a possibilidade de que resíduos de medicamentos presentes em produtos de origem animal venham a causar efeitos adversos à saúde humana, foram estabelecidos níveis de tolerância após estudos. No Brasil, é competência do MAPA estabelecer estes valores, considerando-se as recomendações do *Codex Alimentarius* da *Food and Agriculture Organization* (FAO). Assim, através da Instrução Normativa 8 de 29 de abril de 2010, o MAPA determina o Limite Máximo Residual (LMR) de diferentes antimicrobianos em diferentes produtos de origem animal (BRASIL, 2010).

Em relação ao efeito do resíduo de antibióticos sobre a carne, a maioria das drogas utilizadas como promotores de crescimento podem exercer diferentes alterações sobre a qualidade da carne (LONE et al., 1997). A carne tende a se tornar mais dura por causa do aumento da produção de tecido conjuntivo, das ligações cruzadas de fibras colágenas assim como a fração das proteínas insolúveis intramusculares. Além disso, esses resíduos também podem exercer um efeito inibitório contra as enzimas proteases das fibras musculares responsáveis pela degradação proteica e maturação durante a resolução do *rigor mortis*, o que interfere na maciez da carne (MOLONEY et al., 1991).

3.8 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA AO ESPECTÔMETRO DE MASSAS (CLAE -EM/EM).

O grande avanço na cromatografia em coluna foi o desenvolvimento e a utilização de suportes com partículas diminutas responsáveis pela alta eficiência, as quais tornam necessário o uso de bombas de alta pressão para a eluição da fase móvel, devido a sua baixa permeabilidade. A figura 1 a seguir, mostra um esquema de equipamento típico de CLAE (DEGANI et al., 1998).

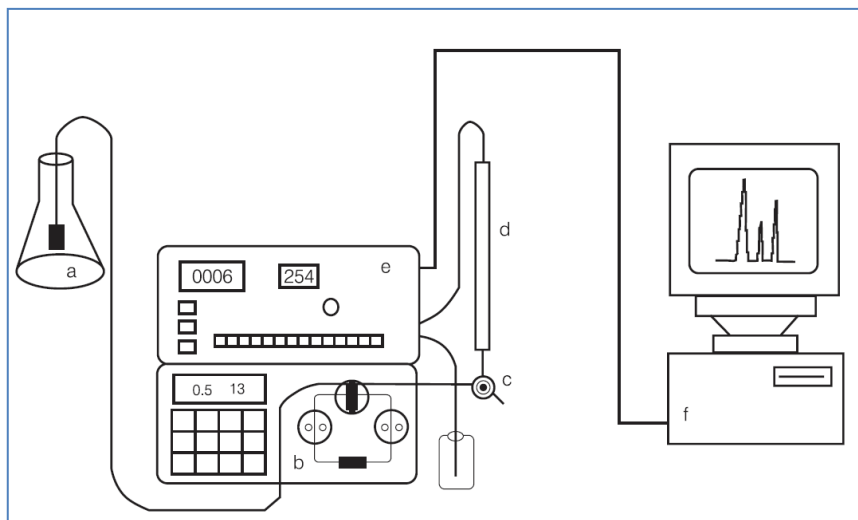


Figura 1. Equipamento típico de CLAE. a) reservatório da fase móvel; b) bomba de alta pressão; c) válvula de injeção; d) coluna; e) detector e f) registrador.

As fases móveis utilizadas em CLAE devem possuir alto grau de pureza e estar livres de oxigênio ou outros gases dissolvidos, sendo filtradas e degaseificadas antes do uso. A bomba deve proporcionar ao sistema vazão contínua sem pulsos e com alta reprodutibilidade, possibilitando a eluição da fase móvel a um fluxo adequado. As válvulas de injeção usadas possuem uma alça de amostragem para a introdução da amostra com uma seringa e duas posições, uma para o preenchimento da alça e outra para sua liberação para a coluna. Existem alças de diversos volumes, sendo utilizadas geralmente alças na faixa de 5-50 mL para injeções analíticas e 0,5- 2 mL para preparativas. As colunas utilizadas em CLAE são geralmente de aço inoxidável, com diâmetro interno de cerca de 0,45 cm para separações analíticas e na faixa de 2,2 cm para preparativas. O comprimento é variável, sendo comuns colunas analíticas de 10-25 cm e preparativas em torno de 25-30 cm. Essas colunas são reaproveitáveis, sendo empacotadas com suportes de alta resolução, não sendo necessária sua regeneração após cada separação (DEGANI, 1998).

O acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens da cromatografia (alta seletividade e eficiência de separação) com as vantagens da espectrometria de massas (obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional da seletividade) (VÉKEY, 2001).

A Espectrometria de Massas acoplada à Espectrometria de Massas (EM-EM) é a técnica espectrométrica que, ao invés de utilizar apenas um analisador de

massas para separar os íons de mesma razão m/z gerados na fonte de ionização, utiliza dois estágios de espectrometria de massas (MS1 e MS2), em que um deles é usado para isolar o íon de interesse e o outro é usado para estabelecer uma relação entre este íon de interesse isolado e outros íons que foram gerados a partir da sua decomposição induzida. Esta técnica é amplamente empregada na detecção de compostos presentes em baixas concentrações em matrizes complexas, uma vez que possibilita um aumento na detectabilidade e reduz a interferência espectral de compostos presentes na matriz, além de aumentar a quantidade de informação estrutural que se pode obter (ARDREY, 2003)

Agências de saúde pública em muitos países se baseiam em detecção por espectrometria de massa, o qual, sendo um detector específico, permite a confirmação inequívoca de contaminantes em alimentos. A Decisão da Comissão 2002/657/EC afirma que métodos baseados apenas em análise cromatográfica sem a detecção por espectrometria molecular não são adequados para utilização como métodos de confirmação (EUROPEAN COMMISSION, 2010).

Comparado com métodos cromatográficos mais antigos baseados no uso de detectores convencionais, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada ao Espectrometro de Massas, em especial o analisador de massas Triplo Quadro Polo (QQQ) MS, é hoje a técnica de escolha no campo da análise de resíduos antimicrobianos em alimentos de origem animal por ser capaz de fornecer informações preciosas sobre a identidade de um composto específico (BOGIALLI; DI CORSIA, 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

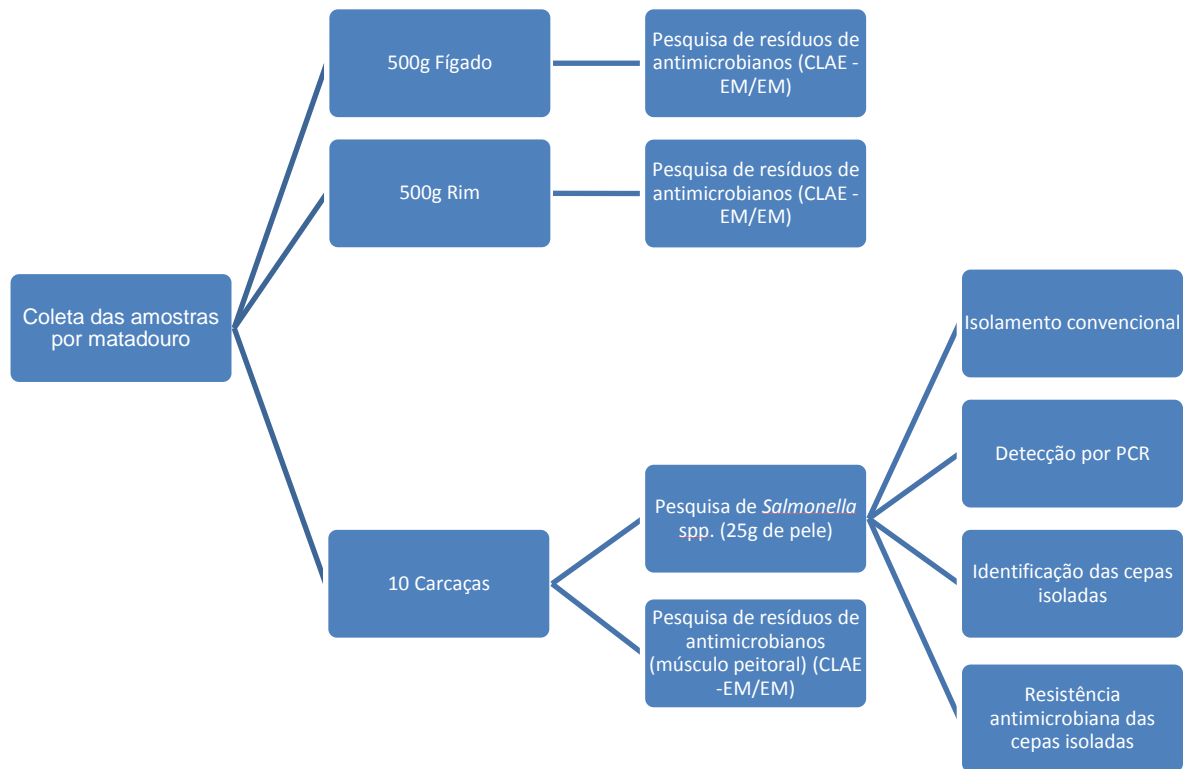


Figura 2. Fluxograma geral do experimento apresentando as análises das amostras coletadas em matadouros frigoríficos do Estado do Rio de Janeiro.

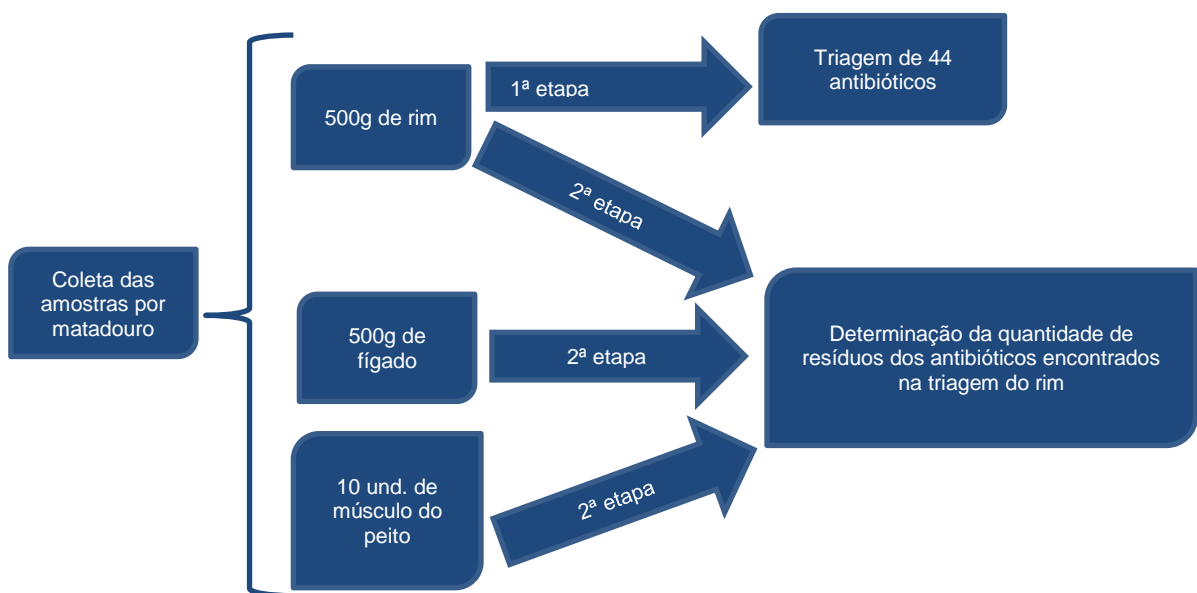


Figura 3. Fluxograma da detecção de resíduos de antimicrobianos por CLAE - EM/EM apresentando os procedimentos analíticos realizados nas amostras coletadas em matadouros frigoríficos do Estado do Rio de Janeiro.

