Patrícia Sofia Carneiro Antunes

Incidência e susceptibilidade a agentes antimicrobianos de *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* em produtos avícolas

Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

2001

Patrícia Sofia Carneiro Antunes

Incidência e susceptibilidade a agentes antimicrobianos de *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* em produtos avícolas

FACULDADE DE FARMÁCIA
U. P.
BIBLIOTECA
Data 07/09/04
Reg. 1519
Cota
FFM
ANT

Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

2001

Dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Controlo de Qualidade

apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Aos meus alunos de

Ciências da Nutrição

" Eu ouço e eu esqueço

Eu vejo e eu acredito

Eu faço e eu compreendo "

(Provérbio Chinês)

Agradecimentos

Às minhas orientadoras, Prof. Doutora Nazaré Pestana e Prof. Doutora Luísa Peixe, agradeço a total disponibilidade, o apoio e incentivo demonstrados ao longo dos últimos anos. Representarão sempre um exemplo para mim.

Ao meu Professor de Microbiologia, Prof. Doutor António Freitas da Fonseca, pelo acompanhamento e confiança depositada desde o início da minha carreira académica e por todos os ensinamentos que ficarão para sempre.

A todas as pessoas dos Departamentos de Microbiologia da Faculdade de Farmácia, da Faculdade de Medicina e da Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação da Universidade do Porto que me acompanharam e contribuíram para a realização deste mestrado.

Às minhas companheiras de bancada, Cristina, Sandra, Alexandra, Lucília e Carla, pela amizade e pela equipa que conseguimos formar.

Aos meus amigos, familiares, pais, irmã e ao Zé Manel por estarem sempre presentes nos bons e nos maus momentos.

Alguns dos resultados apresentados nesta Dissertação constam das seguintes publicações:

Antunes P., Sousa, J.C., Peixe, L., Réu, C., Pestana, N. 2000. Incidence and susceptibility to antimicrobial agents of *Listeria* and *Salmonella* isolated from poultry products. Spanish Journal of Chemotherapy vol 13, Suppl. 2, p. 69.

Antunes, P., Réu, C., Sousa, J.C., Pestana, N., Peixe, L. 2000. Incidência e susceptibilidade a agentes antimicrobianos de *Listeria monocytogenes* isoladas de aves. Arquivos de Medicina vol.14, Supl 3, p. 63.

Antunes P., Réu, C., Sousa, J.C., Peixe, L., Pestana, N. 2000. Incidence and susceptibility to antimicrobial agents of *Listeria* spp. isolated from poultry products. Abstract Book - Food Safety.

Antunes P., Réu, C., Sousa, J.C., Peixe, L., Pestana, N. 2000. Incidence and susceptibility to antimicrobial agents of *Salmonella* isolated from poultry products. Abstract Book - Food Safety.

Resumo

Actualmente, *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* são consideradas bactérias emergentes transmitidas por alimentos, sendo os produtos avícolas veículos frequentes de transmissão. Além disso, o uso difundido de antibióticos na produção intensiva de animais de consumo tem contribuído para que estas bactérias se tornem cada vez mais resistentes aos agentes antimicrobianos.

Neste trabalho foi avaliada a incidência de *Salmonella* e *L.monocytogenes* em aves de produção nacional disponíveis para o consumidor e foi estudado o comportamento dos isolados face a vários agentes antimicrobianos usados em terapêutica humana e/ou animal. Os resultados obtidos indicam que as amostras de aves estão frequentemente contaminadas com *Salmonella* (60%), principalmente dos serótipos *S*.Enteritidis e *S*.Hadar, *Listeria* spp. (100%) e *L.monocytogenes* (41%). Foi aplicado um método de PCR multiplex para identificação das espécies de *Listeria*, que se mostrou em total conformidade com o método convencional de identificação bioquímica, para além de ser mais rigoroso, mais rápido e menos trabalhoso. Adicionalmente, verificou-se também uma elevada frequência de isolados de *Salmonella* (75%), *Listeria* spp. (84%) e *L.monocytogenes* (73%) resistentes a um ou mais agentes antimicrobianos de vários grupos. Salienta-se a resistência à enrofloxacina e à clindamicina em isolados de *L.monocytogenes* e a proporção de *Listeria* spp. multiresistentes (30%), nomeadamente *L.innocua* (44%) e *L.monocytogenes* (23%). Em isolados de *Salmonella* a resistência ao ácido nalidíxico e à enrofloxacina foi a mais frequente e verificou-se uma menor incidência de isolados de *S*.Enteritidis resistentes e multiresistentes relativamente a *S*.Hadar. Foi também relevante, a associação da resistência à amoxicilina a plasmídeos conjugativos em cinco isolados de *Salmonella*.

Os resultados do presente estudo mostram que as aves podem ser um veículo potencial de infecções de origem alimentar causadas por estirpes de *Salmonella* e *L.monocytogenes* resistentes a agentes antimicrobianos. É sugerida a necessidade de intervenções no âmbito da saúde pública, com vista à educação dos consumidores em segurança alimentar e ao controlo do uso de antibióticos em produção animal para prevenir a ocorrência de estirpes resistentes nos animais e subsequentemente nos humanos. Assim, é importante avaliar a incidência de bactérias patogénicas zoonóticas em alimentos de origem animal e estudar a susceptibilidade a agentes antimicrobianos utilizados em terapêutica humana e/ou animal.

Abstract

Salmonella and *Listeria monocytogenes* have been recognised as emerging foodborne pathogens, being poultry products frequent vehicles of transmission. In addition, the widespread use of antibiotics in intensive food animal production may have caused these bacteria to become more and more resistant to antimicrobial agents.

In this work, the incidence of *Salmonella* and *L.monocytogenes* in poultry of national origin available for consumers and the susceptibility to antimicrobial agents allowed for human or animal therapeutics were evaluated. The results show that poultry samples are frequently contaminated with *Salmonella* (60%), especially *S.*Enteritidis and *S.*Hadar, *Listeria* spp. (100%) and *L.monocytogenes* (41%). A multiplex PCR method was used for identification of *Listeria* species, showing total conformity with the conventional method of biochemical identification, and proved to be more reliable, faster and less arduous. In addition, a high frequency of *Salmonella* (75%), *Listeria* spp. (84%) and *L.monocytogenes* (73%) isolates were resistant to one or more antimicrobial agents of different groups. It is worth pointing out the resistance to enrofloxacin and clindamycin of *L.monocytogenes* isolates and the multiresistant *Listeria* spp. (30%), including *L.innocua* (44%) and *L.monocytogenes* (23%) isolates. In *Salmonella* isolates the highest frequency of resistance was to nalidixic acid and enrofloxacin, and *S.*Enteritidis isolates were less resistant and multiresistant than *S.*Hadar. The association of amoxicillin resistance to conjugative plasmids of five *Salmonella* isolates was also relevant.

The results of the present study show that poultry could be a potential vehicle of foodborne infections due to strains of *Salmonella* and *L.monocytogenes* resistant to antimicrobial agents. This suggests the need for public health interventions in order to make consumers aware of food safety and to control the use of antibiotics in animal production to prevent the occurrence of resistant strains in food animals and subsequently in humans. Thus, it is important to evaluate the incidence of zoonotic pathogens in food of animal origin and to test for susceptibility to antimicrobial agents allowed for human or animal therapeutics.

Índice

I) Introdução 1

1) Doenças transmitidas por alimentos 1

1.1) Salmonelose 3
1.1.1) Dados epidemiológicos 3
1.1.2) *Salmonella* em aves 6
1.1.3) Fontes de contaminação das aves com *Salmonella* 10
1.1.4) Prevenção e controlo na cadeia de produção de aves 14
1.1.5) Características da salmonelose 17
1.2) Listeriose 18
1.2.1) Dados epidemiológicos 18
1.2.2) *Listeria monocytogenes* em aves 21
1.2.3) Fontes de contaminação das aves com *L.monocytogenes* 23
1.2.4) Prevenção e controlo na cadeia de produção de aves 28
1.2.5) Características da listeriose 32

2) Bactérias zoonóticas resistentes a agentes antimicrobianos 35

2.1) Uso de agentes antimicrobianos em animais de consumo 35
2.2) Consequências do uso de antimicrobianos nos animais 36
2.3) Impacto na Saúde Pública do uso de antimicrobianos nos animais 37
2.3.1) Emergência de resistência em *Salmonella* 39
2.3.2) Emergência de resistência em *Listeria* spp. e *L.monocytogenes* 43
2.4) Prevenção e controlo da emergência de bactérias zoonóticas resistentes 46

II) Objectivos 51

III) Material e métodos 52

1) Amostragem 52

2) Isolamento e identificação 53
2.1) *Salmonella* spp. 53
2.2) *Listeria* spp. e *L.monocytogenes* 53
2.2.1) Identificação por métodos convencionais 54
2.2.2) Identificação por PCR 54

3) Ensaios de susceptibilidade a agentes antimicrobianos 57
3.1) Método de difusão em agar com discos 57
3.2) Método de difusão em agar com tiras (Etest) 57

4) Estudo de mecanismos de resistência aos antibióticos β-lactâmicos 58
4.1) Determinação do ponto isoeléctrico das β-lactamases 58
4.2) Prova da acção sinérgica de dois discos 58
4.3) Ensaios de conjugação 58

IV) Resultados 60

1) Estudo da incidência 60
1.1) *Salmonella* spp. 60
1.2) *Listeria* spp. e *L.monocytogenes* 61
1.2.1) Comparação dos métodos utilizados para identificação 62

2) Estudo da susceptibilidade a agentes antimicrobianos 64
2.1) *Salmonella* spp. 64
2.1.1) Estudo de mecanismos de resistência aos β-lactâmicos 67
2.2) *Listeria* spp. e *L.monocytogenes* 68

V) Discussão 70

1) Estudo da incidência 70
1.1) *Salmonella* spp. 70
1.2) *Listeria* spp. e *L.monocytogenes* 75
1.2.1) Comparação dos métodos utilizados para identificação 78

2) Estudo da susceptibilidade a agentes antimicrobianos 81
2.1) *Salmonella* spp. 81
2.1.1) Resistência e multiresistência 81
2.1.2) Resistência às quinolonas 85
2.1.3) Resistência aos aminoglicosídeos 90
2.1.4) Resistência às tetraciclinas 92
2.1.5) Resistência aos β-lactâmicos 94
2.1.5.1) Estudo de mecanismos de resistência 98
2.1.6) Resistência ao cloranfenicol 100
2.1.7) Resistência ao trimetoprim/sulfametoxazol 101

2.2) *Listeria* spp. e *L.monocytogenes* 103
2.2.1) Resistência e multiresistência 103
2.2.2) Resistência aos macrólidos e lincosamidas 104
2.2.3) Resistência às fluoroquinolonas 107
2.2.4) Resistência às tetraciclinas 107
2.2.5) Resistência aos aminoglicosídeos 109
2.2.6) Resistência a outros agentes antimicrobianos 110

VI) Conclusões 113

VII) Bibliografia 116

Lista de figuras

1 – Ciclo de *Salmonella* na cadeia de produção de aves. Adaptado de Evans *et al* (1999). 11

2 – Regiões nos genes *iap* de ligação dos *primers* seleccionados para identificação por PCR de *Listeria* spp.. Adaptado de Bubert *et al* (1999). 55

3 – Electroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação obtidos no PCR multiplex para identificação de Listeria spp. e coloração com brometo de etídio. 63

4 – Determinação do pI das β-lactamases por focagem isoeléctrica em sistema Phast-System (Pharmacia) e revelação com nitrocefin. 67

Lista de quadros

1 – Incidência de *Salmonella* spp. por origem das amostras 60

2 – Serótipos de *Salmonella* por tipo de amostra 61

3 – Incidência de *Listeria* spp. e *L.monocytogenes* por origem das amostras 61

4 – Comparação entre identificação bioquímica (API-*Listeria*) e ensaio PCR 62

5 – Resistência aos antimicrobianos dos isolados de *Salmonella* spp. 64

6 – CMI dos isolados de *Salmonella* spp. resistentes 65

7 – Padrões de resistência dos isolados de *Salmonella* spp. 65

8 – Relação entre serótipos de *Salmonella* e resistência aos antimicrobianos 66

9 - Relação entre serótipos de *Salmonella* e padrões de resistência aos antimicrobianos 66

10 – Resistência aos antimicrobianos dos isolados de *Listeria* spp. 68

11 – Padrões de resistência dos isolados de *Listeria* spp. 69

Abreviaturas

ACSSuT – fenótipo de resistência à ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamidas e tetraciclina

ATCC – *American Type Culture Collection*

bp – pares de bases

CDC – *Centers for Disease Control (Atlanta, United States of America)*

CFU – unidades formadoras de colónias

CMI – concentração mínima inibitória

DNA – ácido desoxirribonucleico

dNTP – mistura de nucleotidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

EDTA – ácido etilenodiaminotetraacético

HACCP – *Hazard Analysis and Critical Control Points*

Kb – kilobases

LMR – limite máximo de resíduos

NARMS – *National Antimicrobial Resistance Monitoring System*

NCCLS – *National Commitee for Clinical Laboratory Standards*

OMS – Organização Mundial de Saúde

PCR – p*olymerase chain reaction*

pI – ponto isoeléctrico

PT – fagotipo

SIDA – síndroma da imunodeficência adquirida

SXT – trimetoprim/sulfametoxazol

TAE – Tris acetato EDTA

VIH – vírus da imunodeficiência humana

I) Introdução

1) Doenças transmitidas por alimentos

As doenças de origem alimentar apresentam-se largamente difundidas e têm um grande impacto nas populações, quer de países em vias de desenvolvimento, quer de países desenvolvidos, de tal modo que produzir alimentos seguros continua a ser um problema de saúde pública em todo o mundo, apesar dos grandes avanços tecnológicos (Tauxe, 1997; Kaferstein e Abdussalam, 1999). Adicionalmente às implicações na saúde (morbilidade e mortalidade), particularmente entre crianças, idosos e outros grupos susceptíveis, estão associados a estas doenças custos económicos substanciais (Notermans e Hoogenboom-Verdegaal, 1992; Mossel *et al*, 1995).

Os dados estatísticos disponíveis confirmam que tem ocorrido um aumento significativo na incidência de doenças transmitidas por alimentos durante as últimas décadas (Sockett, 1993; Mossel *et al*, 1995; Schmidt, 1998; Kaferstein e Abdussalam, 1999). Apesar da melhoria dos sistemas de registo, estes ainda são muito limitados, de modo que os dados continuam provavelmente a representar apenas uma fracção do número real de casos, sendo difícil fazer uma estimativa da sua verdadeira incidência (WHO, 1992; Sockett, 1993; Mossel *et al*, 1995; Schmidt, 1998). Estima-se que apenas 1 a 10% dos incidentes que ocorrem sejam registados (Notermans e Hoogenboom-Verdegaal, 1992; WHO, 1992; Mossel *et al*, 1995; Schmidt, 1998).

Na origem destas doenças pode estar uma grande diversidade de agentes, quer biológicos (bactérias e toxinas bacterianas, parasitas, vírus, toxinas em animais e plantas, fungos e micotoxinas), quer químicos (contaminantes e resíduos) (Notermans e Hoogenboom-Verdegaal, 1992; Roberts, 1993; WHO, 2000a). No entanto, as causas mais comuns são provavelmente microrganismos, especialmente bactérias (Notermans e Hoogenboom-Verdegaal, 1992; Roberts, 1993; Sockett, 1993).

De acordo com os dados disponíveis, as doenças de origem alimentar mais comuns incluem a salmonelose, a campilobacteriose e as intoxicações causadas por *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens* (Sockett, 1993; Mossel *et al*, 1995). Actualmente, são considerados emergentes e associados aos alimentos microrganismos como *Salmonella* Enteritidis[1] e outras *Salmonella* resistentes aos agentes antimicrobianos[2],

[1] Neste trabalho vai ser utilizada a nomenclatura proposta pelo CDC baseada em recomendações da OMS para os membros do género *Salmonella*, isto é, a seguir ao género o nome dos serótipos começa por letra maiúscula e aparece sem itálico (Brenner *et al*, 2000).

[2] Neste trabalho os termos "agente antimicrobiano" e "antibiótico" são usados com o mesmo significado, ou seja, qualquer substância de origem natural, semi-sintética ou sintética capaz de destruir um microrganismo ou de impedir o seu crescimento (WHO, 1997).

Campylobacter jejuni, *Escherichia coli* O157:H7, *Vibrio vulnificus*, novas estirpes de *Vibrio cholerae*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Cyclospora cayetanensis* e *Cryptosporidium* (Notermans e Hoogenboom-Verdegaal, 1992; Tauxe, 1997; Slutsker *et al*, 1998; Kaferstein e Abdussalam, 1999).

Actualmente, estas infecções e intoxicações de origem alimentar agudas são uma preocupação para os governos e para a indústria alimentar muito maior do que algumas décadas atrás, pois os factores que contribuem para a emergência destas doenças continuam a aumentar (Mossel *et al*, 1995; Slutsker *et al*, 1998). Além disso, é provável que a segurança alimentar receba ainda mais atenção no século XXI, especialmente porque algumas alterações globais, já em progresso, parecem ter predominantemente efeitos adversos neste campo, ou seja irão contribuir para o aumento destas doenças (Kaferstein e Abdussalam, 1999). O crescimento da população mundial e a migração, o uso difundido de antibióticos, o aumento do número de pessoas com maior susceptibilidade, a globalização do comércio alimentar, as alterações na produção dos alimentos, as alterações no estilo de vida, as alterações ambientais e a adaptação dos microrganismos são alguns dos factores responsáveis pela emergência das doenças infecciosas, particularmente das transmitidas por alimentos (Notermans e Hoogenboom-Verdegaal, 1992; Slutsker *et al*, 1998; Kaferstein e Abdussalam, 1999; Osterholm, 2000).

A necessidade de produção em grande escala de animais de criação conduziu a uma grande proporção desses animais portadores de microrganismos patogénicos para o Homem (Mossel *et al*, 1995). Assim, muitas bactérias patogénicas transmitidas por alimentos têm reservatórios em animais de criação saudáveis, a partir dos quais se difundem para uma grande variedade de alimentos (Tauxe, 1997). As práticas intensivas aplicadas à produção de aves contribuem para que estas sejam veículos importantes de vários agentes etiológicos de doenças transmitidas por alimentos, como mostram os registos dos USA revistos por Bryan e Doyle (1995) e como demonstram os dados epidemiológicos mais recentes referentes a países europeus em que os produtos avícolas continuam a ser um dos veículos mais frequentemente registados (WHO, 2000a).