4.2 AQUISIÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram coletadas amostras de rim e de fígado e carcaças de frangos de corte abatidos em diversos matadouros de aves do Estado do Rio de Janeiro. Em cada matadouro, obteve-se 10 carcaças além de porções de 500g de fígado e de rim oriundos dessas carcaças e de outras do mesmo momento do abate. Um total de 6 estabelecimentos diferentes foram utilizados para o desenvolvimento desse experimento resultando em 60 amostras para pesquisa de *Salmonella* spp. e 6 amostras para pesquisa de resíduos de antimicrobianos. Os rins foram coletados antes da sucção das vísceras não comestíveis enquanto que o fígado, logo após a saída do chiller de vísceras comestíveis. As amostras foram coletadas com uso de luvas estéreis e armazenadas em frascos plásticos estéreis devidamente identificados, acondicionados em gelo durante o transporte para serem processados no Laboratório de Doenças Infecciosas e Sanidade Avícola, ambos da Universidade Federal Fluminense. As amostras de rim, fígado e músculo peitoral foram congeladas a -20°C para posterior pesquisa de resíduos de antimicrobianos no Laboratório de Resíduos e Medicamentos Veterinários do LANAGRO/MG/MAPA.

4.3 ANÁLISES

4.3.1 Detecção de *Salmonella* spp. pelo método convencional

O isolamento de *Salmonella* spp. foi baseado na Instrução Normativa nº 62, modificada, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003).

Na etapa de pré-enriquecimento das amostras, 25 ± 0,2 g de porções de pele de peito, da cloaca e do pescoço (± 8g de cada) foram adicionados em 225 mL de solução salina 1% peptonada, em saco plástico esterilizado. A homogeneização da mistura foi feita por aproximadamente 60 segundos no “stomacher” (“Stomacher 80 Laboratory Blender Seward”). Em seguida as amostras foram incubadas a 36 ± 1°C por 16 a 20 horas.

Na etapa seguinte, para o enriquecimento seletivo, alíquotas de 0,1 mL das amostras pré-enriquecidas foram transferidas para tubos contendo 10 mL de Caldo

Rappaport Vassiliadis (Himedia) e 1,0 mL para tubos contendo 10 mL de caldo Selenito-Cistina (Micromed) (Figura 4). Os tubos foram incubados a $41 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, em banho-maria, com agitação mecânica por 24 horas.



Figura 4. Tubos contendo Selenito - Cistina e Rappaport Vassiliadis inoculados com 1mL e 0,1mL de amostras pré- enriquecidas, respectivamente. Laboratório de Sanidade Avícola da Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2013.

Para o isolamento das colônias, foi realizado o plaqueamento nos meios sólidos Ágar Bile Peptona Lactose Sacarose (BPLS) (Himedia) e Ágar *Salmonella* Diferencial (SD) (Himedia), a partir dos caldos seletivos de enriquecimento. Todas as placas foram incubadas a $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas.

Após o período de incubação, foram selecionadas de duas a cinco colônias suspeitas por amostra, conforme características de coloração e morfologia compatíveis com *Salmonella* spp., ou seja, translúcidas em BPLS (Figura 5) e róseas em SD (Figura 6), sendo realizadas provas bioquímicas posteriormente para confirmação.

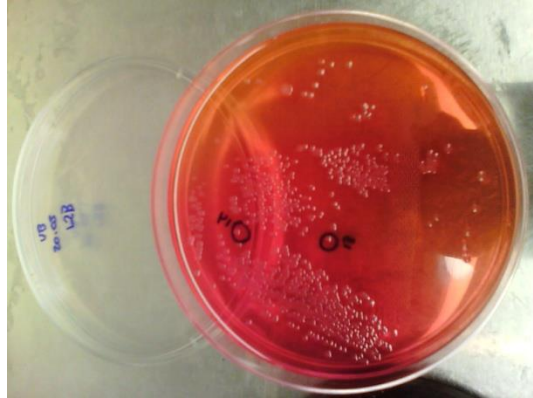


Figura 5. Colônias translúcidas com morfologia compatível com *Salmonella* spp selecionadas do meio Ágar Bile Peptona Lactose Sacarose para realização de provas bioquímicas. Laboratório de Sanidade Avícola da Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2013.

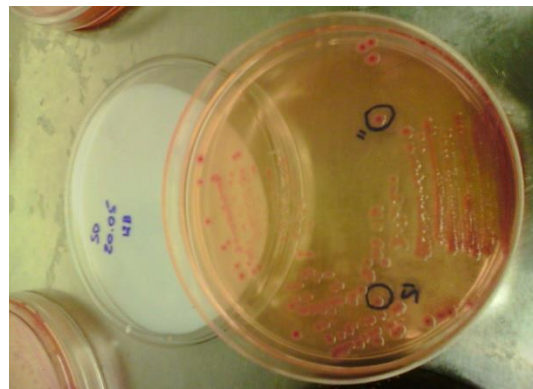


Figura 6. Colônias róseas com morfologia compatível com *Salmonella* spp selecionadas do meio Ágar *Salmonella* Diferencial para realização de provas bioquímicas. Laboratório de Sanidade Avícola da Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2013.

As colônias selecionadas foram submetidas à triagem sendo inoculadas em Agar Três-Açúcar-Ferro (“Triple Sugar Iron”. TSI - HIMEDIA® M021) e Agar-Lisina-Ferro (“Lisine Iron Agar” - LIA, HIMEDIA® M377) e incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas. As cepas que apresentaram características compatíveis com o gênero *Salmonella* (inclinação vermelha, base amarela e formação de H_2S no Ágar TSI e base e inclinação violetas com formação de H_2S no Ágar LIA) (Figura 7), foram adicionalmente semeadas para confirmação em Agar Sulfeto Indol Motilidade (SIM), Ágar Fenilalanina e Ágar Citrato de sódio nas mesmas condições.

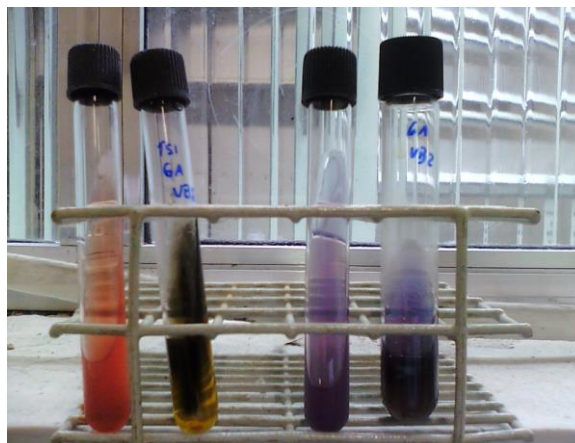


Figura 7. Cepas que apresentaram características compatíveis com o gênero *Salmonella* em Ágar TSI e Ágar LIA. Esquerda para direita: TSI antes da incubação, TSI após incubação, LIA antes da incubação, LIA após inoculação. Laboratório de Sanidade Avícola da Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2013.

As cepas compatíveis bioquimicamente (sem produção de indol, com formação de H_2S e com motilidade no meio SIM, sem desaminação de fenilalanina no meio Ágar Fenilalanina e com utilização do citrado (+) no meio Ágar Citrato de Sódio), foram semeadas em Ágar Nutriente e incubadas em estufa bacteriológica a $36^\circ C$ durante 24 horas, para posterior realização da prova sorológica com antissoro polivalente "O" (Probac do Brasil®) contra *Salmonella* spp.

As amostras que reagiram ao antissoro formando grumos foram separadas, identificadas e enviadas ao Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro, para confirmação e identificação do sorotipo.

4.3.2 Detecção de *Salmonella* spp. através da Reação em Cadeia da Polimerase

Alíquotas de 1,0 mL de cada amostra provenientes da SSP tamponada a 1%, foram congeladas após a etapa de pré-enriquecimento e posteriormente utilizadas para a realização da PCR. Para extração do DNA, foi realizado a técnica de tratamento térmico desenvolvida por Myint et al. (2006). O par de *primers* utilizados para a amplificação do DNA foi sintetizado com base nas sequências 5' GCCAACCATGCTAAATTGGCGCA 3' e 5' GGTAGAAATT CCCAGCGGGTACTGG 3' para o gene ST11 e ST15 (AABO et al., 1993) de *Salmonella* spp, que amplifica 429 pb. A reação foi composta de 4,4 μL de água para PCR, 5,0 μL de tampão 10x, 2 μL de amostra; 5,0 μL de $MgCl_2$ (50nM), 5,0 μL de dNTPmix (10nM), 0,4 μL de Taq polimerase (1U), 1,2 μL de BSA (400 $\mu g/ml$) e 1,0 μL de cada *primer* (100 pmol), em

um volume total de 25 µL. O ciclo de amplificação teve uma etapa de desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, pareamento a 54°C por 30 segundos e amplificação a 72°C por 30 segundos, com extensão final a 72°C por 7 minutos. O resultado da reação foi obtido por corrida eletroforética (90volts/90mah) em gel de agarose a 1,5% e visualização sob luz ultravioleta em transiluminador.

4.3.3 Perfil de Sensibilidade pelo Teste de Difusão em Disco

O teste de sensibilidade foi realizado empregando-se o teste de difusão em disco segundo o Manual de Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão do National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2003). Para o teste, o inóculo foi preparado em caldo Muller-Hinton (HIMEDIA®) seguindo-se a padronização da escala de Mc Farland (escala de 0.5) e semeado em placa com ágar de Muller-Hinton (HIMEDIA®). Para cada cepa de *Salmonella* isolada, foram testados os seguintes antibióticos: Gentamicina (10µg), Estreptomicina (10µg), Cefalotina (30µg), Ceftiofur (10µg), Espectinomicina (100µg), Amoxicilina (10µg), Bacitracina (10UI), Enrofloxacina (5µg), Ciprofloxacina (5µg), Norfloxacina (10µg), Cotrimoxazol (5µg), Tetraciclina (30µg), Doxiciclina (30µg), Clindamicina (2µg). Após a aposição dos discos, as placas foram incubadas a 37°C por 18 a 24 horas. Após este período, as placas foram analisadas através da medida dos halos de inibição em milímetros e a sensibilidade das cepas classificada como resistente, intermediária (sensibilidade parcial) ou sensível (ibid).

4.3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Espectrômetro de Massas (CLAE -EM/EM).

4.3.4.1 Triagem de resíduos de antibióticos por CLAE - EM/EM.

Foi realizada uma pesquisa por resíduos de 44 antibióticos de 7 classes diferentes utilizando-se um método de triagem de multirresíduos em rim de aves. Essa análise foi realizada no Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários (LRM/PL) do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO/MG/MAPA) localizado

em Pedro Leopoldo, Minas Gerais. O método utilizado foi validado baseado no *Community Reference Laboratory for Antimicrobial Residues, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFFSA), Laboratoire d'Etude et de Recherche sur les Médicaments Vétérinaires et les Désinfectants* (GAUGAIN-JUHEL et al., 2009). A validação interna atendeu aos requisitos da Decisão do *Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines* (EUROPEAN COMMISSION, 2010). O método de triagem multirresíduos permitiu avaliar a presença ou não de resíduos de antibióticos antes do encaminhamento da amostra para a análise pelo método de quantificação. Para que as amostras fossem encaminhadas para quantificação do resíduo (2ª etapa), eram necessárias duas condições. Primeiro, as amostras deveriam apresentar as duas transições monitoradas do analito e segundo, a área da transição mais intensa do analito deveria estar superior a área da concentração do controle positivo (limite inferior da triagem). A concentração do controle positivo durante a triagem e sua relação com o Limite Máximo Residual de cada antimicrobiano, os quais foram estabelecidos na validação do método, podem ser observados na tabela 1 a seguir:

Tabela 1. Concentração do controle positivo e sua relação com o Limite Máximo Residual utilizados na triagem dos 44 antibióticos analisados. LANAGRO/MG. Pedro Leopoldo, 2013.

Classe	Analitos	Limite Máximo Residual - LMR (ug/kg)*	Concentração do Controle Positivo (ug/kg)
Beta - lactâmicos	Amoxicilina	50	25
	Ampicilina	50	25
	Penicilina V	50	25
	Penicilina G	50	25
	Oxacilina	600	150
	Cloxacilina	600	150
	Nafcilina	600	150
	Dicloxacilina	600	150
Sulfonamidas	Sulfadiazina	100	50
	Sulfatiazol	100	50
	Sulfametazina	100	50
	Sulfametoxipiridazina	100	50
	Sulfadoxina	100	50
	Sulfaquinoxalina	100	50
	Sulfametazol	100	50
	Sulfaclopiridazina	100	50
	Sulfisoxazol	100	50
	Sulfadimetoxina	100	50
Sulfamerazina	100	50	
Macrolídeos	Tilmicosina	100	75
	Eritromicina	100	25
	Clindamicina	100	50
Tetraciclina	Oxitetraciclina	600	50
	Tetraciclina	600	50
	Clortetraciclina	600	50
	Doxiciclina	600	50

Classe	Analitos	Limite Máximo Residual - LMR (ug/kg)*	Concentração do Controle Positivo (ug/kg)
Fluorquinolonas	Norfloxacin	100	25
	Ciprofloxacin	100	25
	Enrofloxacin	100	25
	Sarafloxacin	100	25
	Ácido Oxolinico	100	25
	Ácido Nalidixico	100	25
	Flumequina	100	25
Aminoglicosídeos	Espectinomicina	500	250
	Estreptomycin	500	250
	Dihidroestreptomycin	500	250
	Amicacina	500	250
	Higromicina	500	250
	Apramicina	500	250
	Gentamicina	500	250
	Neomicina	500	250
	Tobramicina	500	250
	Kanamycin	500	250
Lincomycin	500	50	

* BRASIL (2010).