Tal como foi referido atrás, quer a salmonelose, quer a listeriose, são duas infecções associadas ao consumo de alimentos contaminados, incluindo aves. Pelo elevado número de casos causados por *Salmonella* e pela gravidade das infecções por *L.monocytogenes*, podemos considerar estes dois agentes etiológicos de doenças transmitidas por alimentos como dos mais importantes que actualmente atingem os países industrializados. Além disso, muitos dos patogénicos zoonóticos emergentes, incluindo *Salmonella* e *L.monocytogenes*, estão a tornar-se cada vez mais resistentes a agentes antimicrobianos, principalmente devido ao uso difundido de antibióticos nos reservatórios animais (Tauxe, 1997).

1.1) Salmonelose

1.1.1) Dados epidemiológicos

Nos últimos anos, de acordo com os registos epidemiológicos disponíveis, *Salmonella* "não tifóide" continua a ser o principal microrganismo patogénico transmitido por alimentos. As salmoneloses têm sido assim um problema grave de saúde pública, apesar da taxa de mortalidade ser baixa, pois são uma doença de origem alimentar frequente em muitos países (Humphrey *et al*, 1988; Sockett, 1993; D'Aoust, 1994; Bryan e Doyle, 1995; Mossel *et al*, 1995; D'Aoust, 1997).

Na Europa, os dados do Programa de Vigilância da OMS (*WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe*) indicam *Salmonella* como o agente etiológico predominante das doenças transmitidas por alimentos durante os últimos anos (WHO, 1992; Schmidt, 1998; WHO, 2000a), sendo responsável por 84,5% de todos os surtos em que foi identificado um agente (Schmidt, 1998). Em Portugal, de acordo com os estudos de 1987 a 1991 (Novais, 1993) e de 1992 a 1997 (Campos Cunha *et al*, 1998) as salmoneloses foram as doenças de origem alimentar mais frequentes, representando 26,1% e 38,4% do total de surtos. Nos USA, *Salmonella* também tem sido o agente bacteriano de doenças transmitidas por alimentos com etiologia conhecida mais frequente, sendo responsável por 42% dos surtos de 1973 a 1987 (Bean e Griffin, 1990), por 69% entre 1988 e 1992 (Bean *et al*, 1997) e por 55% entre 1993 e 1997 (CDC, 2000a). Do mesmo modo, em países da América Latina (Estupiñan, 1998), no Japão e Coreia (Lee *et al*, 1996) a *Salmonella* é um dos agentes mais frequentes, apesar de não ser o principal.

Adicionalmente, durante as últimas décadas a incidência de salmonelose transmitida por alimentos aumentou consideravelmente no mundo industrializado atingindo mesmo proporções epidémicas em vários países (WHO, 1992; Mishu *et al*, 1994; D'Aoust, 1997; Schmidt, 1998), pelo que *Salmonella* é considerada actualmente uma das bactérias emergentes (Notermans e Hoogenboom-Verdegaal, 1992; Tauxe, 1997; Slutsker *et al*, 1998).

Este aumento na incidência da salmonelose é o resultado de uma combinação de vários factores, aliás comuns a outros agentes também considerados emergentes: alterações nas práticas de produção animal (produção mais intensiva e maior industrialização em todas as fases de produção) e uso de rações, particularmente de origem animal, contaminadas com *Salmonella*; alterações nos hábitos alimentares (mais pessoas consomem alimentos de origem animal crus ou mal cozinhados); alterações nas práticas de manipulação, armazenamento, distribuição e preparação dos alimentos (alguns procedimentos promovem a disseminação e crescimento de *Salmonella*); produção

alimentar mais centralizada e maior comércio internacional de alimentos; aumento da população com maior susceptibilidade (Oosterom, 1991; D'Aoust, 1994; Bryan e Doyle, 1995; Kapperud *et al*, 1998). Embora haja actualmente uma melhoria dos sistemas de vigilância, os aumentos globais de salmonelose transmitida por alimentos são considerados reais, não resultando da progressão nos programas de vigilância e/ou de maiores recursos disponíveis para a sua detecção pelas entidades de saúde pública (D'Aoust, 1997). No entanto, a incidência real de salmonelose, tal como de outras doenças de origem alimentar, é largamente desconhecida devido ao subregisto dos incidentes pelas autoridades de vigilância (Mossel *et al*, 1995).

Os factores de risco para salmonelose variam entre os países de acordo com padrões culturais, factores climáticos, práticas agrícolas e de produção animal e implementação de medidas de controlo e prevenção (Kapperud *et al*, 1998). Por exemplo, na Noruega, país onde a incidência é menor do que na maioria dos países europeus, os factores que podem justificar esse facto são, para além do clima frio do norte da Europa, a produção animal ser menos intensiva do que em muitos países industrializados e 95% dos produtos cárneos vendidos a retalho serem de produção nacional (Kapperud *et al*, 1998).

Os serótipos envolvidos nas infecções alimentares por *Salmonella* também variam geograficamente, mas enquanto alguns mantém o seu papel dominante, outros emergem ou diminuem ao longo do tempo (ICMSF, 1996a). Assim, durante décadas *S.*Typhimurium predominou ao causar a maioria dos casos de salmonelose humana, ocorrendo depois nos anos 80 um aumento significativo de *S.*Enteritidis, tornando-se o serótipo dominante até à actualidade em muitos países (Sockett, 1993; ICMSF, 1996a; Sakai e Chalermchaikit, 1996; Schmidt, 1998).

Na Europa, os dados registados por vários países relativamente a salmonelose de origem alimentar indicam que *S.*Enteritidis tem sido o serótipo mais frequente (Schmidt, 1998; WHO, 2000a), com uma participação entre 50 e 90% (Schmidt, 1998). Do mesmo modo, em Portugal, *S.*Enteritidis também foi o agente etiológico mais comum de doenças transmitidas por alimentos entre 1987 e 1991 (Novais, 1993) e entre 1992 e 1997 (Campos Cunha *et al*, 1998).

Os dados da rede europeia de vigilância de *Salmonella* relativamente aos isolados humanos mantêm a tendência de *S.*Enteritidis se sobrepor a *S.*Typhimurium (Fisher, 1997; Fisher, 2000). Além disso, foram esses dois os principais serótipos, como demonstram os dados de 1993 a 1995 em que representaram 75% (Fisher, 1997) e os de 2000 em que cerca de 80% dos isolados foram *S.*Enteritidis (66,3%) e *S.*Typhimurium (13,4%) (Fisher, 2000). Em Portugal, os dados da vigilância epidemiológica laboratorial indicam também que o serótipo *S.*Enteritidis foi o mais frequentemente isolado de todas as fontes (humanas,

animais e alimentares), representando 52,9% entre 1995 e 1998 (INSA, 1999) e 63% em 1999 (INSA, 2000). O serótipo *S*.Typhimurium foi o segundo mais isolado, correspondendo a 17,4% das estirpes isoladas entre 1995 e 1998 (INSA, 1999) e a 15,8% em 1999 (INSA, 2000).

Nos USA, foi em 1990 que pela primeira vez *S*.Enteritidis se tornou o serótipo mais frequentemente registado, ultrapassando *S*.Typhimurium, e sendo responsável por um aumento do número de surtos entre 1985 e 1991 (Mishu *et al*, 1994). Nos últimos anos, a maioria dos surtos causados por *Salmonella* continua a ser da responsabilidade de *S*.Enteritidis, 60% entre 1988 e 1992 (Bean *et al*, 1997) e 55% entre 1993 e 1997, sendo este serótipo também o agente mais frequente de doenças transmitidas por alimentos nesse país (CDC, 2000a).

No entanto, no Canadá a incidência de infecções em humanos por S.Enteritidis aumentou apenas ligeiramente nos anos 90, não sendo tão drástica como na Europa e USA, onde este serótipo ultrapassou *S*.Typhimurium e se tornou o mais frequente (Poppe, 1994). Os dados registados por Khakhria *et al* (1997) relativos a esse país entre 1983 e 1992, confirmam este facto, pois o serótipo de *Salmonella* mais frequentemente isolado de fontes humanas e não humanas foi *S*.Typhimurium, também responsável por grande parte dos surtos de origem alimentar.

O crescimento do comércio internacional de produtos alimentares tem facilitado a introdução de novos serótipos de *Salmonella* dentro das fronteiras geográficas dos países importadores (D'Aoust, 1994). Assim, na Europa, para além de *S*.Enteritidis e *S*.Typhimurium, constata-se que muitos outros serótipos são actualmente isolados de humanos, salientando-se *S*.Hadar (1,8%) e *S*.Virchow (1,6%), terceiro e quarto em frequência (Fisher, 2000). No Canadá, entre 1983 e 1992, *S*.Hadar foi outro serótipo de *Salmonella* frequentemente isolado de fontes humanas (11,4%) e não humanas (9,9%) (Khakhria *et al*, 1997). Em Portugal, também vários serótipos de *Salmonella* são isolados, mas com uma frequência muito inferior aos dois principais já referidos (INSA, 1999; INSA, 2000). Por outro lado, o turismo também tem sido responsável por alguns serótipos terem apresentado aumentos na frequência de isolamento em 1999 e 2000 na Europa (Fisher, 2000). No entanto, por exemplo, na Noruega, em contraste com a situação na maioria dos países europeus, cerca de 90% dos casos de salmonelose são adquiridos fora do país (casos importados), sendo o nível de infecção local comparativamente baixo, como já foi referido (Kapperud *et al*, 1998). Esta situação é semelhante à da Suécia, onde 80 a 85% das infecções por *Salmonella* registadas são adquiridas fora do país (Wierup *et al*, 1995).

Também relativamente aos fagotipos de *Salmonella*, principalmente de *S*.Enteritidis, se verificam diferenças geográficas (Rodrigue *et al*, 1992; Sockett, 1993). Assim, no Canadá

e USA, os fagotipos (PT) de *S.*Enteritidis mais isolados de humanos e responsáveis pela maior parte das infecções foram PT 8 seguido por PT 13 e PT 13a (Rodrigue *et al*, 1992; Poppe, 1994; Mishu *et al*, 1994; Khakhria *et al*, 1997). Em contraste, na Europa os fagotipos mais frequentes são PT 4 e PT 1 (Sockett, 1993). No Reino Unido, a epidemia de *S.*Enteritidis tem sido causada predominantemente pelo fagotipo 4 (Ward *et al*, 2000), responsável pela maioria dos casos de salmonelose (Threlfall *et al*, 1997a). Também em Itália, a maioria dos surtos causados por *S.*Enteritidis entre 1991 e 1994 foram causados por PT 4 (64,8%), seguido por PT 1 (14,8%) (Scuderi *et al*, 1996). Em Portugal, os principais fagotipos de *S.*Enteritidis de origem humana foram também PT 1 e PT 4 entre 1995 e 1998 (INSA, 1999). Os dados de 1999 (INSA, 2000) indicam PT 1b e PT 4b à frente de PT 4 e de PT 1.

Relativamente aos fagotipos de *S.*Typhimurium, o DT104 é actualmente o mais referido. Por exemplo, no Reino Unido, *S.*Enteritidis PT 4 é responsável por mais casos de salmonelose humana, mas desde 1992 que *S.*Typhimurium DT104, sendo a maior parte multiresistente, constitui a segunda estirpe de *Salmonella* mais frequentemente isolada de casos de gastroenterite (Threlfall *et al*, 1997a). O' Brien *et al* (2000) referem mesmo que entre 1999 e 2000 o número de casos de infecção com essa estirpe multiresistente aumentou significativamente em Inglaterra e País de Gales. Em Portugal, os principais fagotipos de *S.*Typhimurium isolados de salmoneloses humanas foram entre 1995 e 1998 também o 104 (INSA, 1999) e em 1999 o U302 e o 104 (INSA, 2000).

1.1.2) *Salmonella* em aves

Salmonella é um microrganismo largamente difundido no ambiente, mas são os animais os maiores reservatórios desta bactéria. Reside no tracto intestinal dos animais colonizados, podendo ser encontrada nas fezes de quase todos, incluindo aves (Oosterom, 1991; Notermans e Hoogenboom-Verdegaal, 1992; ICMSF, 1996a; D'Aoust, 1997).

Assim, os alimentos de origem animal, incluindo as aves, são uma das principais fontes de microrganismos patogénicos, incluindo *Salmonella* (Humphrey *et al*, 1988; Oosterom, 1991; Roberts, 1993; Bryan e Doyle, 1995; Mossel *et al*, 1995; ICMSF, 1996a; Headrick e Tollefson, 1998). É de salientar que, em Portugal, os produtos avícolas (ovos e carne de aves) foram responsáveis por 80% dos isolamentos de *Salmonella* nos alimentos em 1999 (INSA, 2000) e por 41% entre 1995 e 1998 (INSA, 1999). Relativamente às estirpes de *Salmonella* dos animais, verificou-se que 87% dos isolamentos entre 1995 e 1998 (INSA, 1999) e 83,5% em 1999 (INSA, 2000) foram efectuados em aves. Genericamente, a prevalência de *Salmonella* em aves varia muito com os estudos, como se verifica na revisão de Bryan e Doyle (1995) onde a percentagem varia entre os 2 e os 100%.

A ocorrência de *Salmonella* regista-se não só durante o processamento das aves, mas também nas carcaças de aves vendidas a retalho, indicando a distribuição largamente difundida desta bactéria (Bryan e Doyle, 1995).

A ocorrência de *Salmonella* no ambiente, juntamente com práticas intensivas aplicadas à produção animal, tem contribuído para a prevalência desta bactéria na cadeia alimentar, particularmente em aves, e consequentemente para o risco de aquisição de salmonelose (D´Aoust, 1992; Bryan e Doyle, 1995). Assim, em muitos países, os produtos de origem animal, incluindo aves e derivados, são os veículos mais frequentemente implicados em surtos de doenças transmitidas por alimentos, particularmente salmonelose (Oosterom, 1991; WHO, 1992; Sockett, 1993; Bryan e Doyle, 1995; Schmidt, 1998; WHO, 2000a). Além dos ovos e derivados, as carnes de peru e frango são frequentemente identificadas como veículos em surtos desta etiologia (ICMSF, 1996a; Uyttendaele *et al*, 1998), como demonstram Bryan e Doyle (1995) na revisão sobre este tema. Em Portugal, os dados disponíveis indicam que os alimentos com ovos (Novais, 1993) e as refeições cozinhadas (Campos Cunha *et al*, 1998), com diferentes componentes, incluindo carne, foram os alimentos mais frequentemente envolvidos em surtos causados por *S*.Enteritidis. Excepcionalmente na Noruega, não se demonstrou associação estatisticamente significativa entre salmonelose humana e o consumo de produtos nacionais, incluindo aves e ovos, sendo o único factor associado com risco aumentado de salmonelose o consumo de aves adquiridas noutros países (Kapperud *et al*, 1998). Adicionalmente, embora a maioria dos casos de salmonelose seja de origem alimentar, o contacto directo com aves, nomeadamente pintos e patos, também tem estado na origem de vários surtos ocorridos nos USA (CDC, 1997; CDC, 2000b).

Para além dos surtos e casos registados, outro aspecto que contribui para as aves serem consideradas um veículo importante de transmissão de salmonelose humana é o facto dos serótipos de *Salmonella* isolados de aves serem semelhantes aos isolados em humanos, como tem sido documentado em vários estudos. Assim, em Portugal, entre 1995 e 1998 (INSA, 1999), *S*.Enteritidis foi o serótipo mais frequentemente isolado de humanos (65,4%), ovos (98,6%) e carne de frango (65%). Os dados nacionais referentes a 1999 mostram a mesma tendência, ou seja, *S*.Enteritidis foi o principal serótipo em isolados humanos (70,6%), aves (73,8%), ovos (93,5%) e carne de frango (55%) (INSA, 2000). No nosso país, já entre 1986 e 1989 se tinha verificado que em aves predominava o serótipo *S*.Enteritidis, relativamente aos outros serótipos isolados (WHO, 1992). Em Itália, no estudo de Scuderi *et al* (1996) entre 1991 e 1994, os surtos associados com aves foram causados apenas por *Salmonella* do serótipo Enteritidis, principal responsável pelos surtos, e não por S.Typhimurium ou outros. Na Tailândia, os resultados do estudo de Sakai e Chalermchaikit (1996) mostram um aumento simultâneo de *S*.Enteritidis em isolados humanos e em carne

de frango nos últimos anos, sugerindo que o aumento de casos humanos deve estar associado com o consumo de aves, e não com outros alimentos onde os isolamentos deste serótipo continuam a não ser significativos. As razões para o aumento da prevalência de *S*.Enteritidis em humanos são provavelmente multifactoriais, no entanto, as investigações sugerem que esse aumento esteja associado com o consumo de aves, consideradas uma das principais fontes da infecção (Poppe, 1994; Sakai e Chalermchaikit, 1996).

Actualmente, alguns autores sugerem mesmo que um dos factores responsáveis pelo início da emergência de *S*.Enteritidis em humanos pode ter sido a erradicação de *S*.Gallinarum das aves, o que terá facilitado a circulação de estirpes de S.Enteritidis (Baumler *et al*, 2000; Rabsch *et al*, 2000). Pela análise retrospectiva de dados epidemiológicos dos USA, Reino Unido e Alemanha observa-se que existe uma relação inversa entre a incidência de infecções por *S*.Gallinarum nas aves e as infecções humanas por *S*.Enteritidis, o que permite colocar a hipótese de *S*.Enteritidis ter ocupado o nicho ecológico deixado vago pela erradicação do serótipo *S*.Gallinarum (biovars Gallinarum e Pullorum) das aves (Baumler *et al*, 2000; Rabsch *et al*, 2000). O facto de *S*.Gallinarum e *S*.Pullorum serem patogénicas para as aves e causarem altas taxas de mortalidade e, por isso, causadoras de grandes danos económicos na indústria de aves, conduziu ao estabelecimento de programas para eliminação destes agentes (ICMSF, 1996a, Baumler *et al*, 2000). Antes desta situação ocorrer as aves colonizadas por *S*.Gallinarum estavam imunizadas contra *S*.Enteritidis, pois partilham o mesmo antigénio de superfície O9, evitando-se que *S*.Enteritidis circulasse nos bandos (Baumler *et al*, 2000; Rabsch *et al*, 2000). Por outro lado, a prevalência de *S*.Typhimurium nas aves não foi afectada pela eliminação de *S*.Gallinarum, pois estes serótipos possuem antigénios diferentes, o que está de acordo com o facto da incidência de infecções por *S*.Typhimurium se ter mantido relativamente constante (Baumler *et al*, 2000; Rabsch *et al*, 2000). Assim, a análise feita pelos autores sugere que *S*.Gallinarum, antes de ser erradicada no início do séc. XX, foi capaz de excluir por competição *S*.Enteritidis dos bandos de aves (Rabsch *et al*, 2000).