Procedimentos de Extração:

Antes de iniciar o procedimento de extração pesou-se $2,0 \pm 0,1$ gramas das amostras de rim em tubos de polipropileno que foram mantidas congeladas, em temperaturas inferiores a -10°C até o momento da análise. (Figura 8)



Figura 8. Pesagem e preparo das amostras de rim para procedimento de extração. LANAGRO/MG, Pedro Leopoldo, 2013.

Segundo Gaugain-Juhel et al. (2009), no campo de medicamentos veterinários, duas técnicas de extração são estabelecidas quando se deseja extrair de tecidos musculares. A primeira seria o uso da extração com acetonitrila para macrolídeos, sulfonamidas, penicilinas e cefalosporinas. A segunda seria o uso de uma extração ácida com ácido tricloroacético para os analitos dos grupos das quinolonas, aminoglicosídeos, lincosamidas e tetraciclina. Os detalhes do procedimento podem ser observados na cópia do protocolo de extração demonstrado pela figura 9 mais a diante. Como solução de padrão interno, presente em ambos os procedimentos de extração, foi utilizado o sulfafenazol. Sua escolha foi devido ao não uso do medicamento na rotina da prática veterinária. Para isso, foram diluídos 50 μL da solução estoque de sulfafenazol em um balão volumétrico de 50 mL. O volume foi ajustado com água destilada e deionizada (Milli-Q), resultando em uma concentração final de 1,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Esta solução é preparada mensalmente e conservada em freezer com temperatura controlada e mantida abaixo de -10°C .

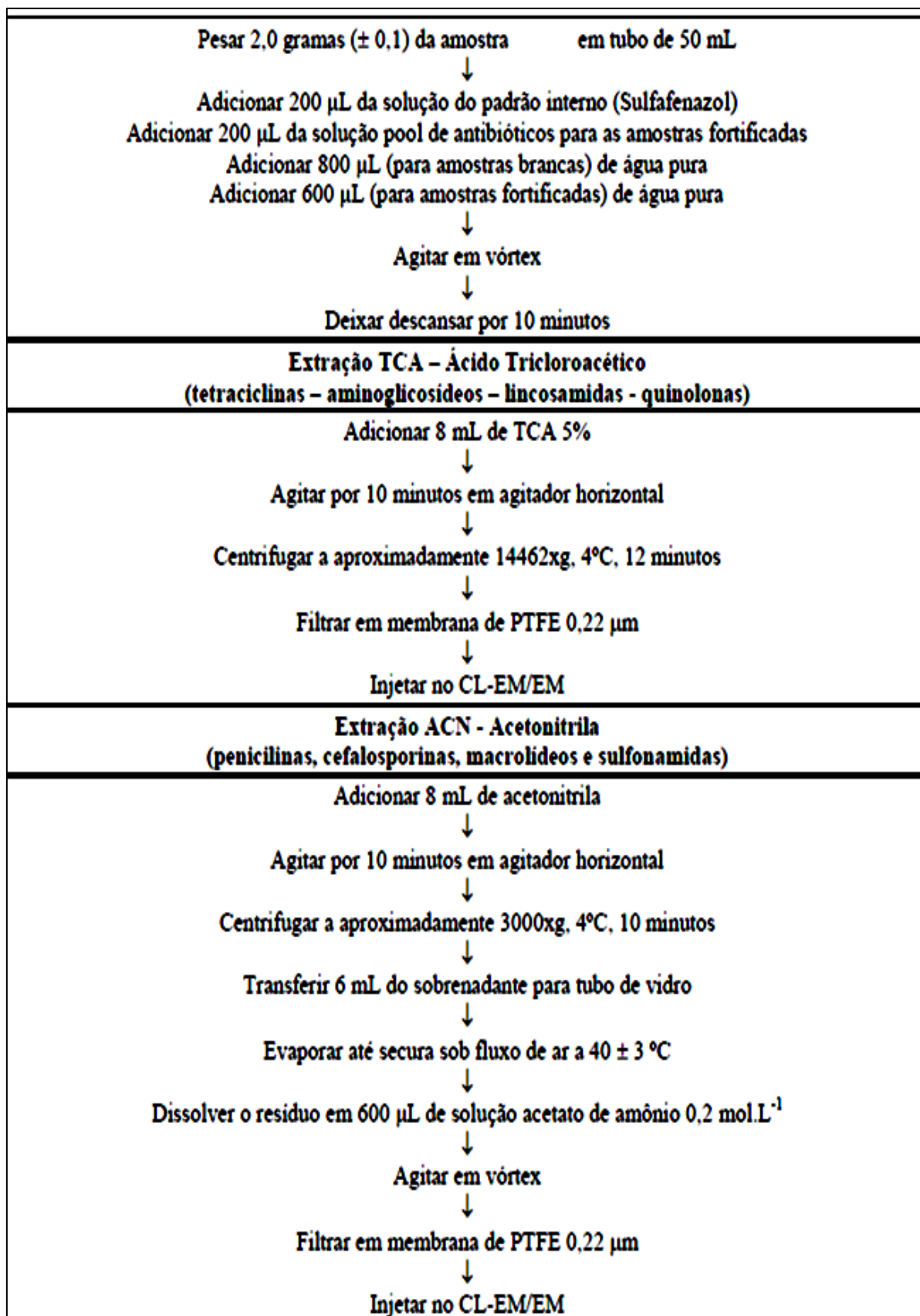


Figura 9. Cópia do protocolo de extração utilizado no método de multirresíduos. LANAGRO/MG, Pedro Leopoldo, 2013.

Parâmetros Instrumentais:

Com relação ao sistema cromatográfico os parâmetros instrumentais utilizados foram idênticos ao descrito no método de referência (Gaugain-Juhel et al., 2009). O sistema cromatográfico foi interligado a um espectrômetro de massas triplo quadrupolo/*Ion Trap* Linear (4000 QTRAP®) (Figura 10) da AB Sciex equipado com fonte de ionização *electrospray* usada no modo positivo. A aquisição de dados foi feita pelo programa *Analyst*® (versão 1.5.1).



Figura 10. Espectrômetro de massas triplo quadrupolo/*Ion Trap* Linear (4000 QTRAP®) da AB Sciex equipado com fonte de ionização *electrospray*. LANAGRO/MG, Pedro Leopoldo, 2013.

A otimização das condições do espectrômetro de massas foi realizada por meio de infusão direta das soluções de padrões que apresentaram menor intensidade de sinal, com o objetivo de obter o maior sinal analítico do íon precursor de cada analito a ser estudado. O nitrogênio foi utilizado como gás de colisão sendo monitoradas, no mínimo, duas transições (m/z) para cada composto. A transição com maior intensidade (transição 1) foi usada para a identificação e a transição de menor intensidade (transição 2) foi usada para a confirmação do analito. A presença de duas transições com valor de sinal/ruído >3 em combinação com o tempo de retenção garantem a identificação e confirmação dos analitos.

4.3.4.2 Quantificação de resíduos de Oxitetraciclina em rim e fígado por CLAE - EM/EM.

O método multirresíduos, descrito anteriormente, detectou níveis quantificáveis de resíduos de oxitetraciclina. Portanto tornou-se necessário realizar uma análise quantitativa desse antibiótico no rim, fígado e músculo dos frangos. O procedimento de extração utilizado foi baseado e realizado conforme descrito pelo trabalho de Rezende et al. (2012). Para quantificação tornou-se necessário criar uma curva de calibração para que os valores encontrados fossem calculados através da equação da reta de calibração. A preparação da curva de calibração foi realizada pela adição das soluções de fortificação diretamente sobre matriz branca (tecido sem presença de resíduos). Os valores da curva e reta de calibração utilizadas na quantificação podem ser observados na figura 11 a seguir:

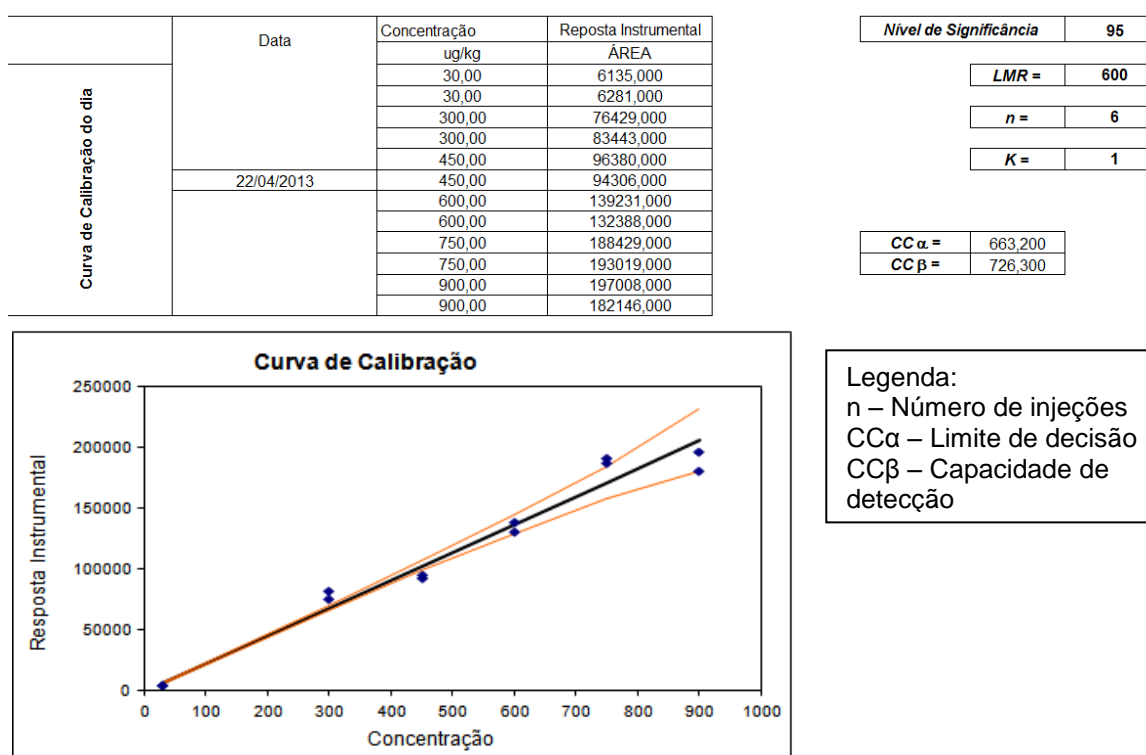


Figura 11. Valores da curva de calibração e reta de calibração utilizadas na quantificação de oxitetraciclina em rim e fígado de frangos. LANAGRO/MG, Pedro Leopoldo, 2013

Após a extração das amostras e da preparação da curva de calibração, foi realizado a análise cromatográfica. Os parâmetros e condições cromatográficas utilizados podem ser observados na tabela 2 a seguir:

Tabela 2 Condições cromatográficas utilizadas na quantificação de Oxitetraciclinas em amostras de rim e fígado de frangos. LANAGRO/MG, Pedro Leopoldo, 2013

Parâmetros	Especificação / Condição
Coluna	Acquity UPLC BECH C18, 1,7 μ m; 2,1x50mm – Waters
Pré-coluna	Van Guard Waters BECH C18, 1,7 μ m
Temperatura da coluna	40 °C \pm 5 °C
Fase móvel	A: Água + 0,1% ácido fórmico B: MeOH
Fluxo fase móvel	0,6 mL/min
Volume de injeção	20 μ L
Tempo de corrida	11 min

A otimização das condições do espectrômetro de massas foi realizada pelo mesmo procedimento descrito anteriormente.