Embora os serótipos que se estabeleceram nas aves não causem doença nesses animais, as aves tornaram-se reservatório, sendo por isso fontes mais importantes de contaminação de alimentos do que as aves doentes que provavelmente seriam eliminadas durante a inspecção (ICMSF, 1996a). Por exemplo, num período de 8 anos em surtos no Reino Unido por *S*.Enteritidis e *S*.Hadar associados com perus verificou-se que estas bactérias não causaram perdas significativas nesses animais e a taxa de mortalidade foi normal, no entanto, as aves estiveram na origem desses surtos, tendo sido o reservatório, excretando e transmitindo *Salmonella* (Payne e Scudamore, 1977).

Adicionalmente, a relação epidemiológica entre as estirpes de *S*.Enteritidis de casos humanos e aves pode ser provada por fagotipagem ou por outros métodos de tipagem.

Assim, frequências similares de isolamento de determinados fagotipos de *S*.Enteritidis em aves e humanos sugerem que estes animais constituem uma importante fonte de infecção por *S*.Enteritidis para os humanos (Poppe, 1994). Por exemplo, em Portugal os fagotipos mais frequentes de *S*.Enteritidis (PT 1b, PT 6a, PT 4b, PT 4 e PT 14b) estão presentes em pelo menos três fontes de isolamento (animal, alimento e humano), verificando-se deste modo a possibilidade de transmissão dos animais aos alimentos e ao Homem (INSA, 2000). Também em Itália, os fagotipos mais frequentes entre 1986 e 1992 foram os mesmos em isolados humanos e alimentares, PT 4 seguido pelo PT 1 (Fantasia e Filetici, 1994). Na Dinamarca, esses também foram os fagotipos mais comuns em isolados humanos e de aves, o que implica as aves como fonte principal de *S*.Enteritidis em infecções humanas nesse país (Brown *et al*, 1994).

Ao contrário da Europa, *S*.Enteritidis PT 4 é raramente isolada de animais ou fontes ambientais no Canadá (Poppe, 1994; Khakhria *et al*, 1997). No Canadá, entre 1983 e 1992, o fagotipo 8 foi o mais comum entre as estirpes humanas, animais e outras de *S*.Enteritidis, sendo o PT 13 também frequente em ambas as fontes (Khakhria *et al*, 1997). Nos USA, o fagotipo PT 8 também predominou em isolados humanos e animais, nomeadamente aves (58%), podendo significar que existe uma associação epidemiológica entre a infecção por *S*.Enteritidis, as aves e ovos (Rodrigue *et al*, 1992).

As razões para estas diferenças geográficas relativamente ao predomínio dos fagotipos de *S*.Enteritidis são desconhecidas. No entanto, Rabsch *et al* (2000) sugerem que podem reflectir o facto de que quando este serótipo foi introduzido nas aves a partir do seu reservatório de roedores, diferentes estirpes de *S*.Enteritidis eram endémicas na população de roedores na Europa e nos USA. Subsequentemente, as estirpes de *S*.Enteritidis com maior poder de transmissibilidade podem-se ter tornado predominantes nas aves em cada continente.

Ao contrário de *S*.Enteritidis PT 4 que está praticamente associada com aves e seus produtos, a evidência epidemiológica indica que as estirpes de *S*.Typhimurium DT104 multiresistentes estão largamente distribuídas por uma variedade de diferentes produtos de origem animal, incluindo gado bovino, ovino, suino e também aves (frangos e perus), reforçando a ideia de múltiplos veículos alimentares estarem envolvidos na transmissão desta estirpe (Threlfall *et al*, 1996). O gado bovino é o principal reservatório de *S*.Typhimurium DT104 multiresistente, mas, desde 1993, DT104 tornou-se a estirpe predominante de *S*.Typhimurium em outros animais, incluindo aves, para além de ser a segunda estirpe de *Salmonella* mais frequentemente isolada de casos de gastroenterite no Reino Unido (Threlfall *et al*, 1997a).

Na última década, o consumo de aves têm aumentado o que conduziu a um crescimento acelerado da indústria de aves, como é demonstrado pelos dados da

Comunidade Europeia relativos ao período de 1990 a 1998 em que a produção e consumo de aves aumentou significativamente em todos os países (MHR Viandes, 2001). Por outro lado, a tendência na Comunidade Europeia foi para a produção e consumo de aves aumentar também em relação a outras carnes (MHR, Viandes, 2001). Assim, uma vez que as aves são consideradas o principal reservatório de *Salmonella* é possível que o aumento de isolamento de *Salmonella* em humanos possa ser atribuído ao aumento do consumo de carne de aves (Rusul *et al*, 1996). Segundo Bean e Griffin (1990), o facto da proporção de surtos de *Salmonella* associados com frangos e ovos ter aumentado gradualmente pode ser associada com o facto da disponibilidade de aves *per capita* também ter aumentado, ou seja, os hábitos alimentares dos consumidores também podem explicar o aumento de surtos associados com aves.

1.1.3) Fontes de contaminação das aves com *Salmonella*

Os riscos microbianos ao longo da cadeia de produção de aves, ocorrem desde a incubação dos ovos no local de produção até ao consumidor, como resultado da contaminação, sobrevivência e crescimento de microrganismos patogénicos, particularmente *Campylobacter* e *Salmonella* (Bryan e Doyle, 1995).

As aves de capoeira são contaminadas com *Salmonella* a partir de várias fontes nos **locais de produção** (Figura 1). Assim, a contaminação pode ocorrer directamente pelos ovos infectados dos seus progenitores (contaminação fecal do ovo ou transmissão directa no ovário), ou após o nascimento o tracto intestinal pode ficar colonizado com *Salmonella* adquirida a partir do ambiente ou da alimentação (Bryan e Doyle, 1995). Assim, a infecção das aves pode ocorrer pela via vertical, isto é, a partir dos bandos infectados para a descendência, ou pela via horizontal, isto é, pelo ambiente, incluindo vectores animais, ou alimentos (Humphrey *et al*, 1988; Notermans e Hoogenboom-Verdegaal, 1992; D'Aoust, 1997). As aves de produção industrial são susceptíveis à contaminação por *Salmonella* a partir de muitas fontes e a sua persistência nos aviários, durante longos períodos de tempo e por consecutivas gerações de aves, explica a alta incidência nestes animais (Poppe *et al*, 1991b; Irwin *et al*, 1994).

Os bandos de aves comerciais estão mais susceptíveis a colonização com *Salmonella*, especialmente durante as primeiras semanas de vida, pois nesta fase a competição microbiana com bactérias comensais do intestino é pequena (Irwin *et al*, 1994). Segundo Poppe *et al* (1996), menos de 10 células podem infectar 100% dos pintos, mas 10^6 só causam doença em apenas 25% de frangos com 8 semanas. A colonização intestinal e contaminação de outras partes do corpo (ex. penas) são favorecidas pela produção intensiva, onde o facto de muitas aves serem mantidas juntas no mesmo local conduz à

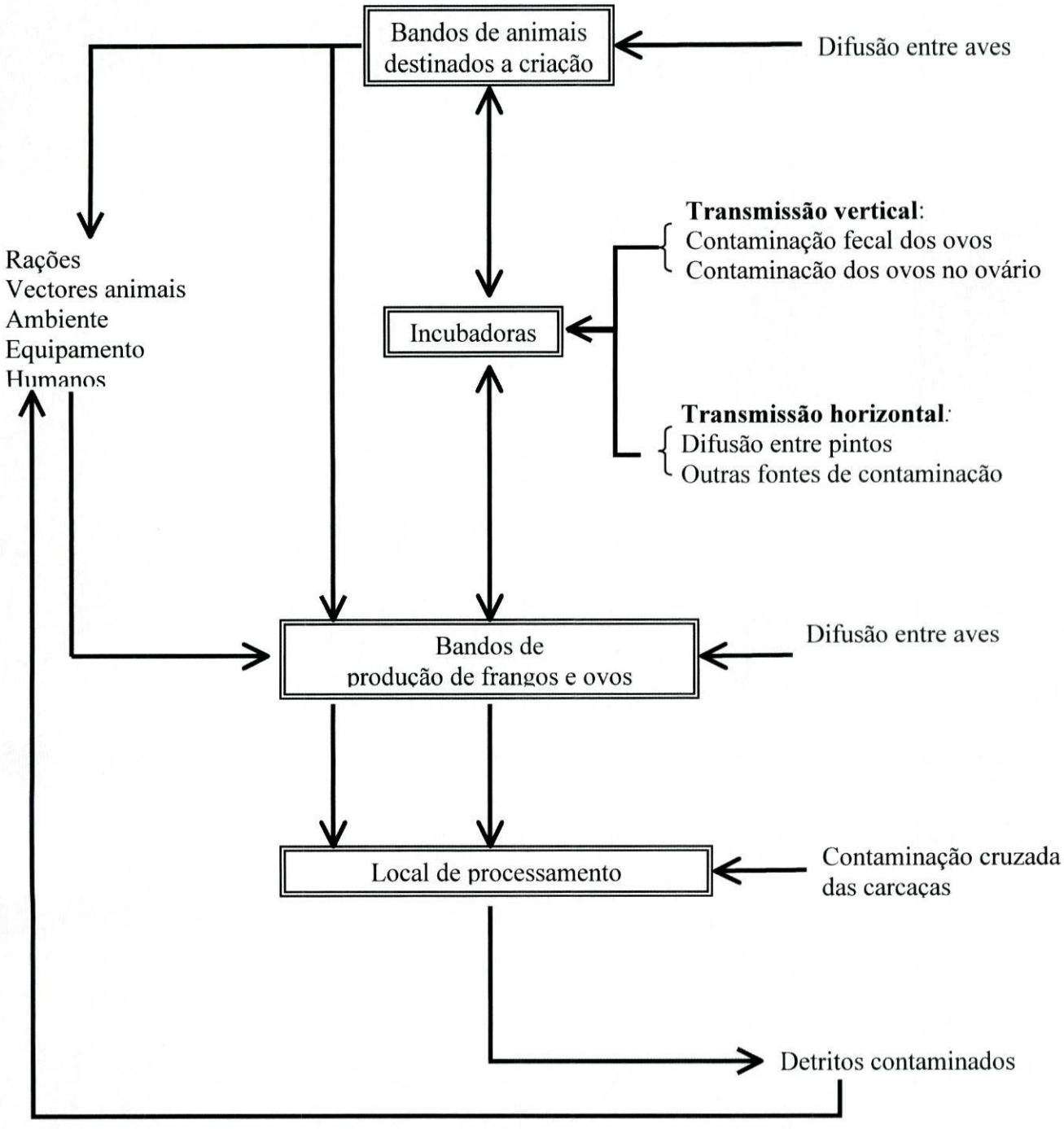


Figura 1: Ciclo de *Salmonella* na cadeia de produção de aves. Adaptado de Evans *et al* (1999).

difusão de *Salmonella* entre as aves de um bando ou de bando para bando (Humphrey *et al*, 1988; Bryan e Doyle, 1995).

As rações são também uma fonte importante de *Salmonella* para os animais e para o ambiente de produção (Humphrey *et al*, 1988; Bryan e Doyle, 1995; ICMSF, 1996a), como revelam os resultados de vários estudos (Poppe *et al*, 1991b; Poppe *et al*, 1991a; Irwin *et al*, 1994). A contaminação das rações pode ser de origem ambiental, por exemplo, por vectores animais, como por outro lado, o uso de detritos de animais para fabrico de rações também conduz à difusão e manutenção de estirpes patogénicas nos seus reservatórios animais (Fransen *et al*, 1996; Haapapuro *et al*, 1997). No estudo de Fransen *et al* (1996), *Salmonella* estava presente nos detritos orgânicos resultantes do processo de abate de aves e suínos e do processamento da sua carne em todos os matadouros estudados. Este facto reveste-se de extrema importância, na medida em que a reciclagem destes materiais sem adequada descontaminação envolve uma considerável intensificação dos ciclos de transmissão de *Salmonella* no ambiente, e aumenta indirectamente os riscos de salmonelose humana (Oosterom, 1991).

Algumas estirpes de *Salmonella* quando ingeridas pelas aves localizam-se no tracto intestinal que passam a colonizar sem causar doença, sendo eliminadas nas fezes para o ambiente de produção (Humphrey *et al*, 1988). Assim, as aves podem ser portadoras de *Salmonella* no tracto intestinal, mas como geralmente não apresentam sintomas de doença, estes animais passam na inspecção sanitária (Oosterom, 1991), no entanto, a presença de *Salmonella* no intestino, pele, penas e patas vai causar contaminação das carcaças durante o abate e processamento (Humphrey *et al*, 1988; Kotula e Pandya, 1995). Durante o abate, a difusão do conteúdo intestinal pode contaminar a superfície das carcaças, de modo que nas fases subsequentes pode ocorrer contaminação extensiva da carne e produtos cárneos a partir da superfície (Oosterom, 1991).

Assim, as aves contaminadas com *Salmonella* no local de produção contribuem para a difusão dessas bactérias no **ambiente de processamento** podendo ocorrer transferência entre as aves durante o transporte para o matadouro e entre as carcaças e porções durante o processamento (Humphrey *et al*, 1988; Bryan e Doyle, 1995). Nestes locais, as carcaças passam por uma série de operações onde podem sofrer contaminação a partir do ambiente, equipamento, utensílios e mãos dos trabalhadores e contaminação cruzada com outras aves (Humphrey *et al*, 1988; Bryan e Doyle, 1995; ICMSF, 1996a).

As fases de escaldão, depenagem, evisceração e refrigeração são os pontos principais onde pode ocorrer difusão de *Salmonella*, nomeadamente por contaminação cruzada a partir do tracto intestinal ou do material fecal das patas e penas (Humphrey *et al*, 1988; Bryan e Doyle, 1995; ICMSF, 1996a). Assim, a água usada para o escaldão estar altamente contaminada (75% das amostras positivas para *Salmonella*) e a água de lavagem

das carcaças após depenagem (50% amostras positivas) foram razões referidas por Carramiñana *et al* (1997) para o aumento da prevalência de *Salmonella* durante o processamento. A contaminação cruzada pode difundir a bactéria para carcaças não contaminadas, continuando a contaminação nas fases subsequentes do processamento (ICMSF, 1996a). Por exemplo, no estudo de Carramiñana *et al* (1997), alguns serótipos encontrados nas fezes dos animais foram também detectados nos produtos finais, o que indica contaminação com a população microbiana das fezes da própria ave, mas o inverso também ocorreu, serótipos nas carcaças ausentes nas fezes, indicando contaminação cruzada entre diferentes lotes. Uma vez que as operações de processamento das aves têm como objectivo a rapidez e o lucro, podendo ser a prevenção da contaminação cruzada de menor importância, a incidência de *Salmonella* em carcaças frequentemente excede a do animal vivo no momento do abate (Humphrey *et al*, 1988; Bryan e Doyle, 1995).

A difusão de *Salmonella* a partir de aves continua nos **locais de venda a retalho** (mercados, talhos) e nas cozinhas, incluindo nas casas dos **consumidores**. Os riscos de infecção com *Salmonella* são elevados se estes alimentos forem preparados inadequadamente, ou seja, consumidos crus ou mal cozinhados (sobrevivência da bactéria), manipulados inadequadamente (contaminação cruzada) ou deixados sem refrigeração várias horas (multiplicação da bactéria) (Boer e Hahné, 1990; Oosterom, 1991; Bryan e Doyle, 1995). Por exemplo, nos USA entre 1993 e 1997, os factores que nas práticas de preparação de alimentos mais frequentemente estavam implicados em surtos de doenças veiculadas por alimentos foram a temperatura de manutenção e a confecção inadequada dos alimentos (CDC, 2000a).

Das aves mais utilizadas para alimentação, o peru e o frango são veículos importantes de *Salmonella* a partir do produto cru contaminado, no caso do peru porque sendo um produto de grandes dimensões requer muito tempo para descongelar, cozinhar, arrefecer e reaquecer e, no caso do frango porque muitas vezes é sujeito a confecção inadequada e refrigeração imprópria (Bryan e Doyle, 1995). No entanto, muitas vezes as infecções estão relacionadas com contaminação cruzada a partir destas carnes para alimentos já cozinhados ou que se consomem sem mais tratamento, como pão, saladas e frutas, e com outros alimentos que foram contaminados nos locais de venda a retalho (ex. talhos) e até durante a manipulação das carnes, por exemplo nos churrascos (Oosterom, 1991). No estudo de Boer e Hahné (1990) verificou-se que *Salmonella* foi facilmente transferida a partir de frangos crus para tábuas de corte, pratos e mãos, sendo também detectada em vegetais crus e frango cozinhado que estiveram em contacto com pratos onde tinha estado o frango cru.

1.1.4) Prevenção e controlo na cadeia de produção de aves

Devido à natureza disseminada da *Salmonella* e aos ciclos de transmissão entre o ambiente, animais e Homem, parece improvável que esta bactéria possa ser erradicada do local de produção das aves e assim estar ausente nas carcaças (Humphrey *et al*, 1988; Oosterom, 1991; Uyttendaele *et al*, 1998). Embora a produção e processamento destes produtos se tenha tornado progressivamente mais eficiente, essas melhorias não terão tido efeitos benéficos na redução deste patogénico nas carcaças (Humphrey *et al*, 1988).

Assim, várias recomendações e programas para eliminar *Salmonella* da cadeia de produção de aves até à preparação em casa têm sido estabelecidos (Oosterom, 1991; Bryan e Doyle, 1995; Mossel *et al*, 1995; Uyttendaele *et al*, 1998). Para resolver o problema da salmonelose, as medidas devem ser tomadas simultaneamente em vários níveis: produção animal, abate e processamento da carne e preparação final na cozinha (manipuladores e consumidores), ou seja, é necessário cooperação entre produtores de animais, produtores de rações, matadouros, talhos, manipuladores e consumidores, tendo em vista uma estratégia global (Oosterom, 1991; Sinell, 1995).

A redução da incidência de *Salmonella* para níveis mais aceitáveis passa em primeiro lugar pelo estabelecimento de medidas para controlar os ciclos de infecção no **local de produção**. Isto é, para produção de animais isentos de *Salmonella*, estes devem ser mantidos sob condições livres deste e de outros patogénicos, tais como: mais higiene nesses locais, uso de rações e água não contaminadas, controlo de insectos, roedores e aves selvagens e evitar a difusão de detritos das aves no ambiente (Humphrey *et al*, 1988; Oosterom, 1991; Mossel *et al*, 1995; Sinell, 1995; Headrick e Tollefson, 1998).