4.3.4.3 Quantificação de resíduos de Oxitetraciclina em músculo (peito) por CLAE - EM/EM.

A quantificação de resíduos de Oxitetraciclina no músculo dos frangos foi analisada no Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários do Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/RS. A amostra foi fracionada e homogeneizada e ao final composta por 2,0 \pm 0,1 g. Adicionou-se 400 μ L de EDTA 150 mM e agitou-se manualmente em vortex por aproximadamente 15 segundos. As amostras foram então fortificadas com 100 μ L da solução de padrão interno (DEMECLOCICLINA 4 μ g.mL⁻¹,) deixando em repouso por aproximadamente 15 minutos. Logo após 800 μ L de água tipo Milli-Q foram adicionados. As amostras foram novamente agitadas manualmente em vortex por aproximadamente 15 segundos e após essa etapa colocadas em repouso por aproximadamente 30 minutos em ambiente escuro sob refrigeração. Foram então adicionados 6 mL de acetonitrila em cada tubo e homogeneizou-se a amostra em dispersor mecânico. A amostra foi centrifugado por 10 minutos a 3500 rpm. Evaporou-se todo o sobrenadante em banho-maria(40°C) com o auxílio de nitrogênio. O resíduo seco foi reconstituído com 1 mL de solução água:acetonitrila (70:30, v/v) e após, centrifugou-

se por 10 minutos à 10.000 rpm. O sobrenadante resultante foi transferido para vials e 5 µL foram injetados no sistema de CLAE - EM/EM.

As amostras foram analisadas em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência sob as condições de análise determinadas no método das Tetraciclinas do LANAGRO/RS. A quantificação foi realizada através do software Analyst®. Na tabela 3, observa-se os parâmetros analíticos e as razões m/z monitoradas, bem como os tempos de retenção típicos da Oxitetraciclina e padrão interno.

Tabela 3. Parâmetros analíticos, razões monitoradas e tempos de retenção na análise de Oxitetraciclinas em CLAE - EM/EM.. LANAGRO/RS, Porto Alegre, 2013.

Sistema CLAE - EM/EM	API 5000
Coluna	Xterra (Waters), C18 1,7 µm X 2,1 mm X 100 mm
Gradiente de fase móvel	
Etapa / Tempo (min)	Fluxo (µL.min ⁻¹) / Solvente A% / Solvente B%*
Equilíbrio / 4,0	250 / 95 / 5
1 / 2,0	250 / 95 / 5
2 / 3,0	250 / 80 / 20
3 / 4,0	250 / 70 / 30
4 / 5,0	250 / 60 / 40
5 / 6,0	250 / 50 / 50
6 / 7,0	250 / 40 / 60
7 / 8,0	250 / 30 / 70
8 / 9,0	250 / 20 / 80
9 / 10,0	250 / 10 / 90
10 / 11,0	250 / 10 / 90
11 / 12,0	250 / 50 / 50
12 / 13,0	250 / 95 / 5
13 / 14,0	250 / 95 / 5
Analito	Transições Monitoradas / Tempo de Retenção
Oxitetraciclina	1 ^a T = 461>426 2 ^a T = 461>444 / 8,51 min
Demeclociclina**	1 ^a T = 445>428 / 9,46 min

* Solvente A: água Milli-Q com 0,05% de ácido fórmico ;

* Solvente B: acetonitrila com 0,05% de ácido fórmico.

** Como se trata do padrão interno, monitora-se somente uma transição

Para quantificação tornou-se necessário criar uma curva de calibração para que os valores encontrados fossem calculados através da equação da reta de calibração. A preparação da curva de calibração foi realizada pela adição das soluções de fortificação diretamente sobre matriz branca. Os valores da curva de calibração podem ser observados na tabela 4 a seguir:

Tabela 4. Preparação da curva de calibração para quantificação de Oxitetraciclina em matriz músculo. LANAGRO/RS, Porto Alegre, 2013.

Ponto	μL padrão interno	μL POOL/F	[] em $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ no tecido
Ponto 0	100	2,5	2,5
Ponto 1	100	25	25
Ponto 2	100	50	50
Ponto 3	100	100	100
Ponto 4	100	150	150
Ponto 5	100	200	200

4.3.4.4 Quantificação de resíduos de Enrofloxacin em rim e fígado por CLAE - EM/EM.

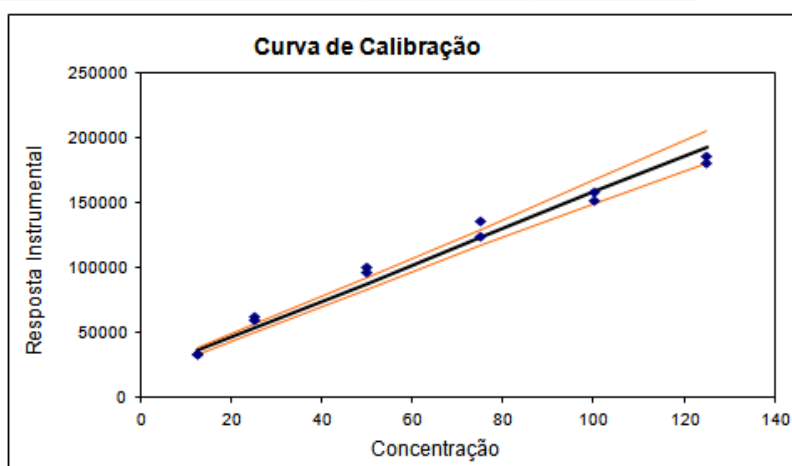
O método multirresíduos, descrito anteriormente, também detectou níveis quantificáveis de resíduos de Enrofloxacin. Portanto tornou-se necessário realizar uma análise quantitativa desse antibiótico no rim e fígado dos frangos. Essa análise foi realizada no Laboratório de Resíduos de Medicamentos Veterinários (LRM) do Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO/MG). O procedimento de extração, o equipamento utilizado, bem como todos os parâmetros cromatográficos são os mesmos descritos anteriormente na técnica de multirresíduos. No entanto, para quantificação de Enrofloxacin, tornou-se necessário fazer uma curva de calibração para que os valores encontrados fossem calculados através da equação da reta de calibração. A preparação da curva de calibração foi realizada pela adição das soluções de fortificação diretamente sobre matriz branca. Os valores da curva e reta de calibração utilizadas na quantificação podem ser observados na figura 12 a seguir:

Curva de Calibração do dia	Data	Concentração	Resposta Instrumental
		ug/kg	AREA
	30/10/2013	12,50	34800,000
		12,50	35400,000
		25,00	61100,000
		25,00	64600,000
		50,00	98700,000
		50,00	102000,000
		75,00	126000,000
		75,00	138000,000
		100,00	160000,000
		100,00	154000,000
		125,00	183000,000
125,00		187000,000	

Nível de Significância	95
LMR =	100
n =	6
K =	1

$$CC\alpha = 106,306$$

$$CC\beta = 112,611$$



Legendas:

n – Número de amostras injetadas

CC α – Limite de decisão

CC β – Capacidade de detecção

Figura 12. Valores da curva de calibração e reta de calibração utilizadas na quantificação de Enrofloxacin em rim e fígado de aves. LANAGRO/MG, Pedro Leopoldo, 2013

4.3.4.5 Quantificação de resíduos de Enrofloxacin em músculo (peito) por CLAE - EM/EM.

A quantificação de resíduos de Enrofloxacin no músculo dos frangos foi analisada no Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas e Medicamentos Veterinários do Laboratório Nacional Agropecuário - LANAGRO/RS. A amostra foi fracionada e homogeneizada e ao final composta por $2,0 \pm 0,1$ g. Adicionou-se $10 \pm 0,5$ mL de metanol acidificado com 1% de ácido fórmico em cada tubo contendo a amostra. Em seguida foi realizado a homogeneização empregando Ultra Turrax® e deixou-se sob agitação em mesa agitadora por aproximadamente 20 minutos. Após agitação, as amostras foram centrifugadas sob refrigeração com rotação superior a 3000 RPM, por aproximadamente 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para um tubo Falcon (50 mL) limpo e mantido em freezer por aproximadamente 1hr. Foi transferido 1 mL de extrato para tubo tipo Eppendorf e centrifugou-se em rotação próxima a 12000 RPM por aproximadamente 10 minutos.

Por último, transferiu-se 800 µL de fase móvel A (Água 0,1% ácido fórmico) para os *vials* e então adicionou-se 200 µL de extrato. Os *vials* foram então submetidos à análise em sistema CLAE - EM/EM sob as condições de análise determinadas no método das Fluorquinolonas, A quantificação foi realizada através do software Analyst. Os parâmetros analíticos e as razões m/z monitoradas, bem como os tempos de retenção típicos da Enrofloxacin e padrão interno podem ser observados na tabela 5 a seguir.

Tabela 5. Parâmetros analíticos, razões monitoradas e tempos de retenção na análise de Enrofloxacin em CLAE - EM/EM.. LANAGRO/RS, Porto Alegre, 2013.

Sistema LC-MS/MS	Agilent 1100 Series, fluxo de fase móvel em 0,3 mL.min ⁻¹ .
Espectrômetro de massas	API 5000 - Applied Biosystems
Coluna	Coluna C18, Xterra endcapped 3.5 mm 125Å 100 X 2,1 mm (Coluna RPM N° 37)
Dados	Computador integrado (Software Analyst APPLIED BIOSYSTEMS)
Fonte de ionização	<i>Electrospray</i> em modo positivo (ESI+)
Gradiente de fase móvel	
Etapa / Tempo (min)	Fluxo (µL.min⁻¹) / Solvente A% / Solvente B%*
Equilíbrio / 4,0	300 / 95 / 5
1 / 0	300 / 95 / 5
2 / 8,0	300 / 20 / 80
3 / 9,0	300 / 20 / 80
5 / 10,0	300 / 95 / 5
Analito	Transições Monitoradas / Tempo de Retenção
Enrofloxacin	1 ^a T = 360>316 2 ^a T = 360>245 / 7,46 min
Enro - D5 (Padrão Interno)*	1 ^a T = 365>321 2 ^a T = 365>245 / 8,20 min

* Solvente A: Água + 0,1% Ácido Fórmico.

* Solvente B: Acetonitrila + 0,1% Ácido Fórmico.

Para quantificação tornou-se necessário criar uma curva de calibração para que os valores encontrados fossem calculados através da equação da reta de

calibração. A preparação da curva de calibração foi realizada pela adição das soluções de fortificação diretamente sobre matriz branca. Os valores da curva de calibração podem ser observados na tabela 6 a seguir:

Tabela 6. Preparação da curva de calibração para quantificação de Enrofloxacina em matriz músculo. LANAGRO/RS, Porto Alegre, 2013.

Níveis de fortificação	Pool 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (μL)	PI 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (μL)	Concentração amostra (ng.g^{-1})
Ponto 1	0	20	0
Ponto 2	4	20	2
Ponto 3	10	20	5
Ponto 4	20	20	10
Ponto 5	30	20	15
Ponto 6	40	20	20

4.3.4.6 Análise Estatística dos Resultados

O Teste Exato de Fischer (THRUSFIELD, 2003) foi aplicado na análise dos resultados da detecção de *Salmonella* spp. pelos métodos de Microbiologia Convencional e Reação da Cadeia da Polimerase.

5 RESULTADOS

5.1 PESQUISA DE *SALMONELLA* SPP.

Dos seis matadouros investigados, dois foram positivos para *Salmonella* spp. No matadouro B obteve-se 3 isolamentos a partir de 3 carcaças e no matadouro F apenas 1 isolamento de uma carcaça (Tabela 7). Ao total de 60 carcaças, foram obtidos 4 isolamentos resultando em uma ocorrência de 6,67%. As cepas isoladas pertenciam aos sorotipos *S. Typhimurium* e *S. Albany*.

Todas as 60 amostras também foram submetidas a PCR para determinação da presença de *Salmonella* spp. (Figuras 13, 14). A PCR foi capaz de detectar esse agente em 5 amostras resultando em uma ocorrência de 8,33%. No matadouro B, foi detectada *Salmonella* spp. exatamente nas mesmas carcaças onde esse microrganismo foi isolado. Já no matadouro F, a PCR detectou-a em duas carcaças sendo que em apenas uma delas obteve-se o isolamento. (Tabela 7). A frequência de detecção pela PCR foi maior quando comparado a frequência do isolamento pela microbiologia convencional. No entanto, essa diferença não foi significativa pelo Teste Exato de Fischer ($p > 0,05$) (THRUSFIELD, 2003).

Tabela 7. Comparação entre PCR e Isolamento Microbiológico, identificação dos sorotipos isolados e ocorrência de *Salmonella* spp em carcaças de frangos abatidos no estado do Rio de Janeiro. Laboratório de Sanidade Avícola, UFF, Niterói, 2013.

Matadouro de aves	Amostra	Amostra / Sorotipo	Amostra / PCR
A	1 a 10	Não Isolado	Não Detectado
B	11 a 20	11 / <i>S. Typhimurium</i>	11 / Detectado
		12 / <i>S Albany</i>	12 / Detectado
		14 / <i>S Albany</i>	14 / Detectado
C	21 a 30	Não Isolado	Não Detectado
D	31 a 40	Não Isolado	Não Detectado
E	41 a 50	Não Isolado	Não Detectado
F	51 a 60	52 / <i>S. Typhimurium</i>	51 / Detectado
			52 / Detectado
Total	60	4	5
Ocorrência (%)	100	6,67	8,33

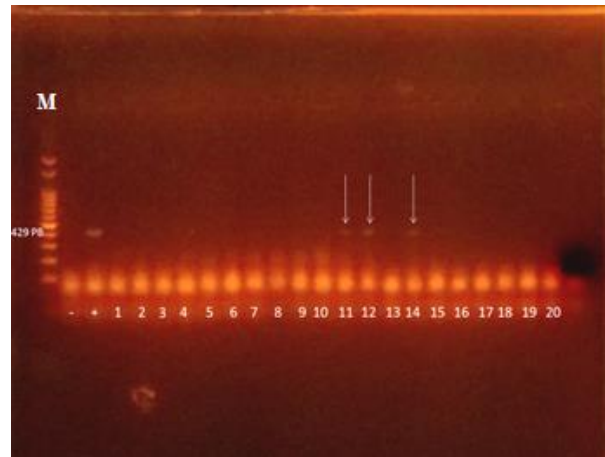


Figura 13. Eletroforese em Gel de Agarose de produtos amplificados pela PCR para pesquisa de *Salmonella* spp. Marcador de DNA de 100pb (M), controle negativo (-), controle positivo (+). Amostras 11, 12, 14 positivas. Laboratório de Biologia Molecular, UFF, Niterói, 2013.

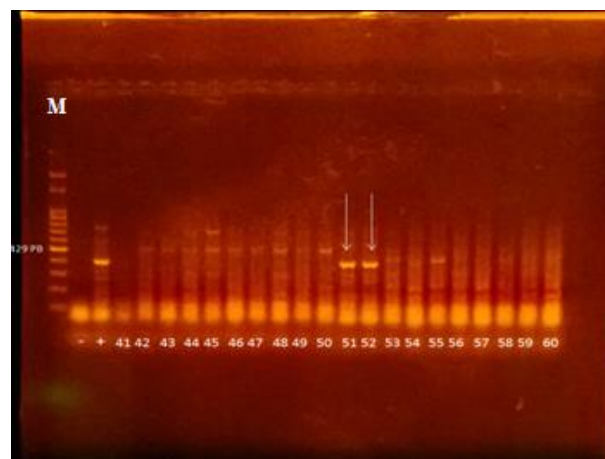


Figura 14. Eletroforese em Gel de Agarose de produtos amplificados pela PCR para pesquisa de *Salmonella* spp. Marcador de DNA de 100pb (M), controle negativo (-), controle positivo (+), Amostras 51 e 52 positivas. Laboratório de Biologia Molecular, UFF, Niterói, 2013.

5.2 PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DAS CEPAS ISOLADAS.

Todas as cepas apresentaram resistência a pelo menos 3 antibióticos testados. Todas as cepas foram resistentes à Bacitracina, Tetraciclina e Clindamicina e sensíveis à Gentamicina, Estreptomicina, Cefalotina, Cefotiofur, Amoxicilina, Ciprofloxacina e Norfloxacina. Metade das cepas foram resistentes somente aos antimicrobianos Espectinomicina, Enrofloxacin, Cotrimoxazol e Doxiciclina, enquanto que a outra metade foram sensíveis somente a esses antimicrobianos (Tabela 8).

Tabela 8. Perfil de resistência antimicrobiana das cepas de *Salmonella* spp. isoladas em carcaças de frango ao abate frente a 14 antimicrobianos. Laboratório de Doenças Infecciosas, UFF, Niterói, 2013.

Antibiótico/Amostra		11	12	14	52
		S.Typhimurium	S Albany	S Albany	S. Typhimurium
Amino glicosídeos	Gentamicina (10µg)	S	S	S	S
	Estreptomicina (10µg)	S	S	S	S
Cefalosporina	Cefalotina (30µg)	S	S	S	S
	Ceftiofur (10µg)	I	S	S	I
Macrolídeos	Espectomicina (100µg)	S	R	R	S
Penicilina	Amoxicilina (10µg)	S	S	S	S
Poli peptídicos	Bacitracina (10UI)	R	R	R	R
Quinolonas	Enrofloxacina (5µg)	S	R	R	S
	Ciprofloxacina (5µg)	S	S	S	S
	Norfloxacina (10µg)	S	S	S	S
Sulfas+ Trimetropim	Cotrimoxazol (5µg)	S	R	R	S
Tetraciclinas	Tetraciclina (30µg)	R	R	R	R
	Doxiciclina (30µg)	S	R	R	S
Clindamicina	Clindamicina (2µg)	R	R	R	R

S - Sensível
R - Resistente
I - Intermediário

5.3 PESQUISA DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM RIM, FÍGADO E MÚSCULO DOS FRANGOS ABATIDOS POR CLAE / EM/EM.

Na triagem de resíduos dos 44 antimicrobianos pesquisados no rim, apenas os frangos de um matadouro dos seis estudados apresentaram quantidade de resíduos suficientes para serem quantificados. Somente os rins de frangos abatidos no matadouro B apresentaram níveis de resíduos representados por áreas de pico cromatográfico mais próximas dos controles positivos (nível de corte). Nesses frangos foram detectados resíduos de Enrofloxacina e Oxitetraciclina (Figura 15). Para controle de qualidade das análises, foi checado a presença do padrão interno Sulfafenazol em cada cromatograma.

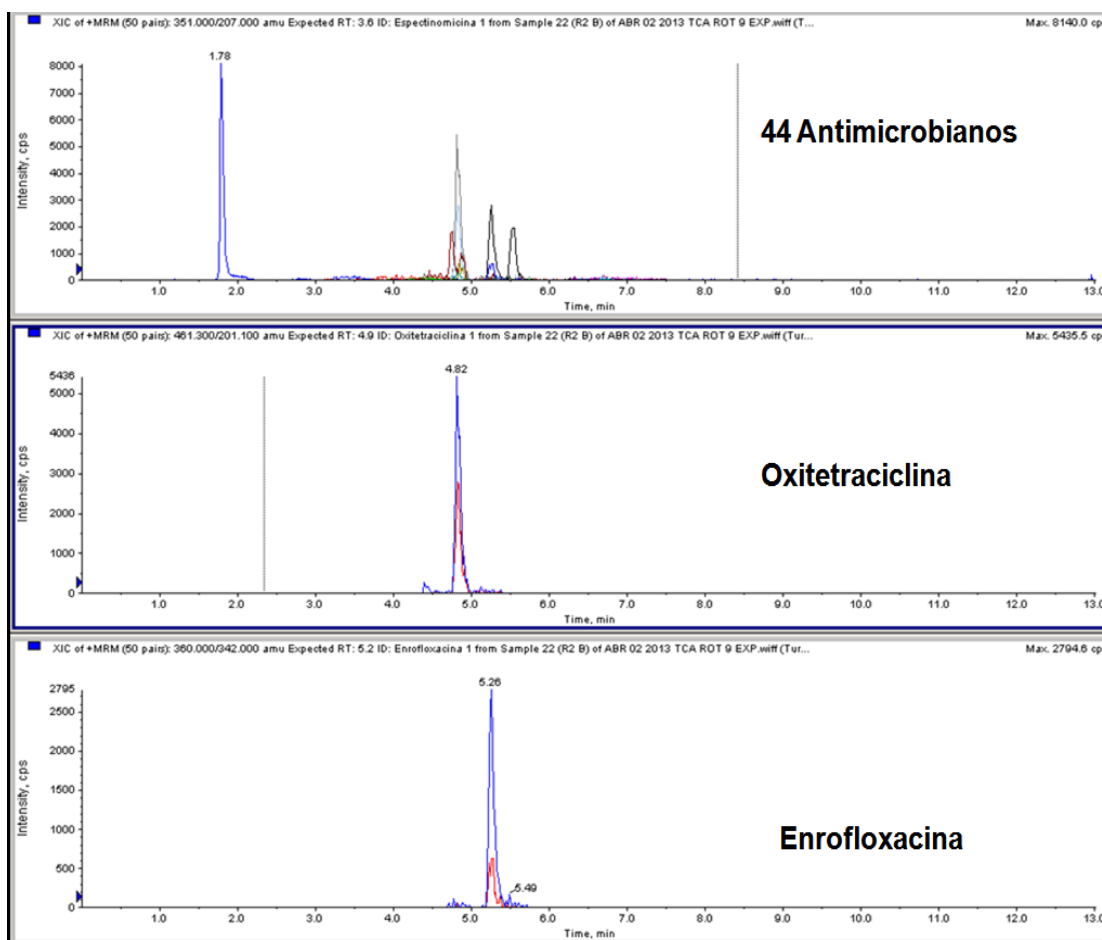


Figura 15. Perfil cromatográfico de todos os 44 antibióticos pesquisados e dos resíduos de Oxitetraciclina e Enrofloxacina encontrados nos rins de frangos abatidos no matadouro B. LANAGRO/MG, Pedro Leopoldo, 2013

Amostras de rim, fígado e músculo (peito) dos frangos abatidos no matadouro B foram então encaminhadas para quantificação de resíduos de

Oxitetraciclina e Enrofloxacinina conforme detectados na triagem do multirresíduos (Tabela 9).

Tabela 9. Teores de resíduos de Oxitetraciclina e Enrofloxacinina amostras de rim, fígado e músculo dos frangos do matadouro B. LANAGRO/MG/RS, Pedro Leopoldo/Porto Alegre, 2013.

	Enrofloxacinina (µg/kg)	LMR (µg/kg)	Oxitetraciclina (µg/kg)	LMR (µg/kg)
Rim	17,4		58,9	1200
Fígado	45,4	100	NQ*	600
Músculo (Peito)	10,8		19,94	200

* Não Quantificado

6 DISCUSSÃO

6.1 OCORRÊNCIA DE *SALMONELLA* SPP EM CARNE DE FRANGO RESFRIADA

Em nosso estudo, a ocorrência de 6,67% e 8,33% de *Salmonella* spp. detectadas pelo método convencional e pela PCR, respectivamente, está abaixo do limite estabelecido pelo Programa de Redução de Patógenos (PRP), Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* spp. em Carcaças de Frangos e Perus (BRASIL, 2003) que preconiza uma ocorrência máxima de 23,5% por estabelecimento. Os dados divulgados em nota técnica com os resultados do banco de dados, gerados a partir da implantação da Instrução Normativa 70 (BRASIL, 2003) com 128.293 análises realizadas pelo PRP no período de 2003 a 2008 em estabelecimentos sob Inspeção Federal, revelaram também a ocorrência de *Salmonella* spp. em 6,39% das amostras. Gouvêa (2008) também observou uma ocorrência de 6,45% ao avaliar a presença *Salmonella* spp. em 31 amostras de peito de frango resfriadas coletadas em supermercados da região metropolitana de Niterói.