Adicionalmente, para prevenir a colonização das aves por bactérias patogénicas surgiu o conceito de "exclusão competitiva", baseado na competição bacteriana que ocorre naturalmente no intestino. Como nos sistemas de produção intensiva o desenvolvimento de uma população microbiana intestinal protectora está atrasado porque os animais jovens são logo separados dos animais adultos, é fundamental fornecer a esses novos animais uma população microbiana intestinal característica dos animais adultos e que possa competir com os microrganismos patogénicos (Schneitz *et al*, 1992; Sinell, 1995; Headrick e Tollefson, 1998). Esta estratégia foi planeada para substituir o que ocorre na Natureza, uma vez que nas quintas modernas as galinhas e os pintos não são mantidos juntos, não havendo passagem para estes da população microbiana intestinal própria da espécie (Stephenson, 1998). O tratamento pela "exclusão competitiva" pode ser administrado às aves de vários modos: pela ração, pela água ou através de nebulização dos próprios animais, e vem já sendo testado na Europa há alguns anos (Schneitz *et al*, 1992). Em Março de 1998 a FDA aprovou um *spray* anti-*Salmonella* para frangos, constituído por uma mistura

de bactérias comensais, de modo a contribuir para reduzir o risco desses animais ficarem contaminados com *Salmonella* no local de produção após o nascimento. Se esta prática tiver sucesso e for adoptada pelos produtores irá trazer grandes benefícios, não só pela diminuição do número de animais reservatórios de bactérias patogénicas, como também vai conduzir a uma diminuição da utilização de antibióticos na produção animal (Stephenson, 1998).

Outro processo de prevenção seria a vacinação das aves com *S.*Gallinarum, usando uma estirpe viva e atenuada, para de um modo efectivo restaurar o balanço natural, com a exclusão de *S.*Enteritidis pelo competidor natural, que existia antes das estratégias de intervenção humana serem introduzidas nas aves (Rabsch *et al*, 2000). De facto, muito do declínio de casos humanos de *S.*Enteritidis no Reino Unido desde 1994 foi atribuído à vacinação dos bandos contra *S.*Enteritidis (Ward *et al*, 2000).

Para além da prevenção nos locais de produção, também o **transporte** dos animais para o local de abate deve ser efectuado sob condições adequadas de limpeza e desinfecção e causando o menor *stress* possível, pois o *stress* aumenta a excreção de *Salmonella* nos animais portadores (Oosterom, 1991). Também a alimentação deve ser limitada antes do abate porque o menor volume de estômago e intestino diminui o risco de danos durante o abate e evisceração e consequentemente a difusão de bactérias intestinais, incluindo *Salmonella* (Oosterom, 1991).

São fundamentais estas modificações na produção, transporte e processamento para garantir a redução da população microbiana patogénica nas aves antes de serem abatidas (Kotula e Pandya, 1995). Assim, se o número de aves portadoras for minimizado, as medidas de controlo efectuadas no **local de abate e processamento** poderão ter mais hipótese de diminuir a contaminação das carcaças (Humphrey *et al*, 1988). A contaminação da carne com *Salmonella* é causada pela difusão de bactérias a partir do intestino para a superfície da carne (Oosterom, 1991). Tendo em conta a grande incidência de bactérias nas penas, pele e patas das aves após chegada ao local de processamento é fundamental determinar métodos para diminuir a carga microbiana, quer à entrada, quer ao longo do processo (Kotula e Pandya, 1995). Por exemplo, os tanques do escaldão e as máquinas de retirar penas devem ser mantidas limpas para minimizar a contaminação cruzada da pele por bactérias das penas (Kotula e Pandya, 1995). Práticas adequadas de higiene, limpeza e desinfecção durante o abate, corte e demais processamento permitem proporcionar aos consumidores produtos avícolas mais seguros (Mossel *et al*, 1995; Sinell, 1995; Uyttendaele *et al*, 1998).

Se todas as medidas, desde produção de animais isentos de *Salmonella* até condições de higiene no abate, não forem possíveis pode ainda ser considerada a possibilidade de eliminação de patogénicos da carne por remoção ou destruição destes,

incluindo *Salmonella*, no final do processamento e antes da distribuição para venda a retalho (Humphrey *et al*, 1988; Oosterom, 1991; Mossel *et al*, 1995). Assim, há autores que sugerem a utilização de substâncias químicas (ex. ácido láctico), calor ou radiação ionizante para tratamento das carcaças (Humphrey *et al*, 1988; Oosterom, 1991; Sinell, 1995).

Adicionalmente, todas as pessoas envolvidas na preparação final dos alimentos, **manipuladores** profissionais e **consumidores**, devem ser educadas para usar procedimentos correctos de manipulação, higiene e de confecção que permitam eliminar o potencial risco de infecção (Oosterom, 1991; Kotula e Pandya, 1995; Mossel *et al*, 1995; Sinell, 1995; Headrick e Tollefson, 1998). A última opção é aumentar os conhecimentos do público sobre os riscos microbianos, particularmente os relacionados com manipulação de aves, através de campanhas de informação (Humphrey *et al*, 1988). Assim, os pontos de controlo para assegurar a ausência de *Salmonella* nos alimentos prontos a comer envolvem: um procedimento que assegure a destruição da bactéria em alimentos contaminados, especialmente alimentos de origem animal crus, evitar a partir destes a contaminação de alimentos já prontos a consumir e manter os alimentos a altas ou baixas temperaturas para prevenir o crescimento da *Salmonella*, no caso dos alimentos que possam já estar contaminados (ICMSF, 1996a).

No entanto, a responsabilidade deste problema não pode ficar apenas no consumidor durante a preparação da carne na cozinha, a educação do público deve ser feita juntamente com as melhorias na produção animal e no processamento deste tipo de produto (Oosterom, 1991; Sinell, 1995). O controlo dos microrganismos patogénicos deve ocorrer em todas as etapas de produção, processamento e preparação (Kotula e Pandya, 1995). Foi assim que alguns países, como a Suécia, conseguiram não estar envolvidos na epidemia mundial de *S*.Enteritidis, estabelecendo um programa de controlo para evitar a contaminação em todas as fases da cadeia de produção de aves, de modo a fornecer ao consumidor alimentos sem *Salmonella* (Wierup *et al*, 1995). Também no Reino Unido, o declínio do isolamento de *S*.Enteritidis PT 4 desde 1997 se deve à implementação de práticas para o controlo de *Salmonella* em aves (Ward *et al*, 2000).

A maioria dos países exige que a *Salmonella* esteja ausente de produtos alimentares prontos a consumir para garantir a sua segurança, no entanto, não existem limites para produtos crus. Embora estes possam causar doença, directamente ou indirectamente por contaminação cruzada e higiene inadequada na manipulação dos alimentos, a contaminação das carcaças de aves cruas com *Salmonella* não é considerada um risco para o consumidor, uma vez que se espera que o alimento seja aquecido o suficiente antes do consumo para eliminar este patogénico (Notermans e Hoogenboom-Verdegaal, 1992; Uyttendaele *et al*, 1998).

1.1.5) Características da salmonelose

Os serótipos de *Salmonella* não tifóide podem causar doença aguda denominada gastroenterite ou enterocolite, cujos sintomas incluem dores abdominais, diarreia, febre e arrepios, e às vezes náuseas, vómitos, prostração, anorexia, dores de cabeça e mal estar geral. O período de incubação varia de 7 a 72 h, mas mais frequentemente é de 12 a 36h após a ingestão do alimento contaminado. A doença é geralmente auto-limitada e com uma duração de 2 a 5 dias, mas as pessoas infectadas tornam-se portadoras de *Salmonella* durante algum tempo, geralmente dois a três meses (Bryan e Doyle, 1995; Mossel *et al*, 1995; ICMSF, 1996a; D'Aoust, 1997).

Por outro lado, para além da doença confinada ao tracto gastrointestinal, as infecções humanas com estirpes de *Salmonella* não tifóide também podem causar infecções extraintestinais sistémicas e induzir várias complicações e doenças crónicas (Mossel *et al*, 1995; ICMSF, 1996a; D'Aoust, 1997). As crianças, idosos, mal-nutridos e imunodeprimidos são mais susceptíveis a infecções por *Salmonella* e os efeitos da salmonelose são geralmente mais graves (Bryan e Doyle, 1995; Mossel *et al*, 1995; D'Aoust, 1997). A susceptibilidade a esta infecção depende da idade, não só em humanos, como noutros animais (Poppe *et al*, 1996).

A dose infecciosa de *Salmonella* para causar doença transmitida por alimentos no Homem é variável, sendo esta variação dependente da estirpe infectante, de factores individuais e também da composição química do alimento ingerido (Notermans e Hoogenboom-Verdegaal, 1992; D'Aoust, 1997). Assim, os alimentos líquidos (menor tempo de retenção no estômago) ou com alto conteúdo em gordura ou substâncias com poder tampão (protegem da acidez gástrica) são os veículos comuns nas situações causadas por doses infecciosas baixas (Roberts, 1993; Bryan e Doyle, 1995; ICMSF, 1996a; D'Aoust, 1997).

As últimas estimativas efectuadas nos USA para as doenças transmitidas por alimentos referem *Salmonella* não *S.*Typhi não só como um dos agentes mais frequentes dessas doenças, mas também como um dos agentes mais responsáveis por hospitalizações e por mortes (Mead *et al*, 1999). Relativamente aos dados registados dos surtos destas doenças nesse país, *S.*Enteritidis continua a ser responsável por mais mortes do que qualquer outro patogénico alimentar, ocorrendo a maioria em pessoas residentes em lares, o que reflecte a gravidade destas infecções nos idosos (Bean *et al*, 1997; CDC, 2000a). A taxa de mortalidade de salmonelose é baixa (< 1%), mas como existe um grande número de casos por ano, o número de mortes é significativo (Mossel *et al*, 1995). Assim, embora a taxa de mortalidade das salmoneloses seja baixa, a sua elevada prevalência tem causado grande impacto social e económico (Humphrey *et al*, 1988). Os custos económicos dos

casos de salmonelose, nomeadamente os associados com aves, são elevados (Bryan e Doyle, 1995).

O tratamento dos casos não complicados requer apenas suporte terapêutico, como substituição de fluídos e electrólitos. O uso de agentes antimicrobianos em tais episódios está contra-indicado, pois tende a prolongar o estado de portador e a excreção intermitente de *Salmonella* que frequentemente ocorre após a fase aguda da doença (D'Aoust, 1997). No entanto, as salmoneloses transmitidas através da cadeia alimentar podem ocasionalmente causar invasão bacteriana dos tecidos e da circulação sanguínea, sendo necessário um tratamento eficaz com agentes antimicrobianos, isto é, embora o tratamento antimicrobiano não seja recomendado para a gastroenterite causada por *Salmonella* não tifóide, é indicado para as infecções extraintestinais que podem ocorrer (Lee *et al*, 1994; Glynn *et al*, 1998; Parecer 98/C407/02; Tollefson e Miller, 2000; Angulo *et al*, 2000). Actualmente, as fluoroquinolonas e as cefalosporinas de 3ª geração são os agentes antimicrobianos escolhidos para o tratamento de salmoneloses invasivas em adultos e crianças, respectivamente (Angulo *et al*, 2000). O uso de outros agentes antimicrobianos, como ampicilina, cloranfenicol e trimetoprim/sulfametoxazol, utilizados anteriormente para o tratamento desta infecção, está limitado devido à emergência de resistências (Angulo *et al*, 2000).

1.2) Listeriose

1.2.1) Dados epidemiológicos

Na última década, *L.monocytogenes* estabeleceu-se como um dos mais importantes patogénicos transmitidos por alimentos e tornou-se um problema para a indústria alimentar e para as autoridades de saúde pública (WHO, 1988; Rocourt, 1996; Rocourt e Cossart, 1997). Os alimentos são os principais veículos de transmissão desta bactéria patogénica constituindo a fonte mais frequente de infecção em humanos (WHO, 1988; Farber e Peterkin, 1991; Schuchat *et al*, 1991; Schuchat *et al*, 1992; ICMSF, 1996b; Rocourt, 1996; Rocourt et Cossart, 1997).

Nas doenças transmitidas por alimentos, a listeriose pode ser considerada atípica devido à gravidade e à natureza não intestinal dos seus sintomas, à elevada taxa de mortalidade e à predilecção por indivíduos imunodeprimidos devido a várias condições subjacentes (Rocourt, 1996; Rocourt e Cossart, 1997; Rocourt *et al*, 2000). Em contraste com outras doenças transmitidas por alimentos, nomeadamente com as salmoneloses, a taxa de mortalidade associada com esta doença é elevada o que a torna um grave problema

de saúde pública, embora a incidência de listeriose seja baixa (Rocourt e Cossart, 1997; Slutsker *et al*, 1998), variando de 1,6 a 6 casos por milhão de habitantes (Rocourt *et al*, 2000). Nos USA, de acordo com dados do programa de vigilância implementado em alguns estados, a incidência de casos de listeriose registados durante 1993 foi de 4,2 por milhão de habitantes (Tappero *et al*, 1995), estimando-se actualmente que *L.monocytogenes* cause 2500 casos e 500 mortes por ano nesse país (CDC, 2000c). Os dados de vários países europeus também mostram que a frequência de listeriose se tem mantido baixa ao longo dos últimos anos, comparativamente com outras doenças transmitidas por alimentos, como as salmoneloses. Por exemplo, entre 1993 e 1998, o número anual de casos de listeriose variou entre 16 e 26 em Espanha, entre 23 e 41 na Dinamarca, entre 29 e 68 em Itália e entre 230 e 451 em França (WHO, 2000a). No Reino Unido, entre 1983 e 1996, o número anual de casos variou entre 85 e 278, correspondendo a uma incidência de 1,6 a 2,7 de casos por milhão de habitantes (CDR, 1997). Relativamente aos dados nacionais do período de 1993 a 1998 verifica-se o registo de apenas um incidente de doença transmitida por alimentos em que foi isolada *L.monocytogenes* (WHO, 2000a).

Nos últimos anos, o impacto da listeriose na saúde pública e na indústria alimentar conduziu ao desenvolvimento de investigação para elucidar a epidemiologia desta doença, nomeadamente identificação dos factores de risco e de estratégias de controlo adequadas para a sua prevenção (Rocourt e Cossart, 1997). Esta situação pode reflectir-se no facto do número de casos esporádicos de listeriose ter diminuído significativamente em vários países (Rocourt *et al*, 2000). Assim, nas áreas sob vigilância nos USA, a incidência de listeriose diminuiu substancialmente entre 1989 e 1993, passando de 7,9 para 4,2 casos por milhão de habitantes (Tappero *et al*, 1995). Projectando essas taxas para a população americana, Tappero *et al* (1995) sugerem uma diminuição de 44% dos casos e de 48% das mortes de 1989 a 1993, correspondendo a um declíneo de 1965 casos e 481 mortes em 1989 para 1092 casos e 248 mortes em 1993. Também em vários países europeus, tem ocorrido uma diminuição como se pode observar pelos dados relativos a França, onde o número anual de casos passou de 451 em 1993 para 220-230 entre 1996 e 1998 (WHO, 2000a).

No entanto, os dados dos sistemas de vigilância existentes em vários países estão provavelmente a subestimar a verdadeira incidência desta doença, não se conhecendo qual a taxa desse subregisto, apesar desta situação ser menor para a listeriose relativamente a outras doenças transmitidas por alimentos, devido à gravidade da doença e à necessidade de hospitalização das pessoas afectadas (Rocourt *et al*, 2000). Além disso, a listeriose apresenta uma distribuição geográfica limitada, uma vez que é principalmente registada pelos países industrializados, sendo a prevalência desconhecida ou baixa em países africanos, asiáticos ou sul americanos (WHO, 1988; Rocourt, 1996; Rocourt e Cossart, 1997; Rocourt *et al*, 2000). Não se conhecem as razões desta situação, ou seja, se

reflectem diferenças nos padrões de consumo e hábitos alimentares, na susceptibilidade dos hospedeiros, no processamento dos alimentos e nas tecnologias de armazenamento ou falta de sistemas de vigilância laboratorial (Rocourt, 1996; Rocourt e Cossart, 1997; Rocourt *et al*, 2000).

A emergência da listeriose é o resultado de vários factores que reflectem alterações sociais, incluindo: progressos da medicina e consequentes alterações demográficas, tais como aumento de indivíduos imunodeprimidos e de idosos; alterações nos sistemas primários de produção de alimentos (ex. produção em grande escala), modificações nas tecnologias de processamento alimentar, expansão da indústria alimentar e alterações no armazenamento (ex. desenvolvimento de sistemas de preservação pelo frio); alterações nos hábitos alimentares (desejo dos consumidores por alimentos de conveniência que tenham um aspecto de alimentos frescos, possam ser adquiridos prontos a comer, refrigerados ou congelados, possam ser preparados rapidamente, e necessitem de pouca confecção antes do consumo); alterações nas práticas de manipulação e preparação dos alimentos (Rocourt, 1996; Rocourt e Cossart, 1997; Rocourt *et al*, 2000). Também a melhoria dos sistemas de registo implementados em vários países e um aumento real resultante de exposição mais frequente, reflectindo uma maior prevalência de *L.monocytogenes* no ambiente, incluindo alimentos, pode contribuir para a emergência da listeriose (Farber e Harwig, 1996). Assim, *L.monocytogenes* é também considerada uma das bactérias emergentes (Notermans e Hoogenboom-Verdegaal, 1992; Tauxe, 1997; Slutsker *et al*, 1998).

A serotipagem distingue 13 serótipos diferentes de *L.monocytogenes*, mas os casos de listeriose humana são causados principalmente por apenas três: 1/2a, 1/2b e 4b (Farber e Peterkin, 1991; ICMSF, 1996b; Rocourt e Cossart, 1997; Rocourt *et al*, 2000; Norrung, 2000). Por exemplo, esses três serótipos foram responsáveis por 96% dos casos estudados entre 1989 e 1993 nos USA (Tappero *et al*, 1995). No entanto, em todo o mundo, grande parte dos surtos e casos esporádicos tem sido associada com o serótipo 4b e só ocasionalmente com o 1/2a e 1/2b (Farber e Peterkin, 1991; ICMSF, 1996b; Rocourt e Cossart, 1997; Norrung, 2000). Em contraste, os isolados de alimentos pertencem mais frequentemente ao serogrupo 1/2 (Rocourt e Cossart, 1997; Norrung, 2000).

Estando actualmente estabelecida a origem predominantemente alimentar da listeriose, não existem estudos que expliquem o facto do serótipo 4b ser responsável pela maioria dos casos de listeriose humana e ao mesmo tempo ser raramente detectado nos alimentos (Norrung, 2000). Além disso, não foram estabelecidas correlações entre origem (humana, animal, alimentar, ambiental), características de tipagem (serótipo, fagotipo, etc) e virulência. Assim, todas as estirpes de *L.monocytogenes* devem ser consideradas potencialmente patogénicas para os humanos (Norrung, 2000; Rocourt *et al*, 2000).