No Brasil, a ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças resfriadas ao abate varia muito de acordo com as condições sanitárias. Em um estudo realizado em 60 abatedouros pequenos com precárias condições de higiene em diferentes regiões do Brasil, a *Salmonella* spp. foi isolada em 42% das carcaças resfriadas (FUZIRAHHA *et al.*, 2000). No estado de São Paulo, Cortez *et al.* (2006) encontraram uma ocorrência de 5,6% em carcaças resfriadas e evisceradas ao abate, no entanto, Tessari *et al.* (2003), relataram uma ocorrência de 19,1% somente para *Salmonella* Enteritidis no mesmo estado. No nordeste, Duarte *et al.* (2009), encontraram uma ocorrência de 9,6% em 260 carcaças resfriadas adquiridas em abatedouros da região. Em viçosa, Minas Gerais, outro estudo em dois matadouros diferentes, um de pequeno porte (4000 aves/dia) e outro de grande porte (165 mil ave/dia), revelou uma ocorrência de 8,3% e 5,0% respectivamente, em quatro momentos diferentes no decorrer do abate (MATIAS *et al.*, 2010). Também em Viçosa, Cossi *et al.* (2012), avaliaram a ocorrência da *Salmonella* spp. em carcaças de frangos resfriadas provenientes de matadouros com e sem inspeção. Ao total de 60 carcaças analisadas somente duas estavam positivas para esse microrganismo (3,33%). Na região sul, Borsoi *et al.* (2010), pesquisaram a ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de aves

resfriadas na região nordeste do Rio Grande do Sul e encontraram uma ocorrência de 12,2%. Rissato *et al.* (2011), em supermercados e açougues da cidade de Campo Mourão/PR relataram uma ocorrência de *Salmonella* spp de 16,66% a partir de 30 carcaças de frango resfriadas.

Apesar da maioria dos trabalhos mostrarem uma ocorrência de *Salmonella* spp. inferior a 15%, um estudo realizado por Possebon *et al.* (2011) apresentou uma ocorrência de 46,15% através da microbiologia convencional em carcaças resfriadas coletadas em indústrias na região de Botucatu/SP. Segundo o autor., essa alta ocorrência foi relacionada à contaminação dos lotes ainda nas granjas por influência das condições higiênico-sanitárias, climáticas e ambientais, ao transporte dos animais, às condições do ambiente pré-abate nos estabelecimentos industriais e ao próprio processamento industrial para obtenção das carcaças, além da metodologia analítica empregada.

6.2 OCORRÊNCIA DE *SALMONELLA* SPP EM CARNE DE FRANGO CONGELADA

Além desses trabalhos que determinam a ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos resfriadas, alguns estudos também avaliaram a ocorrência desse patógeno em produtos avícolas congelados. Silva Santos *et al.* (2000), ao analisarem um total de 150 carcaças de frango congeladas obtidas do comércio varejista de Jaboticabal, São Paulo, observaram um percentual de 32,0% de contaminação. Em outro estudo, a partir de 60 carcaças de frangos congeladas coletadas em feiras livres e mercados registrados na prefeitura municipal de Manaus, 30 (50%) foram positivas para *Salmonella* spp. (TIROLLI; COSTA, 2006). Em estabelecimentos industriais de São Paulo, um estudo avaliou a ocorrência desse microrganismo em 116 carcaças de frangos congeladas e analisadas pela microbiologia convencional no período de julho de 2006 a junho de 2007. Deste total, duas amostras (1,7%) apresentaram contaminação por *Salmonella* spp. e uma (0,8%) por *Salmonella* Enteritidis, totalizando três amostras positivas (2,5%) (TESSARI *et al.*, 2008). Em 2011, um estudo envolvendo 2.679 carcaças congeladas de 15 capitais em 5 regiões geográficas do Brasil apresentou uma ocorrência de 2,7% sendo que metade das amostras positivas eram provenientes do estado de São Paulo (MEDEIROS *et al.*, 2011).

6.3 JUSTIFICATIVAS PARA VARIAÇÕES DA OCORRÊNCIA DE SALMONELLA NO AMBIENTE DE ABATE

Embora o presente estudo e a maioria dos trabalhos revelem uma baixa ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos, existem relatos no Brasil de contaminação por *Salmonella* spp. em frangos e seus derivados variando de 9,15 a 86,7% (CARDOSO et al., 2008). Alguns autores como Fletcher et al. (2006) justificaram a baixa ocorrência de *Salmonella* spp. atribuindo aos vários tratamentos efetuados durante o abate na indústria, tais como o emprego de enxágues sucessivos com água corrente e presença de cloro residual nas amostras. Já em amostras congeladas, ele atribuiu à exposição prolongada ao frio, o que pode diminuir o número de células do agente, bem como torná-las inviáveis e não detectáveis na microbiologia convencional.

O processamento industrial também contribui para a disseminação e multiplicação de salmonelas que podem ocorrer pela contaminação cruzada por meio da água de escaldagem, processo de depenagem, água de resfriamento, e utilização de equipamentos e utensílios contaminados. Autores como Lillard et al. (1990) justificaram a alta ocorrência de *Salmonella* spp. atribuindo à contaminação cruzada pela água do tanque de resfriamento. Dessa maneira, para evitar que a contaminação cruzada entre diferentes lotes pudesse influenciar nos nossos resultados, coletamos as amostras somente do primeiro lote de frangos abatidos em cada indústria pesquisada. Mas, por outro lado, esse fato pode ter influenciado na ocorrência de *Salmonella* spp., justificando o baixo número de isolamentos obtidos nesse trabalho.

Independentemente das variações na ocorrência de *Salmonella* spp., há que se considerar que a legislação brasileira (BRASIL, 2003) exige ausência desse microrganismo em 25g do alimento. Logo, a detecção de *Salmonella* spp. nos produtos investigados os torna inapropriados para o consumo humano e representam um risco para a saúde pública.

O controle da *Salmonella* spp. nos diferentes produtos avícolas envolve intervenções na produção das aves e no processamento tecnológico na indústria. Por isso, a determinação e monitoramento de Pontos Críticos de Controle Microbiológicos nessas etapas do processamento são medidas fundamentais para o controle da *Salmonella* spp.

6.4 COMPARAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS DE DETECÇÃO DE *SALMONELLA* SPP.

O uso da PCR na detecção de *Salmonella* spp. em produtos avícolas é uma estratégia muito utilizada. Na comparação entre eficiência de detecção da *Salmonella* spp. pela microbiologia convencional e pela PCR, este estudo demonstrou que a PCR foi capaz de identificar um número maior de amostras positivas para esse microrganismo, entretanto não houve diferença estatística significativa pelo Teste Exato de Fischer (THRUSFIELD, 2003). Schrank et al. (2000), ressaltaram a alta sensibilidade e especificidade desta técnica para a identificação de *Salmonella* spp. em produtos agrícolas. No trabalho de Possebon et al. (2011), a PCR foi capaz de detectar a presença de *Salmonella* spp. em 44.6% das amostras enquanto que a microbiologia convencional detectou 38,5%. Na Itália, Croci et al. (2004), conseguiram identificar a *Salmonella* spp. em todas as amostras artificialmente contaminadas tanto pela PCR quanto pela microbiologia convencional. O mesmo não ocorreu no estudo de Gouvêa (2008), onde, nas amostras artificialmente contaminadas, a PCR mostrou-se mais eficaz identificando 100% das amostras contaminadas, enquanto 97% foram detectadas pela microbiologia convencional. Entretanto, nesse mesmo estudo, foi feita pesquisa de *Salmonella* spp. em 31 amostras de campo, onde duas amostras foram isoladas pela microbiologia convencional e nenhuma detecção foi confirmada pela PCR. A PCR, além de possuir uma alta sensibilidade e especificidade como ressaltada por vários autores (SCHRANK et al., 2000; POSSEBON et al., 2011), possui uma grande vantagem relacionada ao tempo de execução e obtenção do resultado quando comparada com a microbiologia convencional que além da demora na obtenção dos resultados demanda maior mão de obra e material de consumo.

6.5 OCORRÊNCIA DOS SOROTIPOS DE *SALMONELLA* SPP EM PRODUTOS AVÍCOLAS

Com relação aos sorotipos encontrados no presente trabalho, *S. Typhimurium* e *S. Albany* foram isolados em iguais proporções (2/4). No entanto, foram isolados a partir de amostras de um mesmo matadouro. Isso demonstra a possibilidade de contaminação por diferentes sorotipos na mesma amostra e a importância da sorotipificação de todas as colônias sugestivas pelos testes

bioquímicos e sorológicos. Alguns trabalhos apontam a *S. Typhimurium*, como um dos sorotipos comumente isolados em produtos de aves em geral. Cortez *et al.* (2006) obtiveram isolamento desse sorotipo a partir de 6,9% das amostras, Tirolli e Costa (2006) 13,4%, Duarte *et al.* (2009) 15,78% e Medeiros *et al.* (2011) 7,2%. Os outros trabalhos, além de não terem encontrado esse sorotipo, ainda isolaram a *S. Enteritidis* mais frequentemente. No entanto, a *S. Typhimurium* é o sorotipo de origem alimentar mais distribuído em todo o mundo. Alguns estudos relatam a existência de *S. Albany* entre os isolados de produtos de carne de aves. Nos estudos de Fuziraha *et al.* (2000) e Tirolli *et al.* (2006), já citados anteriormente, 12% e 10,4% dos isolados pertenciam ao sorotipo Albany, respectivamente, sendo esse o segundo sorotipo mais isolado depois de *S. Enteritidis*. Em outro trabalho de monitoramento de *Salmonella* spp. em salsichas do tipo Frankfurt feitas a partir de carne de frango realizado em dois abatedouros de São Paulo, de 185 amostras de Carne Mecanicamente Separada (CMS), isolou-se *Salmonella* spp em seis amostras, todas elas identificadas como o sorotipo Albany (D'AOUST,1997).

6.6 RESISTÊNCIA DE *SALMONELLA* SPP FRENTE AOS ANTIMICROBIANOS

Recentemente, o aumento da prevalência de cepas de *Salmonella* spp. multirresistentes, principalmente à antibióticos de importância no tratamento clínico de pacientes humanos, como é o caso das fluorquinolonas e das cefalosporinas de terceira geração, tem se tornado um emergente problema de saúde pública mundial (HUR *et al.*, 2012). Através de nossos resultados, demonstramos que todas as cepas isoladas não apresentaram resistência frente às Cefalosporinas testadas (cefalotina e ceftiofur). No entanto, as duas cepas de *S. Albany* isoladas apresentaram resistência frente a uma das três fluorquinolonas testadas (enrofloxacin). Interessantemente, a resistência dessas duas cepas de *S Albany* frente à enrofloxacin caracteriza uma aquisição de resistência cruzada por esses microrganismos visto que o uso de enrofloxacin é de uso exclusivo na medicina veterinária.

As tetraciclina, por sua vez, têm sido uma das classes de antimicrobianos mais usadas terapêuticamente em animais de produção (WILSON *et al.*, 2004). Os resultados, aqui apresentados, foram capazes de comprovar o uso de oxitetraciclina e enrofloxacin durante a criação dos animais abatidos no matadouro B, já que,

resíduos de ambos medicamentos foram detectados no rim, fígado e músculo desses animais. Cabe ainda ressaltar que, no Brasil, a INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 26, DE 9 DE JULHO DE 2009 da Secretaria de Defesa Agropecuária do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), já havia determinado que as penicilinas, as tetraciclinas e as sulfonamidas sistêmicas, devem ser evitadas como aditivos alimentares e/ou promotores de crescimento, restringindo seu uso à terapêutica (BRASIL, 2009). Assim, pode-se supor que, de encontro à legislação vigente, o uso de tetraciclina durante a criação das aves abatidas no matadouro B, possivelmente teve o objetivo de promover o crescimento, já que, o uso de tetraciclinas na avicultura de corte não é eficaz como prevenção e terapêutica. Apesar de vários estudos, Santos *et al.* (2000), Oliveira *et al.* (2004), Cortez *et al.* (2006), Conceição *et al.* (2007), Duarte *et al.*, (2009), Vaz *et al.* (2010) e Medeiros *et al.* (2011), apresentarem sensibilidade das cepas de *Salmonella* spp. isoladas frente às tetraciclinas, todas as cepas isoladas no presente trabalho foram resistentes à tetraciclina e 50% delas, à doxiciclina.

Em relação à estreptomicina, Oliveira *et al.* (2004) e Vaz *et al.* (2010) encontraram sensibilidade das cepas de *Salmonella* spp. isoladas, o que concorda com nossos resultados, visto que não foram detectadas cepas resistentes a esse medicamento. Por outro lado, Duarte *et al.* (2009) e Medeiros *et al.* (2011) encontraram resultados divergentes ao apresentado nesse trabalho, pois 73,7% e 78% das cepas isoladas eram resistentes à estreptomicina. Os trabalhos de Santos *et al.* (2000), Oliveira *et al.* (2004), Cortez *et al.* (2006) e Medeiros *et al.* (2011) concordaram com nosso resultado em relação à gentamicina, já que todos apresentaram baixos números de cepas isoladas resistentes a esse antimicrobiano.

6.7 PESQUISA POR RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS EM FRANGOS DE CORTE

Entre os 44 antimicrobianos pesquisados nesse estudo, foram detectados pela CLAE-EM/EM resíduos de Oxitetraciclina e Enrofloxacina em níveis abaixo do Limite Máximo Residual preconizado pela legislação brasileira (BRASIL, 2013). A partir desse fato, pode-se afirmar que:

- 1) Houve administração desses medicamentos durante criação dos frangos;

- 2) O período de carência desses medicamentos foi respeitado, visto que, os resíduos de relevância toxicológica nas matrizes estudadas apresentavam – se abaixo do LMR.

Possivelmente, uma resposta individual de algumas aves relacionada a um retardo na metabolização e excreção desses medicamentos poderia explicar os baixos níveis encontrados desses medicamentos. Os resultados dessa pesquisa estão de acordo com os resultados do monitoramento do Plano Nacional de Controle de Resíduos e Contaminantes em carnes de aves no exercício de 2012 (BRASIL, 2013), onde também não foram encontradas violações aos limites máximos de oxitetraciclina e enrofloxacina.

Os LMRs para medicamentos de uso veterinário são estabelecidos com base na análise toxicológica e farmacocinética da substância química, ou seja, do risco ou perigo que ela possa representar para a saúde humana. Este risco é calculado através da IDA - Ingestão Diária Aceitável (mg/kg ou µg/kg) do medicamento presente no produto de origem animal, ao qual se incorpora um fator de segurança da ordem de até 100 vezes. Este fator é incorporado visando atender às demandas geradas pela variação individual de sensibilidade do consumidor às substâncias químicas (idade, sexo, raça, estado de higidez, etc.) (BRASIL, 2006).

Como os resíduos de antibióticos detectados nesse estudo estavam abaixo do LMR, podemos concluir que segundo as normas da Comissão do *Codex Alimentarius* da FAO/OMS (CAC, 2012), os produtos analisados nesse trabalho não oferecem riscos à saúde do consumidor final.

7 CONCLUSÕES

- O presente trabalho obteve sucesso no isolamento e identificação de cepas de *Salmonella* spp. em frangos de corte abatidos no estado do Rio de Janeiro. A ocorrência desse microrganismo está de acordo com outros trabalhos relatados no Brasil.
- As carcaças de frango resfriadas poderiam chegar ao consumidor com contaminação por salmonelas, o que justifica a adoção de métodos de controle e prevenção por parte das empresas e dos órgãos de fiscalização.
- A PCR, além de proporcionar resultados com maior rapidez, foi capaz de detectar uma ocorrência maior de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos, porém sem diferença significativa em relação à Microbiologia Convencional.
- As cepas de salmonelas isoladas das carcaças de frangos resfriadas apresentaram multi-resistência a pelo menos 3 antimicrobianos testados.
- Conforme preconizado pela legislação brasileira, foram detectados resíduos de oxitetraciclina e enrofloxacina em níveis abaixo do Limite Máximo Residual demonstrando que os produtos analisados não oferecem riscos à saúde do consumidor final em relação à relevância toxicológica.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AABO, S.; RASMUSSEN, O.F.; ROSEEN, L.; SØRENSEN, P.D.; OLSEN, J.E.; 1993. *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. *Mol. Cell. Probes*. v.7, p.171-178.
- ACHA, P.N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. *Organización Panamericana de la Salud*. Washington. 2.ed., p. 989., 1986.
- ALMEIDA, M. V. Avaliação de sequências alvo e PCR em diferentes etapas 2012 da metodologia convencional para detecção de *Salmonella* spp. em carne bovina artificialmente contaminada. Viçosa, 2012. 72f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais. 2012
- ANDRADE, R.B.; GEMELLI, T.; DALL ONDER, L.P.; CRISTINA, K.; BRITO, T.; BARBOZA, A.A.L.; BRITO B.G. Métodos diagnósticos para os patógenos alimentares: *campylobacter* sp., *salmonella* sp. E *listeria monocytogenes*. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.77, p.741-750, 2010.
- ARDREY, R. E.; Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction. *Wiley: Huddersfield*, 2003.
- BADA-ALAMBEDJI, R.; FOFANA, A.; SEYDI, M.; AKAKPO, A.J. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from poultry carcasses in Dakar (Senegal). *Brazilian Journal of Microbiology*, v.37, p.510-515, 2006
- BERCHIERI JÚNIOR, A.; OLIVEIRA, G. H. Saúde Aviária e Doenças. In: ANDREATTI FILHO, R. L. *Salmoneloses Aviárias*. São Paulo: Roca, 2006, seção 2, cap.9, p.84-111.
- BOGIALLI, S.; DI CORCIA, A. Recent applications of liquid chromatography–mass spectrometry to residue analysis of antimicrobials in food of animal origin. *Anal Bioanal Chem*, v.395, p.947-966, 2009.
- BONI, H.F.K.; CARRIJO, A.S.; FASCINA, V.B. Ocorrência de *Salmonella* spp. em aviários e abatedouro de frangos de corte na região central de Mato Grosso do Sul. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, Salvador, v.12, n.1, p.84-95, 2011.
- BOOTH, N.H; MCDONALD, L. E; *Farmacologia e Terapêutica em Veterinária* 6 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1992. 1048p.
- BORSOI, A.; MORAES, H.L.S.; SALLE, C.T.P.; NASCIMENTO, V.P. Número mais provável de *Salmonella* spp. isoladas de carcaças de frango resfriadas. *Ciência Rural*, v.40, n.11, p.2338-2342, 2010.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Programa Nacional de Análise de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos Expostos ao Consumo. Novembro, 2003. Disponível em: www.anvisa.gov.br Acesso em 28 julho 2012.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária Abastecimento. Instrução Normativa Nº 42, de 20 de dezembro de 1999. Altera o Plano Nacional de Controle de Resíduos em Produtos de Origem Animal - PNCR e os Programas de Controle de Resíduos em Carne - PCRC, Mel – PCRM, Leite – PCRL e Pescado – PCRP. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p.213, 22 dez. 1999, Seção 1

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Secretaria da Defesa Agropecuária (SDA). Instrução Normativa nº 62, de 26 de Agosto de 2003. Oficializar os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. *Diário Oficial da União*, Brasília, p.14. 18 de setembro de 2003, seção I,

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária Abastecimento. Instrução Normativa Nº 70, de 06 de outubro de 2003. Programa de Redução de Patógenos, Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* spp. em Carcaças de Frangos e Perus. *Diário Oficial da União*, Brasília, p.09. 10 de outubro de 2003, seção I,

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária Abastecimento. Portaria do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, nº 808, de 06 de novembro de 2003. Disponível em:
<http://www.agricultura.gov.br/animal/qualidade-dos-alimentos/comunicados>.
Acesso em 11 fev de 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária Abastecimento. Instrução Normativa Nº26, de 9 de Julho de 2009. Aprovar o Regulamento Técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p.14, 10 de julho, 2009, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária Abastecimento. Instrução Normativa Nº 8, de 29 de abril de 2010. Aprova os Programas de Controle de Resíduos e Contaminante em Carnes (Bovina, Aves, Suína e Equina), Leite, Mel, Ovos, Pescado para o exercício de 2010, na forma dos Anexos à presente Instrução Normativa. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, p.27, 03 de maio, 2010, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária Abastecimento. Instrução Normativa Nº 7, de 27 de março de 2013. Publicar os resultados do acompanhamento dos Programas de Controle de Resíduos e Contaminantes dos subprogramas de monitoramento e exploratório em Carnes (Bovina, Suína, de Aves, de Avestruz e Equina), em Leite, Ovos, Mel e Pescado do exercício de 2012, na forma dos Anexos à presente Instrução Normativa, em conformidade com a Instrução Normativa nº 11, de 22 de Maio de 2012. DF, p.09, 03 de abril, 2013, Seção 1.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária Abastecimento, Nota Técnica: Divulgação dos resultados do banco de dados gerado a partir da implantação da Instrução Normativa 70, de 6 de outubro de 2003. Disponível em:
http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/Nota%20%20Tecnica%20redigida%20por%20OGT%20fev%202010%20final%20revisada.doc. Acesso em: 20 set. 2013.

BRITO, J.R.F; PORTUGAL, J.A.B; Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria e a questão dos resíduos de antibióticos. *Embrapa Gado de Leite*, EPAMIG, Juiz de Fora, 2003

BUCHALA, F.G.; ISHIZUKA, M.M.; MATHIAS, L.A.; BERCHIERI JÚNIOR, A.; CASTRO, A.G.M.; CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C.; KANASHIRO, A.M.I. Ocorrência de reação sorológica contra *Salmonella Pullorum* em aves de “fundo de quintal” do estado de São Paulo, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.73, n.1, p.1-5, 2006.

CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, M. B. M.; CAMPOS, L. C.; GOMPERTZ, O. F.; RÁCZ, M. L. *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu, 2005. 718p., cap.43, p. 319-328.

CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C. Salmonela na segurança dos alimentos. *Instituto Biológico*. v.70, n.1, p.11-13, 2008.

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

CHRISTIAN, T.; SCHNEIDER, R.J.; FÄRBER, H.A.; SKUTLAREK, D.; MEYER, M.T.; GOLDBACH, H.E. Determination of antibiotic residues in manure, soil, and surface waters. *Acta Hydrochim Hydrobiologia*, n.31, p.36-44. 2003.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION (CAC). Maximum Residue Limits for Veterinary Drugs in Foods: Updated as at the 35th Session of the Codex Alimentarius Commission July 2012.

Disponível em: <http://www.codexalimentarius.org/?id=15197>. Acesso em: 11 fev. 2014.

COMMISSION DECISION (EC) No. 2002/657/EC. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off J Eur Commun.*; p 221: 228, 2002.

CONCEIÇÃO RCS et al Isolamento de *Salmonella* de produtos de frango e perfil de suscetibilidade dos isolados a antimicrobianos. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 66(1): 31-34, 2007.

CORTEZ, A.L.L.; DE CARVALHO, A.C. DE F.B.; IKUNO, A.A.; BÜRGER, K.P.; VIDAL-MARTINS, A.M.C. Resistência antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. Isoladas de abatedouros de aves. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.73, n.2, p.157-163, 2006.

COSSI, M.V.C.; ALMEIDA, M.V.; DIAS, M.R.; PINTO, P.S.A.; NERO, L.A. Inspected and non-inspected chilled chicken carcasses commercialized in Viçosa, MG, Brazil: microbiological parameters and *Salmonella* spp. occurrence. *Ciência Rural*. v.42, n.9, p.1675-1681, 2012.

CROCI, L.; DELIBATO, E.; Volpe, G.; DE MEDICI, D.; PALLESHI, G. Comparison of PCR, Electrochemical Enzyme-linked Immunosorbent Assays, and the Standard culture method for detecting *Salmonella* in meat products. *Applied and Environmental Microbiology*. v.70, p.1393-96, 2004.

D'AOUST, J.Y. *Salmonella* species. In Doyle, M.P.; Beuchat, L.R.; Montville, T.J. Food Microbiology Fundamentals and Frontiers, ASM Press, p. 129- 158, 1997.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia: um breve ensaio. *Química nova na escola*, v.7,p.21-25, 1998.

DÍAZ-CRUZ, M.S.; DE ALDA, M.J.L.; BARCELÓ, D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *Trac Trends Anal Chemistry*, n.22, p.340-351. 2003.

DUARTE D.A.M.; RIBEIRO A.R.; VASCONCELOS A.M.M; SANTOS S.B.; SILVA J.V.D.; ANDRADE P.L.A.; et al. Occurrence of *Salmonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. *Braz J Microbiol*. v.40, p.569–573, 2009.

EUROPEAN COMMISSION, 2010. Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines (initial validation and transfer). Disponível em: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/residues/lab_analysis_en.htm/. Acesso em janeiro/2012.