Adicionalmente, a aplicação de várias técnicas de tipagem, para além da serotipagem, permitiu obter mais dados relativamente à epidemiologia da listeriose: parecem não existir diferenças geográficas na distribuição das estirpes; não se estabeleceu uma ligação directa entre diferentes estirpes e formas clínicas de listeriose; estirpes indistinguíveis foram isoladas de casos e dos alimentos suspeitos, o que confirma o papel dos alimentos contaminados na listeriose (Rocourt *et al*, 2000).

Actualmente, o género *Listeria* é constituído por seis espécies: *L.monocytogenes*, *L.innocua*, *L.ivanovii*, *L.seeligeri*, *L.welshimeri* e *L.grayi* (Rocourt e Cossart, 1997). Embora as outras espécies de *Listeria*, para além de *L.monocytogenes*, não sejam patogénicas para o Homem, a sua presença nos alimentos pode ser considerada como um indicador de contaminação ambiental (WHO, 1988; McLauchlin, 1996b). No entanto, a presença de outras espécies de *Listeria* nos alimentos pode dificultar a detecção de *L.monocytogenes*, pois, por exemplo, *L.innocua* cresce mais facilmente do que *L.monocytogenes* em caldos de enriquecimento (Petran e Swanson, 1993; Curiale e Lewus, 1994). No estudo de Curiale e Lewus (1994) verificou-se que a detecção de *L.monocytogenes* está dificultada em presença de *L.innocua*, o que está de acordo com as diferenças na taxa de crescimento das duas espécies em meios de enriquecimento. Uma vez que o enriquecimento favorece *L.innocua* é possível que a incidência de *L.monocytogenes* nos alimentos possa estar subregistada e que *L.innocua* seja mais frequentemente detectada pelos processos convencionais (Petran e Swanson, 1993; Curiale e Lewus, 1993).

1.2.2) *Listeria monocytogenes* em aves

L.monocytogenes é uma bactéria patogénica largamente disseminada no ambiente, tendo sido isolada do solo, água, esgotos, vegetação, silagem, fezes humanas e de animais saudáveis (Farber e Peterkin, 1991; Schuchat *et al*, 1991; ICMSF, 1996b; Rocourt e Cossart, 1997). As suas características ubíquas inevitavelmente resultam na contaminação de numerosos produtos alimentares, tendo já sido isolada de uma grande variedade de alimentos (Farber e Peterkin, 1991; Rocourt e Cossart, 1997). Também o consumo de diversos tipos de alimentos foi associado com surtos e casos esporádicos de listeriose (Farber e Peterkin, 1991; Schuchat *et al*, 1991; McLauchlin, 1996a). Os alimentos podem ser contaminados em qualquer fase da cadeia alimentar, durante a produção ou o processamento, particularmente a partir do ambiente (WHO, 1988; Rocourt e Cossart, 1997).

Assim, a distribuição disseminada de *L.monocytogenes* e de outras espécies de *Listeria* na Natureza e a sua associação com animais de criação torna a sua presença em carnes, nomeadamente nas aves inevitável (Johnson *et al*, 1990; Moreno e García, 1993;

Roberts, 1993; Mossel *et al*, 1995; Jay, 1996). *Listeria* spp., incluindo *L.monocytogenes*, são considerados contaminantes frequentes de aves, tal como demonstram os resultados de estudos de prevalência revistos por vários autores (Johnson *et al*, 1990; Farber e Peterkin, 1991; Moreno e García, 1993; Jay, 1996; Rocourt e Cossart, 1997). Dependendo do método de amostragem, foram encontrados valores de incidência que variam entre 15% a 80% em amostras de aves vendidas a retalho (WHO, 1988), sugerindo que estes alimentos contaminados são veículos potenciais de listeriose.

Deste modo, foram já documentados vários casos e surtos de listeriose associados com o consumo de aves e derivados (Kerr *et al*, 1988; Barnes *et al*, 1989; CDC, 1998). O primeiro foi um caso de listeriose materno-fetal ocorrido no Reino Unido em 1988, atribuído a frango cozinhado refrigerado (Kerr *et al*, 1988). O primeiro caso nos USA ocorreu em 1989 numa mulher imunodeprimida e foi associado com salchichas tipo Frankfurt de peru (Barnes *et al*, 1989). Mais recentemente, nos USA, foram implicadas várias marcas de cachorro-quentes (CDC, 1998) e carne de peru (CDC, 2000c) em surtos ocorridos em vários Estados desse país.

Adicionalmente, Schwartz *et al* (1988) no estudo epidemiológico conduzido nos USA para identificar os factores de risco alimentares para casos esporádicos de listeriose verificaram também uma associação da doença com o consumo de cachorro-quentes não cozinhados e com frango mal cozinhado, o que prova que estes alimentos podem ser possíveis veículos de listeriose. Posteriormente, num segundo estudo epidemiológico foi também detectada uma associação entre consumo de frango mal cozinhado e listeriose, particularmente entre os indivíduos imunodeprimidos (Schuchat *et al*, 1992). Adicionalmente, na análise microbiológica dos alimentos inserida nesse estudo, *L.monocytogenes* foi isolada de 31% das amostras de aves colhidas nos frigoríficos de pessoas com listeriose, sendo um dos alimentos analisados que apresentou maior incidência desta bactéria (Pinner *et al*, 1992).

Relativamente aos serótipos, verifica-se que as estirpes de *L.monocytogenes* isoladas de carne e aves pertencem mais frequentemente ao serogrupo 1/2, especificamente aos serótipos 1/2a, 1/2b e 1/2c, o que contrasta com o facto da maioria das infecções humanas serem causadas por estirpes do serótipo 4b (Johnson *et al*, 1990; Moreno e García, 1993; Jay, 1996). Estes dados sugerem que a carne e produtos cárneos não sejam talvez um veículo importante de transmissão de listeriose humana (Moreno e García, 1993), mas segundo Johnson *et al* (1990) não se sabe se existe mesmo uma diferença na distribuição dos serótipos entre fontes animais/carne e isolados humanos, ou se é apenas uma situação artificial resultante do número reduzido de amostras. Além disso, salienta-se que estirpes do serogrupo 1/2 também já foram implicadas em casos de listeriose (Moreno e García, 1993), como no caso descrito por Barnes *et al* (1989) associado

com salchichas tipo Frankfurt de peru. Também no estudo de Pinner *et al* (1992), mais de metade dos casos esporádicos (59%) foram causados por estirpes dos serótipos 1/2a e 1/2b.

L.monocytogenes difere de muitos outros patogénicos transmitidos por alimentos não só por ser uma bactéria ubíqua, mas também por ser resistente a várias condições ambientais adversas (Rocourt e Cossart, 1997). Esta situação permite que estas bactérias possam sobreviver durante longos períodos de tempo em muitos ambientes diferentes, incluindo sobreviver a determinados procedimentos de processamento e crescer em produtos alimentares durante o armazenamento (Rocourt e Cossart, 1997).

Uma das propriedades de *L.monocytogenes* é ser psicrotrófica, ou seja, tem capacidade para sobreviver e proliferar a temperaturas de refrigeração (Farber e Peterkin, 1991; Schuchat *et al*, 1991; ICMSF, 1996b; Rocourt e Cossart, 1997), como mostram os resultados do estudo de Juntilla *et al* (1988) em que a temperatura mínima de crescimento de *L.monocytogenes* foi de 1,1º C. Assim, esta bactéria pode permanecer e crescer em alimentos durante o armazenamento no frio, sendo um potencial risco microbiológico para vários alimentos refrigerados, incluindo produtos cárneos (Johnson *et al*, 1990). Vários autores demonstraram a capacidade de *L.monocytogenes* em proliferar em carnes e aves contaminadas a temperaturas de refrigeração (Genigeorgis *et al*, 1989; Glass e Doyle, 1989; Pinner *et al*, 1992). É de notar que *Listeria* spp. crescem particularmente bem em aves armazenadas a 4º C (Glass e Doyle, 1989) e que casos esporádicos de listeriose possam ser associados com consumo de frango mal cozinhados (Schwartz *et al*, 1988).

Para além do crescimento desta bactéria não ser inibido a temperaturas de refrigeração, as superfícies das carnes e aves são substratos óptimos para suportar o crescimento de *L.monocytogenes* após contaminação (WHO, 1988; Farber e Peterkin, 1991). Além disso, esta bactéria apresenta outras características importantes, pois é relativamente tolerante a outras condições ambientais de *stress*, tais como elevadas concentrações de NaCl e baixo pH (Rocourt e Cossart, 1997).

Nos produtos cárneos é normal a coexistência de várias espécies de *Listeria*, uma vez que os nichos ecológicos se sobrepõem (Johnson *et al*, 1990). Neste tipo de produtos, *L.monocytogenes* e *L.innocua* são as espécies mais frequentemente registadas, seguido por *L.welshimeri* e *L.seeligeri*, sendo *L.ivanovii* a menos detectada (Jay, 1996).

1.2.3) Fontes de contaminação das aves com *L.monocytogenes*

Devido à ocorrência disseminada de *L.monocytogenes* no ambiente, esta bactéria pode contaminar os alimentos em qualquer ponto, desde o local de produção ao consumo (WHO, 1988).

Sendo *L.monocytogenes* isolada de muitos locais do ambiente não é possível excluir o **local de produção** como origem da contaminação de aves. No local de produção, alimentos e água contaminados fornecidos aos animais são fontes importantes de *L.monocytogenes* (Jay, 1996; Ojeniyi *et al*, 1996). A ocorrência de *L.monocytogenes* num ambiente de exploração animal é mesmo empolada no estudo de Skovgaard e Morgen (1988) em que foi detectada a presença desta bactéria em 62% das amostras de silagem (alimentação animal) e em 52% de fezes de gado bovino e 33% de fezes de aves. Esses autores sugerem como causa da presença de *L.monocytogenes* em amostras de fezes de aves, a ocorrência frequente desta bactéria em matéria orgânica vegetal, utilizada como leito nas explorações de aves, e na silagem dada aos animais.

Também vários estudos em frangos inoculados experimentalmente com *L.monocytogenes* mostraram que o intestino (ceco) foi o principal local de colonização (Husu *et al*, 1990; Hume *et al*, 1998). Husu *et al* (1990) sugeriram que variações entre bandos devido a práticas de produção podem influenciar a ocorrência de *L.monocytogenes* em aves. Num estudo na Dinamarca, Petersen e Madsen (2000) verificaram que a prevalência de *Listeria* spp. em amostras de bandos de frangos foi de 14%, sendo de 3% para *L.monocytogenes*, mostrando que as aves podem ser portadoras de *L.monocytogenes* no seu tracto intestinal. No entanto, apesar de Husu *et al* (1990) terem detectado *L.monocytogenes* no tracto gastrointestinal de pintos inoculados experimentalmente com essa bactéria, os resultados mostram que os pintos provavelmente não são um reservatório habitual de *L.monocytogenes*, pois a colonização com essa bactéria foi transitória (a maioria dos animais tinha eliminado esta bactéria 9 dias após a inoculação oral). Deste modo, embora esta bactéria possa ser detectada nas fezes de vários animais, não é considerada uma bactéria de origem intestinal (Jay, 1996).

Mesmo assim, as aves contaminadas com *Listeria* spp. no local de produção servem como reservatório destas bactérias, contribuindo para a sua difusão e estabelecimento no **local de processamento** após o abate (Genigeorgis *et al*, 1989; Roberts, 1993; Dykes *et al*, 1994; Petersen e Madsen, 2000). Skovgaard e Morgen (1988) sugerem que a presença de *L.monocytogenes* em carcaças de aves tem origem na elevada prevalência de animais que excretam esta bactéria nas fezes, resultando em contaminação das carcaças durante a operação de evisceração. Esta situação está de acordo com os resultados de Dykes *et al* (1994) em que a presença de *Listeria* spp. em carcaças de frango só foi detectada após a fase de evisceração. Outra hipótese é que a contaminação por *Listeria* ocorra no local de produção e a bactéria transportada na pele das aves e assim seja capaz de contaminar toda a linha de produção (Franco *et al*, 1995). Também é possível que a contaminação inicial de algumas carcaças possa resultar no desenvolvimento de populações endémicas de *Listeria*

no local de processamento que subsequentemente se difundem para outras carcaças através do equipamento contaminado (Dykes *et al*, 1994).

No entanto, apesar das fezes das aves poderem ser uma fonte importante de contaminação com *Listeria* na superfície das carcaças, tal como, no ambiente do matadouro, a elevada prevalência de *L.monocytogenes* associada com a carne de aves é mais provavelmente resultante da manipulação e da contaminação ambiental durante o processamento (Husu *et al*, 1990). A contaminação das aves a partir do **ambiente do local de processamento** também é de esperar. Assim, em contraste com estudos referidos, Ojeniyi *et al* (1996) não detectaram *L.monocytogenes* no conteúdo intestinal de frangos em matadouros, sugerindo que a contaminação é raramente adquirida no local de produção e é mais provável que tenha origem a partir da linha de processamento e do ambiente impropriamente limpo e desinfectado (a principal fonte de contaminação das carcaças de aves com esta bactéria está localizada no matadouro e não nos próprios animais). Isto significa que a contaminação destes produtos não se deve ao facto das aves serem portadoras de *L.monocytogenes*, mas mais à transferência deste patogénico de fontes ambientais, o que contrasta com a contaminação por *Salmonella* (Uyttendaele *et al*, 1997). Esta situação é demonstrada pelos resultados do estudo de Lawrence e Gilmour (1994), em que amostras ambientais dos locais de processamento de aves cruas e de aves cozinhadas estavam bastante contaminadas com *Listeria* spp. (46% e 29%) e *L.monocytogenes* (26% e 15%).

Também o facto de vários estudos registarem um aumento gradual da incidência de *Listeria* spp., incluindo *L.monocytogenes*, ao longo do processamento sugere que o ambiente desses locais é a fonte primária de contaminação de produtos cárneos com estas bactérias (Johnson *et al*, 1990). Assim, vários autores sugeriram as superfícies do equipamento e utensílios em contacto com os produtos e os manipuladores como fontes importantes de contaminação ao longo do processamento, responsáveis pela difusão destas bactérias para as aves (Genigeorgis *et al*, 1989; Franco *et al*, 1995; Uyttendaele *et al*, 1999). Genericamente, as sucessivas contaminações que podem ocorrer nas operações de processamento, incluindo o contacto humano, e a multiplicação das espécies de *Listeria* já presentes são responsáveis pelo aumento considerável de contaminação nas fases posteriores do processamento relativamente ao detectado após o abate (Johnson *et al*, 1990; Moreno e García, 1993).

Além disso, em vários incidentes de listeriose de origem alimentar revistos por McLauchlin (1996a), as estirpes de *L.monocytogenes* implicadas foram recuperadas de locais do ambiente de produção de alimentos, sugerindo também que tivessem sido a fonte de contaminação durante o processamento. Assim, o facto de *L.monocytogenes* sobreviver bem no ambiente onde os alimentos são produzidos, tolerar vários agentes de preservação

(ex. cloreto de sódio e nitritos) e ter capacidade para crescer numa grande variedade de alimentos a temperatura de refrigeração, torna esta bactéria um contaminante importante durante e após o processamento (McLauchlin, 1996a).

Estas bactérias uma vez introduzidas na indústria de produtos cárneos, multiplicam-se facilmente na superfície das instalações, equipamentos e utensílios, dada a sua resistência a condições desfavoráveis, as suas escassas exigências de crescimento e as suas propriedades psicrotróficas, o que possibilita novas oportunidades para contaminação dos produtos cárneos processados (Moreno e García, 1993). Assim, nos produtos cárneos já processados prontos a comer, a presença de *Listeria* spp. reflecte recontaminação após processamento, possivelmente como resultado de contaminação ambiental (WHO, 1988). Por exemplo, no estudo de Sergelidis *et al* (1997), a elevada frequência (41%) de isolamento de *Listeria* spp. da superfície de frigoríficos industriais de estabelecimentos de processamento de carne mostra que os produtos cárneos finais têm uma grande probabilidade de sofrer contaminação cruzada. Esta contaminação pós processamento dos produtos cárneos prontos a comer com *L.monocytogenes* representa riscos para a saúde pública devido à capacidade desta bactéria se multiplicar a temperaturas de refrigeração durante o armazenamento (Glass e Doyle, 1989; Johnson *et al*, 1990).

Segundo Moreno e García (1993), as consequências da contaminação da carne e aves, isto é, da matéria-prima para a indústria de produtos cárneos, são as seguintes: a carne fresca é a origem da constante introdução de novas estirpes na indústria, que poderão contaminar e proliferar nas superfícies de utensílios, equipamentos e instalações, a partir dos quais contaminam os produtos cárneos processados; os produtos processados poderão ser de risco se as condições de processamento não inactivarem ou inibirem a multiplicação das *Listeria* presentes; a partir da carne poderá ocorrer contaminação cruzada para outros alimentos, incluindo produtos cárneos processados, nomeadamente ao nível da venda a retalho.

Assim, também nos **locais de venda a retalho**, pode ocorrer contaminação a partir de superfícies que entram em contacto com alimentos, nomeadamente prontos a comer, como mostram Hudson e Mott (1993) ao detectarem a presença de *L.monocytogenes* numa máquina de cortar em fatias e numa faca usada para cortar porções de produtos prontos a comer para venda num supermercado. Também vários estudos detectaram *Listeria* spp. e *L.monocytogenes* em produtos prontos a comer, sugerindo contaminação pós-processamento no local de venda (Sheridan *et al*, 1994; Rijpens *et al*, 1997). No estudo de Schuchat *et al* (1992) sugere-se mesmo que a contaminação cruzada dos alimentos em estabelecimentos de venda a retalho é um dos factores que contribuí para a difusão da infecção por *L.monocytogenes*.

A disseminação de *Listeria* a partir de carne de aves continua na casa dos **consumidores**. A elevada prevalência de *L.monocytogenes* em aves cruas representa um risco potencial, especialmente se estes alimentos forem consumidos crus ou mal cozinhados (Johnson *et al*, 1990; Uyttendaele *et al*, 1999). Por exemplo, Farber *et al* (1998) verificaram que alguns fornos microondas não proporcionam um aquecimento uniforme, mesmo confeccionando de acordo com as instruções do fabricante, de tal modo que permitiriam a sobrevivência de *Listeria* em carcaças de frango.

Adicionalmente, a elevada prevalência de *L.monocytogenes* em aves cruas representa um risco potencial também devido a contaminação cruzada para outros alimentos em casa (Johnson *et al*, 1990; Uyttendaele *et al*, 1999). Existem numerosas oportunidades para contaminação cruzada no ambiente doméstico, tal como na venda a retalho, entre vários alimentos no frigorífico doméstico ou entre alimentos através do contacto com as mãos e superfícies que facilitam a difusão de *L.monocytogenes*. Por exemplo, alguns estudos (Beumer *et al*, 1996; Duggan e Phillips, 1998) detectaram *L.monocytogenes* em locais do ambiente doméstico, nomeadamente nos compartimentos de vegetais dos frigoríficos, nas bancas de cozinha, panos de louça, esfregões e escovas de lavar a louça. Estas superfícies podem ficar contaminadas após o contacto com produtos de origem animal crus, como carne de aves.