FERNANDEZ, A. T.; FORTES, M. L. M.; ALEXANDRE, M. H. S.; BASTOS, C. S. P.; VIANNA, E. P. L. Ocorrência de surtos de doenças transmitidas por alimentos na cidade do Rio de Janeiro. 2001. Disponível em: <http://www.unigranrio.br/veterinaria/surtosnidade_rj.doc>. Acesso em: 25 agosto. 2012.

FLECTHER, D.L. Influence of sampling methodology on reported incidence of *salmonella* in poultry. *Journal of AOAC International*, v.89, p.512-516, 2006.

FUZHARA, T.O.; FERNANDES, S.A.; FRANCO, B.D.G.M. Prevalence and Dissemination of *Salmonella* Serotypes along the Slaughtering Process in Brazilian Small Poultry Slaughterhouses. *Journal of Food Protection*. n.12, p.1628-1760, 2000.

GAST, R. K. Paratyphoid infections. In: BARNES, H. J.; FADLY, A. M.; GLISSON, J. R.; MC DOUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. *Diseases of Poultry*. 11. ed. Iowa, EUA: Iowa State Press, 2003., cap. 16 p. 567-583. Seção 2.

GAUGAIN-JUHEL, M.; DELEPINE, B.; GAUTIER, S.; et al. Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry screening method to monitor 58 antibiotics in milk: a qualitative approach. *Food Additives and Contaminants Part A*., n. 26 p. 1459-1471, 2009.

GÓRNIAK, S. L.; SPINOSA, H. S. Antimicrobianos na Avicultura, usos e restrições, In: Andreatti Filho, R. L. *Saúde Aviária e Doenças*. Rio de Janeiro: Roca, 328 p., p.35-40, 2007.

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. Antigenic Formulae of the *Salmonella* Serovars. In: WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Collaborating Centre for Reference and Research on (Salmonella)*, 9ed., 2007.

Disponível em: http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadreocr/salmoms/WKLM_2007.pdf. Acesso em: 20 jan. 2009.

GOUVÊA, R. Comparação entre isolamento bacteriológico convencional e PCR na detecção de *Salmonella* spp. em amostras de carne de frango artificialmente contaminadas e de campo. 2008. 54f. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento tecnológico de Produtos de Origem Animal) - Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, 2008.

HALLING-SORENSEN, B.; NIELSEN, S.N.; LANZKY, P.F.; INGERSLEV, F.; LÜTZHOFT, H.C.H.; JORGENSEN, S.E. Occurrence, fate and effects of pharmaceuticals in the environment a review. *Chemosphere*, n.36, p.357-393, 1998.

HASMAN H, MEVIUS D, VELDMAN K, OLESEN I, AARESTRUP FM. B-lactamases among extended-spectrum-B-lactamase(ESBL)- resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother.*; 56:115–21, 2005

HOFER, E.; SILVA FILHO, S. J.; REIS, E. M. F. R. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.17, n.2, p.55-62, 1997.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9ed. Baltimore, Maryland: Williams e Wilkins, 1994. 816p. v.1.

HUR, J.; JAWALE, C.; LEE, J.H. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. *Food Research International*. v.45, p. 819-830, 2012.

JASSON, V.; JACXSENS, L.; LUNING, P.; RAJKOVIC, A.; UYTENDAELE, M., Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiol.* v.27, p.710-730, 2010.

JAY, J. M. *Microbiologia de alimentos*. 6ed. Porto Alegre, RS, Artmed, 2005.

JONES, D.D.; LAW, R.; BEJ, A.K.;. Detection of *Salmonella* spp. in oysters using Polymerase Chain Reactions (PCR) and gene probes. *J. Food Sci.* v.58, p.1191-1197, 1993.

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

LONE, K. P. Natural sex steroids and their xenobiotic analogs in animal production: Growth, carcass quality, pharmacokinetics, metabolism, mode of action, residues, methods, and epidemiology. *Critical Reviews. Food Science and Nutrition*, v.37, p.93–209. 1997

LOPES, M.; GALHARDO, J.A.; OLIVEIRA, J.T.; TAMANINI, R.; SANCHES, S.F.; MULLER, E.E. Pesquisa de *Salmonella* spp. e microrganismos indicadores em carcaças de frango e água de tanques de pré-resfriamento em abatedouro de aves. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v.28, n.3, p.465-476, 2007.

MANDRELL, R.E.; WACHTEL, M.R.; 1999. Novel detection techniques for human pathogens that contaminate poultry. *Curr. Opin. Biotechnol.* v.10, p.273–278.

MATIAS, B.G.; PINTO, P.S.A.; COSSI, M.V.C.; NERO, L.A. *Salmonella* spp. and Hygiene Indicator Microorganisms in Chicken Carcasses Obtained at Different Processing Stages in Two Slaughterhouses. *Foodborne Pathogens and Disease*. v.07, n.03, p.313-318, 2010

MEDEIROS MAN, OLIVEIRA DCN, RODRIGUES DP, FREITAS DRC. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. *Rev Panam Salud Publica*. 30(6):555–60, 2011.

MIZUMOTO, N.; SASAI, K.; TANI, H.; BABA, E. Specific adhesion and invasion of *Salmonella* Enteritidis in the vagina of laying hens. *Veterinary Microbiology*, v.111, p.99–105, 2005

MOLONEY, A.; ALLEN, P.; JOSEPH, R.; & TARRANT, V. (1991). Influence of beta-adrenergic agonists and similar compounds on growth. In: A. M. Pearson; T. R. Dutson, *Growth regulation in farm animals*. London: Elsevier Applied Science, 1991.629 p. cap. 14, p. 455–513

MYINT, M.S.; JOHNSON, Y.J.; TABLANTE, N.L.; HECKERT, R.A. The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. *Food Microbiology*. v.23, p.599-604, 2006.

NADVORNY, A.; FIGUEIREDO, D. M. S.; SCHMIDT, V. Ocorrência de *Salmonella* spp em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. *Acta Scientiae Veterinariae*, Porto Alegre, v. 32, n. 1, p. 47-51, 2004.

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard 8 Ed. 2003, Wayne, Pennsylvania USA.

OLIVEIRA, C.J.B.; CARVALHO, L.F.O.S. Infecções por *Salmonella* em suínos: panorama e perspectivas. *Suinocultura Industrial*. n.3, p.35-39, 2003.

OLIVEIRA, S.D.; FLORES, F.S.; DOS SANTOS, L.R.; BRANDELLI, A. Antimicrobial resistance in *Salmonella* enteritidis strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. *International Journal of Food Microbiology* V.97, P.297–305, 2005.

OLSEN, J.E.; BROWN, D.J.; MADSEN, M.; BISGAARD, M.. Crosscontamination with *Salmonella* on a broiler slaughterhouse line demonstrated by use of epidemiological markets. *Journal of Applied Microbiology*, v.95, p.826-835, 2003.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (OPAS). Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y a los animales: bacteriosis y micosis. *Publicación científica y técnica*. 3ed., v.1, n.580, p. 240-253, 2003.

PESSANHA RP, GONTIJO FILHO PP. Uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e resistência em isolados de *Escherichia coli* e de Enterobacteriaceae lactose-negativa da microflora fecal de frangos de corte. *Arq Bras Med Vet Zootec.*;53(1):111–5, 2001.

PICKLER, L.; SANTIN, E.; FICHER da SILVA, AV. Alternativas aos antibióticos para equilibrar a microbiota gastrointestinal de frangos. *Archives of Veterinary Science*, Paraná, v.16, n.3, p.1-13, 2011.

POSSEBON, F.S.; PASCHOAL DA COSTA, L.F.Z.; YAMATOGLI, R.S.; RODRIGUES, M.V.; SUDANO, M.T.; PINTO, J.P.A.N. A refrigeração no diagnóstico de *Salmonella* spp. utilizando o método microbiológico tradicional e reação em cadeia da polimerase em carcaças de frango. *Ciência Rural*, online, 2011.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W.J.; LEONARD, W.J. Agentes antimicrobianos. In: *Microbiologia Veterinária e Doenças Infeciosas*.1.ed. São Paulo: Artmed, 2005, 512 p.Cap. 6, p. 42-49.

RAGHIANTE, F.; ROCHA, T.S.; ROSSI, D.A.; SILVA, P.L. Penetration time of *Salmonella* Heidelberg through shells of white and brown commercial eggs. *Brazilian Journal of Poultry Science*, v.12, n.4, p.273 – 277, 2010.

RAHN, K.; DE GRANDIS, S.A.; CLARKE, R.C.; MCEWEN, S.A.; GALÁN, J.E.; GINOCCHIO, C.; CURTISS III; R., GYLES, C.L.; 1992. Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol. Cell. Probes*. v.6, p.271-279.

REZENDE, C.P.; ALMEIDA, M.P.; BRITO, R.B.; NONAKA, C.K.; LEITE, M.O. Optimisation and validation of a quantitative and confirmatory LC-MS method for multi-residue analyses of b-lactam and tetracycline antibiotics in bovine muscle. *Food Additives and Contaminants*. v.29, p.541-549, 2012.

RISSATO, D.P.; BORGIO, A.P.; MOREIRA, J.P.; BAPTISTA, F.; CONTI, A.C.M.; RIBEIRO, A.B. Detecção de *Salmonella* spp. em água de lavagem de carcaças de frango utilizando o método de Reação em Cadeia da Polimerase (pcr). *Revista Saúde e Pesquisa*, v.4, n.1, p.35-39, 2011.

ROOF, M.B.; ROTH, J.; KRAMER, T.T. Porcine salmonellosis: characterization, immunity, and potential vaccines. *Compendium. Food Animal*, v14, p 411-423, 1992.

SCHRANK, I.S. Aplicação de método baseado em PCR para a detecção de *Salmonella* em produtos da indústria avícola e em amostras clínicas. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, p.105, 2000.

SILVA SANTOS, D.M.; BERCHIERI JUNIOR, A.; FERNANDES, S.A.; TAVECHIO, A.T.; AMARAL, L.A. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas *Pesq. Vet. Bras.* v.20, p.39-42, 2000.

SOBESTIANSKY, J. *Doenças dos suínos*. 1 ed. Cânone Editorial, 2007. 768 p.

TESSARI, E.N.C. et al. *Salmonella* Enteritidis prevalence in broiler carcass industrially processed. *Higiene Alimentar*, v.17, p.52-55, 2003.

TESSARI, E.N.C.; CARDOSO, A.L.S.P.; KANASHIRO, A.M.I.; STOPPA, G.F.Z.; LUCIANO, R.L.; CASTRO, A.G.M. 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.38, n.9, p.2557-2560, 2008.

TIROLI, I.C.C.; COSTA, C.A. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos recém abatidos em feiras e mercados da cidade de Manaus-AM. *Acta Amazônica*. v.36. p. 205-206, 2006.

TYLOVA, T.; OLISOVSKA, J.; NOVAK, P.; FLIEGER, M.; High-throughput analysis of tetracycline antibiotics and their epimers in liquid hog manure using Ultra Performance Liquid Chromatography with UV detection. *Chemosphere*. v.78, p.353–359. 2010.

THRUSFIELD, M. In: *Veterinary Epidemiology*, 2^a ed., Blackwell Publishing. London, 2003.

UNGEMACH, FR.; MULLER-BAHRDT, D.; ABRAHAM, G. Guidelines for prudent use of antimicrobials and their implications on antibiotic usage in veterinary medicine. *International Journal of Medical Microbiology*. V.296, p33-38, 2006.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA (UBABEF). Disponível em: <<http://www.abef.com.br>>. Acesso em 01 julho 2012.

United States of América. Department of Agriculture (USDA). Food Safety and Inspection Service. *Microbiology Laboratory GuideBook*. 3rd Ed. 1998

VAZ, C.S.L.; STRECK, A.F.; MICHAEL, G.B.; MARKS, F.S.; RODRIGUES, D.P.; DOS REIS, E.M.F.; CARDOSO, M.R.I.; CANAL, C.W. Antimicrobial resistance and subtyping of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Enteritidis isolated from human outbreaks and poultry in southern Brazil. *Poultry Science* V.89, P.1530–1536, 2010.

VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. *J. Chromatogr A*. v.921 p.227-236, 2001.

WILSON, I.G. Antimicrobial resistance of *Salmonella* in raw retails chickens, imported chicken portions, and human clinical specimes. *Journal of Food Protection*, v.67, n.6, p.1220-1225, 2004.

WRAY, C.; WRAY, A. *Salmonella in Domestic Animals*. Wallingford: CABI Publishing, 2003, 463 p.