Por outro lado, uma vez que *L.monocytogenes* pode crescer a temperaturas de refrigeração, a manutenção de alimentos nos frigoríficos durante um longo período de tempo é um risco. Tal como foi demonstrado pelo estudo epidemiológico de Pinner *et al* (1992) em que 64% dos frigoríficos de doentes com listeriose continham pelos menos um alimento contaminado com *L.monocytogenes*, 11% das amostras de alimentos colhidas de frigoríficos de doentes com listeriose continham *L.monocytogenes* e 33% dos frigoríficos continham pelo menos um isolado no alimento semelhante ao encontrado no doente.

As alterações nos hábitos alimentares e no modo como os alimentos são produzidos tem conduzido ao crescimento das vendas de alimentos altamente processados, com longos períodos de vida a temperatura de refrigeração e que possam ser consumidos sem mais aquecimento, sendo estes os alimentos mais implicados como veículos para a transmissão desta infecção (McLauchlin, 1996a). Os alimentos de maior risco para listeriose são os prontos a comer e armazenados a temperatura de refrigeração durante um longo período de tempo, permitindo o crescimento de *L.monocytogenes* (Pinner *et al*, 1992; Rocourt, 1996; Rocourt e Cossart, 1997).

1.2.4) Prevenção e controlo na cadeia de produção de aves

O problema emergente de saúde pública que é a listeriose levou a OMS a sugerir que a presença de *L.monocytogenes* em vários alimentos deve ser investigada internacionalmente, e que a contaminação por *L.monocytogenes* deve ser controlada ou mesmo excluída da cadeia alimentar tanto quanto possível. Os pontos essenciais são controlar a sobrevivência e crescimento e minimizar a recontaminação dos alimentos processados a partir do ambiente (WHO, 1988).

As medidas de controlo para prevenção da listeriose devem começar nos locais de produção e continuar através do processamento até à manipulação dos alimentos nos estabelecimentos de venda e em casa dos consumidores (WHO, 1988; Farber e Peterkin, 1991; Sinell, 1995; ICMSF, 1996b). No entanto, sendo *L.monocytogenes* uma bactéria ubíqua no ambiente é impossível erradicar esta bactéria do ambiente de processamento e obter alimentos, incluindo carne e aves, totalmente isentos (Moreno e García, 1993; Mossel *et al*, 1995; ICMSF, 1996b; Bernard e Scott, 1999). Isto juntamente com a capacidade de crescimento a temperaturas de refrigeração torna necessário estabelecer medidas em toda a indústria alimentar (Mossel *et al*, 1995). Deste modo, a indústria de produtos cárneos tem tentado implementar sistemas de controlo para reduzir a contaminação e minimizar o risco de listeriose de origem alimentar (ICMSF, 1996b; Bernard e Scott, 1999).

Assim, um importante passo para reduzir a contaminação das carcaças de aves no fim do processamento seria prevenir ou limitar a entrada de *L.monocytogenes* no local de processamento (Hume *et al*, 1998). Para isso as medidas de prevenção e controlo devem ser aplicadas logo no **local de criação** dos animais, de modo a eliminar o patogénico do ambiente que rodeia os animais (Sinell, 1995). Por exemplo, nas explorações de criação animal, a produção de silagem deve ser controlada, de modo a evitar o desenvolvimento de elevado número de *L.monocytogenes* (ICMSF, 1996b). Adicionalmente, para proteger as aves da colonização com *L.monocytogenes*, como já referido para *Salmonella*, é proposto o tratamento dos pintos com uma população microbiana característica dos animais adultos que possa competir com patogénicos e impedir o seu estabelecimento ("exclusão competitiva"), tal como se verificou no estudo de Hume *et al* (1998). O tratamento dos pintos acabados de nascer permite iniciar mais rapidamente o desenvolvimento de uma população microbiana protectora destes animais susceptíveis a colonização com patogénicos (Hume *et al*, 1998).

No entanto, há estudos que sugerem que os animais não são a principal fonte de contaminação com *L.monocytogenes*, isto é, que as aves não serão o principal reservatório, de modo que o controlo desta bactéria deve ser fomentado particularmente no **ambiente de processamento**. Assim, nos locais de abate e processamento de produtos cárneos, a

contaminação de aves por *L.monocytogenes* pode ser reduzida através da implementação de condições sanitárias e de higiene, isto é, melhoria na limpeza e desinfecção em toda a linha de processamento e no ambiente desse locais (Varabioff, 1990; Moreno e García, 1993; Ojeniyi *et al*, 1996; Uyttendaele *et al*, 1997; Uyttendaele *et al*, 1999). Assim, as medidas preventivas para reduzir a presença de *Listeria* nos produtos cárneos passam por implementação nos locais de processamento de boas práticas de produção, na realização de programas de limpeza e higiene adequados e implementação do sistema HACCP que permite um controlo ao longo de toda a cadeia de processamento (Johnson *et al*, 1990; Moreno e García, 1993; ICMSF, 1996b). A indústria de carnes deve implementar programas que minimizem a presença, sobrevivência e multiplicação de *L.monocytogenes* nos alimentos, mas o maior desafio no controlo desta bactéria consiste em prevenir o seu estabelecimento num nicho, onde as práticas de limpeza e desinfecção se tornam ineficazes, de modo que a linha de processamento se mantém sempre contaminada (Bernard e Scott, 1999). Assim, é fundamental existir um programa de monitorização ambiental para *Listeria* spp. para verificar se o programa de controlo é eficaz (Bernard e Scott, 1999).

No entanto, pela grande dificuldade que pode representar a completa exclusão desta bactéria na indústria alimentar, outra hipótese proposta pela OMS é o uso de procedimentos que conduzam à destruição de *L.monocytogenes*, como a irradiação (WHO, 1988). Por exemplo, no estudo de Lewis e Corry (1991), verificou-se que a proporção das carcaças de frango contaminadas com *L.monocytogenes* foi menor nas aves irradiadas (34%) do que nas aves não sujeitas a este tratamento (56%), mostrando que a irradiação tem efeitos significativos na redução da incidência de *Listeria* spp. em frango fresco.

Em todo o caso, a presença de *L.monocytogenes* em **produtos prontos a comer**, sobretudo aqueles que se consomem sem prévio aquecimento, é muito mais perigosa do que a sua presença em carnes cruas (Moreno e García, 1993). Assim, neste tipo de produtos, devem ser usados processos que assegurem a destruição de *L.monocytogenes* (ex. tratamento térmico), mas também que minimizem o risco de contaminação pós processamento (Moreno e García, 1993; ICMSF, 1996b). A importância da prevenção da contaminação pós-processamento de produtos cárneos prontos a comer com *L.monocytogenes* é ainda mais empolada pelo facto desta bactéria patogénica conseguir sobreviver e proliferar ao armazenamento sob refrigeração, usado normalmente para evitar o crescimento de patogénicos transmitidos por alimentos (Glass e Doyle, 1989).

Assim, o modo mais efectivo para controlar a sobrevivência e o crescimento de *L.monocytogenes*, de modo a minimizar os seus níveis nos alimentos, passa pela implementação de boas práticas ao longo da cadeia de produção de alimentos (McLauchlin, 1996b; Qvist, 1996; Shank *et al*, 1996). A aplicação destas medidas preventivas de higiene

alimentar contribuíram mesmo para a melhoria da qualidade microbiológica de alguns alimentos prontos a comer no Reino Unido (McLauchlin, 1996b) e para a redução dos casos e mortes por listeriose no USA (Tappero *et al*, 1995; Shank *et al*, 1996).

Ao nível da **distribuição e venda a retalho**, as medidas preventivas incluem controlar as temperaturas de armazenamento e os tempos de conservação dos produtos (Moreno e García, 1993; ICMSF, 1996b; Shank *et al*, 1996). A temperatura é o factor mais importante a controlar devido à capacidade de *L.monocytogenes* se multiplicar durante a refrigeração dos produtos, de tal modo que temperaturas inferiores a 5ºC, apesar de não evitarem o seu crescimento, pelo menos conseguem retardar a multiplicação em muitos alimentos (ICMSF, 1996b). Adicionalmente, nos estabelecimentos de venda é fundamental o cumprimento de regras básicas de higiene para evitar a contaminação cruzada entre produtos crus de origem animal e produtos prontos a comer (Moreno et García, 1993; ICMSF, 1996b; Shank *et al*, 1996). Além disso, a prevenção da listeriose pode ser conseguida através de uma intensiva monitorização da produção alimentar, ao nível do processamento industrial, rede de distribuição e estabelecimentos de venda a retalho (Scuchat *et al*, 1992).

Por fim, os **consumidores**, particularmente as populações de risco, também têm um papel importante na estratégia de prevenção de listeriose, havendo necessidade de serem educados para a utilização de procedimentos correctos na escolha e manipulação de alimentos (WHO, 1988; Schuchat *et al*, 1992; ICMSF, 1996b; Shank *et al*, 1996; Bernard e Scott, 1999). A elevada prevalência de *L.monocytogenes* em aves representa um risco potencial, especialmente se estes alimentos forem consumidos crus ou mal cozinhados ou se ocorrer contaminação cruzada para outros alimentos, em casa (Johnson *et al*, 1990).

Assim, Schuchat *et al* (1992) sugerem que os médicos e outros profissionais de saúde devem aconselhar as pessoas mais susceptíveis, nomeadamente a cozinhar adequadamente as carnes e aves e a evitar a contaminação cruzada entre alimentos crus e cozinhados, tal como devem ser educados os manipuladores de estabelecimentos alimentares. Já Schwartz *et al* (1988) sugeriram que o frango mal cozinhado e os cachorro-quentes não cozinhados deviam ser adicionados à lista dos alimentos associados com listeriose e que os consumidores, especialmente os mais susceptíveis (grávidas e imunodeprimidos) deviam prevenir a listeriose preparando adequadamente os alimentos e evitando alimentos mal cozinhados que estejam implicados como factores de risco. Por exemplo, no Reino Unido, o declínio no número de casos registados de listeriose, nomeadamente entre as grávidas, foi associado com as modificações alimentares nos grupos de risco em resposta aos aconselhamentos propostos pelas autoridades de saúde pública (McLauchlin, 1996b). Nos USA, o aumento dos conhecimentos do público resultantes dos programas de educação em segurança alimentar dirigidos às populações

em risco também contribuiu para a diminuição da incidência de casos de listeriose (Tappero *et al*, 1995).

Em vários países, foram estabelecidos **critérios** ou recomendações para os níveis toleráveis de *L.monocytogenes* nos **alimentos prontos a comer**. Por exemplo, os USA e a Itália requerem ausência de *L.monocytogenes* em 25 g de alimento ("tolerância zero") enquanto outros países europeus (ex. Alemanha, Holanda e França) têm uma tolerância de 100 CFU/g no ponto de consumo. Outros países, como o Canadá e a Dinamarca têm uma tolerância de 100 CFU/g para alguns alimentos e uma tolerância zero para outros, especialmente aqueles que permitem o crescimento e que têm períodos de vida longos (Norrung, 2000).

Nos USA, as autoridades de saúde pública e as agências reguladoras estabeleceram uma política de "tolerância zero" (ausência em 25g) para *L.monocytogenes* em alimentos cozinhados e em alimentos prontos a comer, baseando-se no facto da bactéria causar doença em humanos, crescer a temperaturas de refrigeração e a dose infecciosa ser desconhecida (Shank *et al*, 1996). Esta política mostrou ser bem sucedida tendo em conta o declínio significativo de listeriose observado no estudo de Tappero *et al* (1995) e por isso aumentar os limites pode ser um risco (Shank *et al*, 1996). Uma política baseada na gravidade da listeriose e no facto da dose infecciosa mínima ser desconhecida conduz a uma política de tolerância zero para todos os alimentos prontos a comer, no entanto a experiência mostra que a eliminação completa de microrganismos patogénicos da cadeia alimentar é impossível, podendo apenas ser reduzido o risco de contaminação (Qvist, 1996; Farber e Harwig, 1996). Assim, tendo em conta a baixa frequência de listeriose, embora seja elevada a frequência de exposição a *L.monocytogenes* através da cadeia alimentar, não se justificam políticas tão restritivas, podendo ser estabelecidos critérios de acordo com a categoria dos alimentos como fizeram as autoridades de países como a Dinamarca (Qvist, 1996) e o Canadá (Farber e Harwig, 1996).

De acordo com a avaliação dos riscos, a listeriose de origem alimentar está associada com produtos em que os níveis iniciais do patogénico aumentaram devido a condições que permitiram o crescimento, de modo que os alimentos que não permitem a proliferação de *L.monocytogenes* são fontes improváveis de listeriose. Existe pouca evidência que baixos níveis de *L.monocytogenes* (<100/g) nos alimentos representem risco para a saúde, mesmo nos indivíduos mais susceptíveis (Norrung, 2000). Assim, tendo em conta as informações epidemiológicas de vários países, uma contaminação com *L.monocytogenes* que não exceda 100 CFU/g de alimento no momento do consumo é de baixo risco para os consumidores. No entanto, de modo a não serem excedidos estes níveis no consumo, pode ser necessário aplicar níveis mais baixos para os alimentos em que possa ocorrer crescimento (Norrung, 2000).

1.2.5) Características da listeriose

A listeriose caracteriza-se por ser uma doença transmitida por alimentos grave que pode conduzir à morte. A taxa de mortalidade das infecções por *L.monocytogenes* é geralmente cerca de 20 a 30% para surtos e casos esporádicos, dependendo do tipo de infecção e das condições subjacentes (Rocourt, 1996; Rocourt e Cossart, 1997; Rocourt *et al*, 2000). Apesar de não ser um dos agentes mais frequentes de doenças transmitidas por alimentos, as estimativas dos USA referem que é um dos agentes mais responsáveis por hospitalizações e mortes (Mead *et al*, 1999). A elevada taxa de mortalidade, juntamente com a elevada prevalência de *L.monocytogenes* nos alimentos, sugere que esta bactéria represente um importante risco para a saúde humana (Norrung, 2000). Para além do consumo de alimentos contaminados ser a principal via de transmissão de listeriose, esta doença pode ser mais raramente transmitida por contacto directo com animais infectados ou por infecção cruzada nos hospitais entre recém-nascidos (McLauchlin, 1996a).

A maioria dos casos humanos de listeriose ocorre em indivíduos com o sistema imunitário alterado ou deficiente devido a várias condições subjacentes (WHO, 1988; Farber e Peterkin, 1991; Schuchat *et al*, 1991; ICMSF, 1996b; Rocourt, 1996; Rocourt e Cossart, 1997; Rocourt *et al*, 2000). Assim, são particularmente susceptíveis a infecções por *L.monocytogenes*, as mulheres grávidas e recém-nascidos, os idosos e os indivíduos imunodeprimidos por medicação ou doença (transplante de órgãos, cancro, SIDA e infectados por VIH, doenças crónicas) (WHO, 1988; Farber e Peterkin, 1991; Schuchat *et al*, 1991; ICMSF, 1996b; Rocourt, 1996; Rocourt e Cossart, 1997; Rocourt *et al*, 2000). Por ordem decrescente de risco, de acordo com a incidência de listeriose, estão: transplantados, indivíduos com SIDA, infectados por VIH, grávidas, indivíduos com cancro e idosos (Rocourt, 1996).

A patogenicidade de *L.monocytogenes* manifesta-se em adultos causando infecções do sistema nervoso central, como meningite e meningoencefalite, e septicemia (Schuchat *et al*, 1991; Rocourt, 1996; Schlech, 1996; Rocourt e Cossart, 1997; Rocourt *et al*, 2000). Em mulheres grávidas, as infecções podem ser assintomáticas ou caracterizadas por um síndroma gripal (febre, mialgias, dores de cabeça e ocasionalmente sintomas gastrointestinais), sendo as consequências mais graves para a criança, incluindo aborto espontâneo, morte fetal, parto prematuro e infecções graves no recém-nascido, tais como septicemia e meningite (Farber e Peterkin, 1991; Schuchat *et al*, 1991; ICMSF, 1996b; Rocourt, 1996; Schlech, 1996; Rocourt e Cossart, 1997; Rocourt *et al*, 2000).

Mais recentemente, foram descritos vários surtos e casos em que se demonstra que a listeriose de origem alimentar pode apresentar uma forma mais moderada, com sintomas de doença gastrointestinal após a ingestão de alimentos contaminados com

L.monocytogenes (Riedo *et al*, 1994; Salamina *et al*, 1996; Dalton *et al*, 1997; Miettinen *et al*, 1999; Aureli *et al*, 2000). Assim, *L.monocytogenes* deve passar a ser considerada um agente etiológico de doença gastrointestinal em pessoas sem condições subjacentes que as predisponha para listeriose (Dalton *et al*, 1997; Miettinen *et al*, 1999; Aureli *et al*, 2000), de modo que a pesquisa deste patogénico deve ser incluída durante as investigações de surtos de doenças transmitidas por alimentos (Salamina *et al*, 1996). Adicionalmente, Aureli *et al* (2000) sugerem que os dados epidemiológicos disponíveis estão provavelmente a subestimar os casos atribuídos a esta bactéria.

O período de incubação é muito variável, podendo ser tão curto como 1 a 2 dias até várias semanas (ICMSF, 1996b; McLauchlin, 1996a). Não se sabe se estas diferenças no período de incubação após a ingestão oral são dependentes da dose ou da estirpe, ou se reflectem diferenças na susceptibilidade do hospedeiro (McLauchlin, 1996a). Os períodos de incubação prolongados também contribuem, em muitos casos, para as falhas na identificação do alimentos específico que esteve na origem da infecção, uma vez que se torna mais difícil obter a história alimentar e o produto deixa de estar disponível para análise após esse tempo (McLauchlin, 1996a; Rocourt, 1996).

Não existem dados experimentais sobre a dose infecciosa mínima de *L.monocytogenes* em humanos (Farber e Peterkin, 1991; Schuchat *et al*, 1991; ICMSF, 1996b; Rocourt, 1996; Norrung, 2000; Rocourt *et al*, 2000). No entanto, os dados publicados indicam que o número de *L.monocytogenes* em alimentos contaminados responsáveis por surtos e casos esporádicos tem sido elevado, habitualmente superior a 100 CFU/g (Rocourt e Cossart, 1997; Norrung, 2000), sendo sugerido que a dose infecciosa seja superior a 100 células viáveis (ICMSF, 1996b; Rocourt, 1996). Além disso, os alimentos normalmente implicados em surtos são alimentos que permitem o crescimento deste patogénico e a maioria das pessoas ingere normalmente alimentos que apresentam um baixo número de *L.monocytogenes* sem ficarem doentes (Norrung, 2000). Assim, o facto de *L.monocytogenes* ser disseminada no ambiente, incluindo alimentos, e mesmo assim a incidência de listeriose ser baixa, juntamente como esta bactéria estar geralmente presente em baixo número nos alimentos, sugere que a dose infecciosa para listeriose de origem alimentar é provavelmente alta (McLauchlin, 1996a; Farber e Harwig, 1996). No entanto, a possibilidade de infecção a partir de doses menores não deve ser excluída (McLauchlin, 1996a; Rocourt *et al*, 2000), pois nos grupos de risco um baixo número de *L.monocytogenes* pode ser suficiente para causar listeriose (Farber e Peterkin, 1991).

A listeriose está associada com elevada taxa de mortalidade, de modo que o tratamento com antibióticos é essencial (Jones e MacGowan, 1995). O tratamento para a listeriose continua a consistir na administração de ampicilina ou penicilina G combinada com um aminoglicosídeo, normalmente a gentamicina (Boisivon *et al*, 1990; Schuchat *et al*, 1991;

Jones e MacGowan, 1995; Schlech, 1996; Heger *et al*, 1997; Temple e Nahata, 1999). Em casos de alergia aos antibióticos β-lactâmicos, a associação trimetoprim/sulfametoxazol constitui uma alternativa adequada (Boisivon *et al*, 1990; Jones e MacGowan, 1995; Temple e Nahata, 1999). De acordo com o local da infecção, podem ser usados outros agentes antimicrobianos como eritromicina, vancomicina e rifampicina (Larsson *et al*, 1985; Schuchat *et al*, 1991; Jones e MacGowan, 1995; Charpentier *et al*, 1995; Schlech, 1996; Temple e Nahata, 1999). As novas fluoroquinolonas também podem ser uma opção no tratamento da listeriose (Jones e MacGowan, 1995; Temple e Nahata, 1999).

Apesar de uma grande variedade de agentes antimicrobianos ser activa contra *L.monocytogenes*, a mortalidade por listeriose é ainda elevada (Charpentier *et al*, 1995; Schlech, 1996; Charpentier e Courvalin, 1999), de tal modo que a aquisição de resistência a esses antibióticos por *L.monocytogenes* poderá representar graves problemas em medicina humana (Charpentier e Courvalin, 1999).

2) Bactérias zoonóticas resistentes a agentes antimicrobianos

2.1) Uso de agentes antimicrobianos em animais de consumo

Com a produção intensiva de animais de consumo, nomeadamente aves, a que alguns agentes infecciosos tendem a estar associados, tem ocorrido simultaneamente o uso largamente difundido de antibióticos nesses animais (Osterholm, 2000). Esta situação deve-se à necessidade de controlar doenças infecciosas em animais, cuja susceptibilidade é maior como consequência de serem sujeitos a práticas de produção intensivas que obrigam a manutenção de muitos animais em espaços limitados (Tollefson e Miller, 2000). Apesar do interesse demonstrado pela higiene na prevenção de doenças infecciosas, a produção intensiva de animais depende ainda fortemente do uso de agentes antimicrobianos com fins veterinários (Van den Bogaard e Stobberingh, 1999).

Assim, um grande número de substâncias com actividade antimicrobiana é usado na produção animal moderna (Aarestrup *et al*, 1998a). Alguns países referem mesmo que metade ou mais dos antibióticos produzidos são utilizados na produção agrícola, piscicultura e na produção animal (gado bovino, suíno e aves), sendo apenas os restantes aplicados no tratamento de infecções humanas (WHO, 1997; Parecer 98/C407/02; Aarestrup, 1999; Mlot, 2000). Segundo Mlot (2000) nos USA o uso de agentes antimicrobianos é, por vezes, muito intenso, podendo em frangos, a exposição a antibióticos ocorrer em 42 dos seus 45 dias de vida. Para além do consumo de antibióticos ser muito elevado, tendo em conta o curto tempo de vida dos animais, também, em pequenos animais como as aves, a dose de antibiótico por Kg de peso corporal é muito maior comparativamente com as doses usadas nos humanos (Van den Bogaard e Stobberingh, 1999).

Nos animais, os agentes antimicrobianos são utilizados com três objectivos principais: **tratamento** de infecções identificadas, **prevenção** de doenças em animais de risco, diminuindo a mortalidade e a morbilidade, e também como aditivos alimentares **promotores do crescimento**, administrados em doses subterapêuticas por rotina na alimentação (D'Aoust *et al*, 1992; WHO, 1997; Aarestrup *et al*, 1998b; Parecer 98/C407/02; Aarestrup, 1999; Van den Bogaard e Stobberingh, 1999; Osterholm, 2000; Tollefson e Miller, 2000). A utilização de antimicrobianos promotores do crescimento (substâncias usadas para aumentar o ganho de peso ou reduzir as necessidades alimentares em animais de criação) em animais saudáveis permite aumentar a taxa de crescimento, melhorar a eficiência dos alimentos (atingir o peso desejado necessitando de menos alimento) e reduzir os detritos excretados na produção intensiva de animais (WHO, 1997; Van den Bogaard e Stobberingh, 1999).

Actualmente, a legislação em vigor na Comunidade Europeia (Regulamento nº 508/1999/CE) relativamente a antimicrobianos para uso terapêutico em animais destinados à produção de alimentos, permite em **aves** a utilização de um grande número de agentes de vários grupos como: sulfonamidas, derivados de diaminopirimidina (trimetoprim), penicilinas (amoxicilina, ampicilina, benzilpenicilina, cloxacilina, dicloxacilina e oxacilina), quinolonas (danofloxacina, difloxacina, enrofloxacina, sarafloxacina e flumequina), macrólidos (espiramicina, tilmicosina e tilosina, eritromicina e josamicina), florfenicol e compostos afins (tianfenicol), tetraciclinas (clortetraciclina, doxiciclina, oxitetraciclina e tetraciclina), aminoglicosídeos (aminosidina, diidroestreptomicina, neomicina, espectinomicina e estreptomicina) e polimixinas (colistina). Salienta-se que para cada um dos medicamentos veterinários referidos estão estabelecidos os Limites Máximos de Resíduos (LMR), definitivos ou provisórios, nos alimentos de origem animal.

Relativamente a antimicrobianos usados como promotores de crescimento, a legislação europeia também permite a sua utilização como aditivos na alimentação para animais (Decreto-Lei nº 289/1999), e fixa as doses a incorporar nas rações. Em aves são permitidos o flavofosfolipol, monensina de sódio e avilamicina.

2.2) Consequências do uso de antimicrobianos nos animais

O uso difundido de antibióticos é um dos principais factores responsáveis pelo desenvolvimento da resistência aos antibióticos, pois exerce pressão selectiva eliminando as bactérias sensíveis e permitindo a propagação das bactérias resistentes (Parecer 98/C407/02; Tollefson e Miller, 2000). Assim, as espécies bacterianas presentes nos animais de produção estão expostas a uma substancial e, em muitos casos, constante pressão selectiva (Aarestrup, 1999).

O uso de agentes antimicrobianos nos animais de produção para tratamento, profilaxia e promoção de crescimento conduz à selecção de bactérias resistentes, sendo a resistência seleccionada nas bactérias patogénicas alvo dos antibióticos, mas também noutras bactérias expostas, como as comensais dos animais, que podem incluir patogénicos humanos, para os quais os animais são reservatório e que por isso são transmitidos em alimentos de origem animal (WHO, 1997; Levy, 1998; Aarestrup, 1999; Van den Bogaard e Stobberingh, 1999; Tollefson e Miller, 2000). Por exemplo, nos estudos de Aarestrup *et al* (1998a; 1998b) detectou-se resistência a antimicrobianos promotores de crescimento e aos usados em terapêutica animal entre bactérias normais do intestino dos animais, nas bactérias patogénicas para o Homem e nas patogénicas para os animais.

As doses subterapêuticas de antibióticos administradas aos animais são mais baixas do que as necessárias para tratamento de infecções graves, mas suficientemente altas para

inibir o crescimento da população microbiana intestinal susceptível desses animais e por isso potenciar a emergência e distribuição de patogénicos resistentes, incluindo *Salmonella*, em aves e outros produtos alimentares de origem animal (Holmberg *et al*, 1984b; D'Aoust *et al*, 1992; Van den Bogaard e Stobberingh, 1999). Assim, ministrar antibióticos a animais selecciona bactérias resistentes susceptíveis de serem transmitidas aos seres humanos através da cadeia alimentar (Holmberg *et al*, 1984b; Parecer 98/C407/02; Tollefson e Miller, 2000).

2.3) Impacto na Saúde Pública do uso de antimicrobianos nos animais

Por um lado, a emergência de resistência aos antimicrobianos entre bactérias isoladas de animais de consumo pode comprometer o tratamento de infecções nos próprios animais, se as bactérias resistentes seleccionadas forem patogénicas para eles (Aarestrup *et al*, 1998b; Aarestrup, 1999). Adicionalmente, como o tracto intestinal dos animais é frequentemente reservatório de bactérias patogénicas para o Homem (ex. *Salmonella* e *Listeria*), o desenvolvimento de resistências nessas bactérias constitui um risco para a saúde pública, principalmente pela possibilidade da terapêutica falhar (Aarestrup, 1999; Tollefson e Miller, 2000).

Assim, as consequências na saúde humana ocorrem quando as bactérias resistentes são patogénicas e transmissíveis dos animais para o Homem, por contacto directo ou pela cadeia alimentar, ou quando os genes de resistência emergem na população bacteriana dos animais com subsequentemente transferência para bactérias patogénicas para o Homem (WHO, 1997; Aarestrup *et al*, 1998b; Van den Bogaard e Stobberingh, 1999; Tollefson e Miller, 2000). Segundo a OMS (WHO, 1997), as consequências adversas da selecção de bactérias resistentes nos animais incluem: aumento na prevalência de bactérias resistentes nos animais, transferência de patogénicos resistentes para os humanos por contacto directo com esses animais ou através do consumo de alimentos ou água contaminados; transferência de genes de resistência para bactérias humanas; aumento na incidência de infecções humanas causadas por patogénicos resistentes e insucessos terapêuticos em animais e humanos.

Do mesmo modo, Piddock (1996) sugere três vias para que o uso de antimicrobianos na produção animal possa causar risco à saúde humana: 1) os patogénicos resistentes são seleccionados nos animais, os produtos alimentares ficam contaminados durante o abate ou a preparação do alimento, o alimento é ingerido, causando infecção que requer o uso de terapia, mas esta está comprometida devido às estirpes resistentes; 2) bactérias não patogénicas resistentes são seleccionadas nos animais, transferidas para o Homem pelo consumo de produtos alimentares contaminados e os genes de resistência são

subsequentemente transferidos para outras bactérias no intestino humano; 3) os antibióticos que permanecem como resíduos em produtos de origem animal, como carne e leite, podem também conduzir à selecção de bactérias resistentes no consumidor do produto alimentar.

Assim, o uso indiscriminado de antibióticos tem consequências adversas, não só promovendo a selecção e prevalência de populações microbianas resistentes a esses agentes, mas também porque a resistência pode ser transferida por elementos genéticos móveis, como os plasmídeos e os transposões, de umas bactérias para outras, incluindo de bactérias comensais para patogénicas (Duffy *et al*, 1999; Van den Bogaard e Stobberingh, 1999). Quanto maior for o número de bactérias resistentes na população intestinal dos animais, maior é a probabilidade dos genes de resistência serem transferidos para bactérias patogénicas e ocorrer disseminação dos animais para os alimentos de origem animal (Van den Bogaard e Stobberingh, 1999).

Por outro lado, por exposição repetida aos antibióticos no ambiente, as estirpes bacterianas podem desenvolver características de resistência múltipla (Levy, 1998; Aarestrup, 1999; Duffy *et al*, 1999). Algumas espécies de bactérias possuem genes de multiresistência, que podem conferir resistência a vários antimicrobianos, e agentes de grupos diferentes podem seleccionar resistência a outros que possuam locais de acção comuns (Tollefson e Miller, 2000). Sob pressão selectiva, os genes de resistência têm tendência a acumular-se em plasmídeos multiresistentes (Van den Bogaard e Stobberingh, 1999). Os transposões que medeiam resistência múltipla também estão a ser registados com maior frequência (Aarestrup, 1999).

A proliferação de genes de resistência aos antibióticos está a aumentar também pela facilidade da disseminação das estirpes resistentes entre os animais, especialmente na produção intensiva, em que muitos animais são mantidos juntos (Van den Bogaard e Stobberingh, 1999). Também a formação de grande quantidade de detritos, resultantes deste tipo de produção e que são utilizados pelos produtores para alimentação de outros animais, permite não só a disseminação potencial de resíduos de antibióticos, mas também que patogénicos que estão presentes nesses detritos e também bactérias resistentes aos antimicrobianos, patogénicas ou não, passem de uns animais para outros (Haapapuro *et al*, 1997).

Nos últimos anos, a preocupação sobre as consequências para a saúde pública do uso de antibióticos em animais de consumo aumentou (WHO, 1997; Parecer 98/C407/02). Vários estudos têm revelado um aumento no número de infecções em humanos causadas por bactérias resistentes aos antibióticos que podem ser adquiridas através dos alimentos e associadas ao uso de tais substâncias na produção animal, incluindo aves (WHO, 1997; Aarestrup, 1999; Mlot, 2000). Deste modo, a presença de microrganismos patogénicos, incluindo *Salmonella* e *L.monocytogenes*, resistentes a antibióticos nos alimentos representa

um problema de saúde pública extremamente grave (Duffy *et al*, 1999; Tollefson e Miller, 2000). A propagação das resistências continua a aumentar, pois as bactérias e os seus genes de resistência podem transferir-se livremente de um sistema ambiental para outro, como por exemplo dos animais para os alimentos e destes para as pessoas (WHO, 1997; Parecer 98/C407/02).

O problema é que alguns antibióticos usados para tratamento e promoção do crescimento na produção animal são também usados para controlar doenças no Homem (WHO, 1997; Wegener, 1999). Por outro lado, outros antibióticos usados nos animais seleccionam resistência cruzada a antimicrobianos usados em medicina humana (WHO, 1997). Por exemplo, o uso do glicopeptído avoparcina, como promotor de crescimento em rações para animais, contribuiu para a criação de um reservatório animal de *Enterococcus* resistentes ao glicopeptído vancomicina (usada em humanos), que foram subsequentemente transferidos para os humanos através da cadeia alimentar (WHO, 1997; Van den Bogaard e Stobberingh, 1999; Tollefson e Miller, 2000). No estudo de Aarestrup *et al* (1998a) uma grande proporção de *E.faecium* isolados de porcos e frangos foram simultaneamente resistentes aos glicopeptídos avoparcina e vancomicina.

Deste modo, as infecções causadas pelas bactérias resistentes contribuem para o aumento das taxas de morbilidade e de mortalidade, pois as possibilidades de tratamento estão significativamente reduzidas, e, consequentemente, para o crescimento das despesas com os cuidados de saúde (Tollefson, 1996; Parecer 98/C407/02). As doenças transmitidas por alimentos têm um grande impacto na saúde pública, de modo que o desenvolvimento de resistência em patogénicos transmitidos por alimentos pode complicar mais a situação, pois as opções terapêuticas estão comprometidas (Tollefson e Miller, 2000).

Assim, o aumento global da resistência aos agentes antimicrobianos é um problema grave de saúde pública com grande impacto económico para a sociedade em todos os países (Tollefson, 1996; Parecer 98/C407/02). Actualmente, depois de meio século de utilização de antibióticos, os genes de resistência a estes são mais ou menos prevalentes em todos os principais agentes bacterianos patogénicos e a prevalência de bactérias resistentes está actualmente a aumentar (Parecer 98/C407/02). Para além de um aumento na frequência de bactérias resistentes, também o número de antimicrobianos a que elas são resistentes é crescente, ou seja, a multiresistência marca a última década (Levy, 1998).

2.3.1) Emergência de resistência em *Salmonella*

O uso universal de antimicrobianos, através da pressão selectiva gerada, possibilitou a propagação de microrganismos resistentes a esses agentes, incluindo do género *Salmonella* (Nair *et al*, 1995; Parecer 98/C407/02; Tollefson e Miller, 2000). Nas últimas

décadas, estirpes de *Salmonella* têm vindo a adquirir uma cada vez maior resistência aos antimicrobianos, assumindo a nível mundial uma das prioridades, cada vez mais proeminente, de saúde pública (Lee *et al*, 1994; Nair *et al*, 1995; Parecer 98/C407/02; Glynn *et al*, 1998)

O uso difundido de antibióticos em medicina humana e veterinária e como aditivos alimentares conduziu à proliferação de estirpes de *Salmonella* resistentes em humanos, animais e no ambiente (Poppe *et al*, 1996; Ramos *et al*, 1996; D'Aoust, 1997; Arvanitidou *et al*, 1998). No entanto, a emergência de *Salmonella* não tifóide resistentes a agentes antimicrobianos está principalmente associada com o uso dessas substâncias em animais de produção, quer para fins terapêuticos, quer não terapêuticos, uma vez que a salmonelose é adquirida principalmente através de alimentos contaminados de origem animal (D'Aoust, 1997; Glynn *et al*, 1998; Fey *et al*, 2000; Angulo *et al*, 2000; Tollefson e Miller, 2000). Assim, o uso por rotina de antimicrobianos na produção animal promove a emergência e persistência de estirpes de *Salmonella*, e outros patogénicos, resistentes a esses agentes nos animais e produtos alimentares de origem animal (Holmberg *et al*, 1984b; D'Aoust, 1997; Angulo *et al*, 2000). Ou seja, a resistência manifestada por *Salmonella* reflecte o ambiente em que a bactéria cresce (Levy, 1998). Várias evidências suportam a ideia de que a resistência a agentes antimicrobianos em estirpes de *Salmonella* isoladas de humanos resulta do uso dessas substâncias em animais de consumo (Angulo *et al*, 2000).

Em primeiro lugar, existem provas directas de que a utilização de agentes antimicrobianos em **animais** selecciona serótipos de *Salmonella* não tifóide resistentes a esses mesmos agentes e que estas bactérias têm sido transmitidas ao Homem através dos alimentos ou do contacto directo com animais (WHO, 1997; Angulo *et al*, 2000). Um exemplo actual, é que existem poucas dúvidas de que a persistência de *S.*Typhimurium DT104 multiresistente, cujo perfil de resistência mais comum inclui a ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamidas e tetraciclina (fenótipo ACSSuT), em animais de consumo, em vários países europeus, esteja associada com o uso de antibióticos na produção animal, não só para tratamento, mas também para profilaxia (Threlfall *et al*, 1997a). Um aumento marcado na incidência de estirpes humanas de *S.*Typhimurium DT104 multiresistentes tem sido verificado em vários países (Threlfall *et al*, 1997a; Threlfall *et al*, 1998; Cormican *et al*, 1998; Glynn *et al*, 1998). No Reino Unido, *S.*Typhimurium DT104 está largamente difundida em animais de criação, particularmente gado, e vários estudos associaram as infecções em humanos com o consumo de vários produtos cárneos, incluindo frango. Nos USA, a associação foi com o consumo de produtos lácteos não pasteurizados e contacto com animais (Glynn *et al*, 1998).

Também o aumento da prevalência de resistência às quinolonas em *Salmonella* isoladas de animais, incluindo aves, está relacionado com a introdução de fluoroquinolonas,

tais como enrofloxacina, licenciadas para uso veterinário (Griggs *et al*, 1994; WHO, 1998; Malorny *et al*, 1999). A introdução de fluoroquinolonas na produção animal, incluindo aves, determinou, em vários países, a emergência de serótipos de *Salmonella*, isolados de humanos, com reduzida susceptibilidade às fluoroquinolonas (WHO, 1997; WHO, 1998; Mlot, 2000). Por exemplo, resistência adicional à ciprofloxacina foi observada nas estirpes referidas atrás de *S*.Typhimurium DT104 multiresistentes (Threlfall *et al*, 1997a).

Uma segunda evidência, é o facto dos **padrões de resistência** aos antimicrobianos observados em isolados de pessoas com infecções por *Salmonella* mostrarem mais resistência a agentes antimicrobianos usados na produção animal do que aos usados no tratamento destas infecções em humanos (Angulo *et al*, 2000). Isto é, o tipo de antibióticos usados em animais é similar às resistências observadas em *Salmonella* de animais e de humanos, enquanto o tipo de agentes usados nos humanos não se correlaciona com as resistências encontradas em isolados humanos (Angulo *et al*, 2000). Além disso, os padrões de resistência a antimicrobianos são semelhantes em *Salmonella* isoladas de humanos e animais saudáveis. Por exemplo, nos USA, as infecções humanas com *Salmonella* do serótipo Heidelberg são frequentemente associadas com ingestão de frango mal cozinhado, de modo que o perfil de resistência a agentes antimicrobianos de *S*.Heidelberg isoladas de humanos e de frangos é similar (Angulo *et al*, 2000).

Em terceiro lugar, várias investigações de **surtos** de infecções causadas por estirpes de *Salmonella* resistentes aos antimicrobianos conseguiram associar essas estirpes aos animais e ao uso de antibióticos nos animais (Angulo *et al*, 2000). A transferência de estirpes de *Salmonella* resistentes dos animais para os humanos, resultando em infecções graves difíceis de tratar devido às resistências, foi documentada por vários autores (Holmberg *et al*, 1984a; Molbak *et al*, 1999; Fey *et al*, 2000), sendo provável que as estirpes tenham sido seleccionadas pelo uso de agentes antimicrobianos nos animais. Nos USA, Holmberg *et al* (1984a), foram os primeiros a documentar um surto de salmonelose causado por *S*.Newport multiresistente associado ao consumo de hambúrgueres originados de carne de vacas alimentadas com doses subterapêuticas de clorotetraciclina, para promoção do crescimento. Mais recentemente, no mesmo país, foi descrito um caso de salmonelose causado por uma *S*.Typhimurium multiresistente, incluindo a uma cefalosporina (ceftriaxona), em que muito provavelmente o reservatório animal foi a fonte da infecção e em que o uso de antibióticos no gado teve um papel na selecção desta estirpe específica de *Salmonella* (Fey *et al*, 2000). Do mesmo modo, na Dinamarca, Molbak *et al* (1999) documentaram o primeiro surto causado por uma *S*.Typhimurium DT104 multiresistente, incluindo às quinolonas, com difusão destas estirpes resistentes de animais de consumo (suínos) para o Homem. Anteriormente, já Holmberg *et al* (1984b) tinham verificado que a transmissão de *Salmonella* resistentes dos animais ao Homem não era um acontecimento

raro, pois na maioria dos surtos, ocorridos nos USA entre 1971 e 1983, causados por estas bactérias foram incriminados alimentos de origem animal.

Os vários casos de transmissão de *Salmonella* resistentes dos animais para o Homem mostram que a emergência e a prevalência dessas estirpes de *Salmonella* em produtos cárneos é um problema de saúde pública (D'Aoust *et al*, 1992; Lee *et al*, 1993; Manie *et al*, 1998; Van den Bogaard e Stobberingh, 1999). A resistência aos antimicrobianos limita as opções terapêuticas disponíveis de veterinários e médicos para os casos de *Salmonella* não tifóide que requerem tratamento (WHO, 1997). Assim, comparando com doentes com infecções susceptíveis, os doentes com infecções resistentes aos antimicrobianos têm mais probabilidade de necessitar de hospitalização e desta ser mais prolongada, aumentando também o risco de maior morbilidade e mortalidade (Lee *et al*, 1994). Também Holmberg *et al* (1984b), relativamente a dados dos surtos nos USA entre 1971 e 1983, verificaram que a taxa de mortalidade em doentes com infecções causadas por estirpes de *Salmonella* resistentes a antimicrobianos foi maior do que para aqueles com infecções causadas por estirpes sensíveis.

Uma vez que a maioria das infecções por *Salmonella* são adquiridas pela ingestão de alimentos contaminados, nomeadamente alimentos de origem animal, consequentemente a maioria das infecções por estirpes de *Salmonella* resistentes são adquiridas pela ingestão desses produtos contaminados com essas bactérias (Angulo *et al*, 2000). Sendo as aves um dos veículos mais importantes de *Salmonella*, então o risco de transmissão de estirpes resistentes é também elevado. Dado o elevado número de infecções por *Salmonella* em humanos, os factores que conduzem à emergência e aumento da prevalência de *Salmonella* resistentes aos antimicrobianos são importantes em termos de saúde pública (Angulo *et al*, 2000).

O problema da persistência de estirpes de *Salmonella* resistentes em produtos de origem animal é ampliado devido à incapacidade de se efectuarem reduções significativas de patogénicos nos animais, nas carcaças e de eliminar as fontes potenciais de contaminação cruzada durante o processamento (D'Aoust, 1997). Adicionalmente, as práticas intensivas de criação de aves e o uso difundido de rações com aditivos facilitam a transmissão horizontal de *Salmonella* nos bandos e apoiam a disseminação de estirpes de *Salmonella* resistentes no ambiente das aves (D'Aoust *et al*, 1992).

Assim, as aves, especialmente as alimentadas com rações suplementadas com antibióticos, excretam frequentemente estirpes de *Salmonella* multiresistentes, as quais através de contaminação cruzada durante o abate ou durante a preparação da carcaça podem passar para a cadeia alimentar humana (Arvanitidou *et al*, 1998). Por outro lado, os consumidores modernos têm a percepção de que os alimentos mal cozinhados são mais saudáveis porque causam menos danos aos nutrientes, o que os tornou mais susceptíveis

às doenças transmitidas por alimentos, incluindo às causadas por agentes infecciosos resistentes aos antimicrobianos (Manie *et al*, 1998). Uma vez que o consumo de aves aumentou, o potencial para a transmissão de estirpes de *Salmonella* resistentes aos agentes antimicrobianos também é maior.

2.3.2) Emergência de resistência em *Listeria* spp. e *L.monocytogenes*

A pressão selectiva exercida pelo uso difundido de agentes antimicrobianos em humanos e nos animais tem acelerado a emergência de bactérias resistentes, incluindo espécies de *Listeria*, consideradas até recentemente susceptíveis a quase todos os antibióticos (Charpentier e Courvalin, 1999). Uma vez que é actualmente reconhecida a origem alimentar das infecções por *L.monocytogenes*, é importante reconsiderar o uso de antibióticos como suplementos nas rações para animais (Charpentier e Courvalin, 1999).

A maioria dos isolados clínicos, alimentares e ambientais de *Listeria* spp. são considerados susceptíveis aos agentes antimicrobianos usados contra bactérias Gram positivo (Charpentier *et al*, 1995; Charpentier e Courvalin, 1999). No entanto, a emergência de estirpes multiresistentes começou a pôr em causa a ideia generalizada de *Listeria* como sendo um género bacteriano uniformemente susceptível a antibióticos (Charpentier e Courvalin, 1999). A primeira estirpe clínica de *L.monocytogenes* resistente a agentes antimicrobianos foi isolada em 1988 em França, sendo também a primeira estirpe multiresistente (Poyart-Salmeron *et al*, 1990). Desde então, têm sido descritas outras estirpes de *L.monocytogenes*, isoladas de casos esporádicos de listeriose, resistentes a um ou mais agentes antimicrobianos (Quentin *et al*, 1990; MacGowan *et al*, 1990; Hadorn *et al*, 1993; Tsakris *et al*, 1997).

Para além do aumento do número de isolados clínicos de *Listeria* resistentes a vários antibióticos, também em estudos realizados em vários países têm sido registadas estirpes de origem alimentar resistentes, incluindo de *L.monocytogenes* (Slade e Collins-Thompson *et al*, 1990; Facinelli *et al*, 1991; Barbuti *et al*, 1992; Franco *et al*, 1994; Charpentier *et al*, 1995; Rota *et al*, 1996). O uso incorrecto de agentes antimicrobianos em produção animal pode estar a contribuir também em bactérias deste género para o desenvolvimento de resistências a antibióticos (Franco *et al*, 1994; Rota *et al*, 1996). Consequentemente, a presença de estirpes resistentes de *Listeria*, incluindo *L.monocytogenes*, em alimentos será um problema grave de saúde pública e sugere a necessidade de uso mais prudente de antibióticos em medicina veterinária (Rota *et al*, 1996).

Os agentes etiológicos de doenças infecciosas podem adquirir resistência a um ou mais dos agentes antimicrobianos, para os quais são normalmente susceptíveis, podendo

os genes que codificam para a resistência a antibióticos ser transferidos através de plasmídeos de outras bactérias (Rota *et al*, 1996). Vários estudos descreveram *L.monocytogenes* multiresistentes em que a resistência aos antibióticos era mediada por plasmídeos (Poyart-Salmeron *et al*, 1990; Hadorn *et al*, 1993). Além disso, várias evidências sugerem que a origem dessas resistências em *L.monocytogenes* esteja em *Enterococcus* e *Streptococcus*: os plasmídeos que possuem os genes de resistência são mais instáveis em *Listeria* do que nesses dois géneros; a transferência dos plasmídeos por conjugação é eficaz entre estirpes de *Listeria*, mas foi obtida com maior frequência entre esses dois géneros; os plasmídeos detectados em *Listeria* são similares a outros já detectados nesses dois géneros; os genes que conferem resistência identificados são também similares aos frequentemente detectados nesses dois géneros (Poyart-Salmeron *et al*, 1990; Hadorn *et al*, 1993).

Vários estudos mostram que cada vez mais estirpes de *Listeria*, isoladas de humanos e de alimentos, estão a tornar-se resistentes a antibióticos através da aquisição de genes de resistência conhecidos em bactérias Gram positivo (Charpentier *et al*, 1995; Roberts *et al*, 1996). Por exemplo, a presença frequente em espécies de *Listeria* de genes que conferem resistência à tetraciclina (*tet M, tet S, tet L, tet K*), também comuns em *Enterococcus* e *Streptococcus*, confirmam a noção de fácil transferência genética de genes de resistência entre esses dois géneros de cocos Gram positivo e *Listeria* e, também, entre as espécies de *Listeria*, sob condições naturais (Poyart-Salmeron *et al*, 1992; Facinelli *et al*, 1993; Charpentier *et al*, 1994; Charpentier *et al*, 1995). Também Roberts *et al* (1996) detectaram a presença de um gene que confere resistência à eritromicina (*erm C*) em estirpes de *Listeria* (uma *L.monocytogenes* e uma *L.innocua*) isoladas de alimentos, já descrito noutras bactérias Gram positivo. Adicionalmente, *L.monocytogenes* ainda poderá vir a adquirir resistência a agentes antimicrobianos (ex. amoxicilina e gentamicina), através de plasmídeos ou transposões, já descritos em *Enterococcus* e que levantarão problemas na terapêutica da listeriose (Charpentier e Courvalin, 1999). De facto, a possibilidade de transferência por conjugação de plasmídeos e transposões que possuem genes de resistência de *Enterococcus* e *Streptococcus* para *Listeria* está bem documentada *in vitro* (Doucet-Populaire *et al*, 1991; Charpentier *et al*, 1994; Biavasco *et al*, 1996) e *in vivo* (Doucet-Populaire *et al*, 1991).

Assim, tem sido proposto que *Enterococcus* e *Streptococcus* constituem um reservatório de genes de resistência para *Listeria* spp. e que muito provavelmente a resistência é adquirida *in vivo*, no tracto tracto gastrointestinal de humanos e animais (Poyart-Salmeron, 1990; Quentin *et al*, 1990; Slade e Collins-Thompson, 1990; Hadorn *et al*, 1993; Charpentier e Courvalin, 1999). O tracto intestinal representa o ecossistema mais favorável para a troca directa de informação genética entre esses géneros, pois

L.monocytogenes é frequentemente encontrada nesse local, onde diversas espécies de *Enterococcus* e *Streptococcus*, possuidoras de plasmídeos e transposões, também estão presentes em número elevado (Doucet-Populaire *et al*, 1991; Charpentier e Courvalin, 1999). No estudo de Doucet-Populaire *et al* (1991) foi obtida a transferência de um transposão conjugativo que codifica resistência a vários antibióticos de *E.faecalis* para *L.monocytogenes in vitro* e também *in vivo* no tracto gastrointestinal de ratos.

Por outro lado, os determinantes de resistência podem ser difundidos para *L.monocytogenes*, não só de *Enterococcus* resistentes, mas também através de *Listeria* spp. não patogénicas, consideradas também possíveis reservatórios de genes de resistência para *L.monocytogenes* (Facinelli et al, 1993; Biavasco et al, 1996). Uma vez que a emergência de multiresistência em *Listeria* spp. é fundamentalmente devido à aquisição de plasmídeos, a transferência de resistência para outras estirpes de *L.monocytogenes* também é provável (Poyart-Salmeron *et al*, 1990).

Assim, a presença de plasmídeos que codificam resistência a agentes antimicrobianos e a facilidade com que esses plasmídeos, de vários dadores Gram positivo, são transferidos para *Listeria* pode indicar a disseminação potencial de estirpes de *L.monocytogenes* multiresistentes (Tsakris *et al*, 1997). No entanto, a relativa instabilidade dos determinantes de resistência em *Listeria* pode explicar, parcialmente, a detecção pouco frequente de *L.monocytogenes* resistentes em amostras humanas (Tsakris *et al*, 1997). Apesar de ser sugerido que a resistência pode ser adquirida *in vivo*, as estirpes multiresistentes também podem já estar presentes nos alimentos e as infecções humanas causadas por estirpes resistentes de *L.monocytogenes* serem adquiridas a partir dessa fonte (Facinelli *et al*, 1991).

Apesar da transferência de resistência aos antibióticos para *Listeria* através de plasmídeos ser uma possibilidade, alguns autores verificaram ausência de plasmídeos em alguns isolados resistentes deste género (Slade e Collins-Thompson, 1990; Facinelli *et al*, 1991; Barbuti *et al*, 1992). Nestes casos a resistência parece ser mediada cromossomicamente (Slade e Collins-Thompson, 1990).

A emergência de *L.monocytogenes* multiresistentes está assim documentada em vários trabalhos, logo a presunção de que *L.monocytogenes* é susceptível a todos os antibióticos usados contra bactérias Gram positivo deve ser reavaliada, tal como o risco de infecção de origem alimentar por estirpes multiresistentes (Poyart-Salmeron *et al*, 1990; Quentin *et al*, 1990; Barbuti *et al*, 1992; Rota *et al*, 1996; Charpentier e Courvalin, 1999). Uma vez que o tracto intestinal representa a porta de entrada de estirpes de *Listeria*, as infecções humanas causadas por estirpes resistentes de *L.monocytogenes* de origem alimentar são previsíveis (Charpentier *et al*, 1995).

2.4) Prevenção e controlo da emergência de bactérias zoonóticas resistentes

Sendo reconhecido que a resistência aos agentes antimicrobianos é um problema global de segurança alimentar é necessário assegurar o uso apropriado de antibióticos na produção animal, ou seja, estabelecer uma **política veterinária de uso de antibióticos** (Pedersen *et al*, 1999). Os objectivos desta política consistem em proteger a saúde de animais, pessoas e o ambiente, ou seja, preservar a eficácia do tratamento de doenças infecciosas e reduzir os riscos de transferência de resistências para os humanos devido ao uso de antibióticos na produção animal (Pedersen *et al*, 1999). Para limitar a emergência e difusão da resistência aos antimicrobianos em bactérias patogénicas e evitar os consequentes problemas em relação ao tratamento de infecções nos animais e humanos são necessárias acções a vários níveis (Aarestrup, 1999; Angulo *et al*, 2000).

Em primeiro lugar deve ser promovido o **uso prudente de antibióticos no local de produção**, de modo que o sector da produção animal assegure que os animais sejam saudáveis e não um reservatório de bactérias resistentes aos antimicrobianos (WHO, 1997). Para reduzir os riscos de selecção e disseminação de resistência a antimicrobianos, e assim proteger a saúde pública, os antibióticos devem ser usados com prudência, isto é, prescritos apenas quando são necessários, não nos animais saudáveis. Para ser assegurado o uso prudente de agentes antimicrobianos em animais de consumo, devem estar definidas as necessidades de tratamento, as doses e os regimes terapêuticos (Angulo *et al*, 2000).

Assim, os agentes antimicrobianos não devem ser usados como substitutos de adequada higiene na produção animal e para mascarar os efeitos dos sistemas de produção que predispõem os animais para doenças, ou seja, o uso de antibióticos, se necessário, deve fazer parte do programa de boas práticas de produção (WHO, 1997; Pedersen *et al*, 1999; Van den Bogaard e Stobberingh, 1999; Wegener, 1999; Shryock, 1999; Tollefson e Miller, 2000; WHO, 2000b). Os sistemas de produção devem ser melhorados, de modo a fornecer condições que promovam a saúde e o bem-estar desses animais e a reduzir a necessidade de uso de antibióticos em animais de consumo (WHO, 1997; Pedersen *et al*, 1999; Van den Bogaard e Stobberingh, 1999; Wegener, 1999; Tollefson e Miller, 2000; WHO, 2000b).

A quantidade de antibióticos usada no tratamento e prevenção de doenças pode ser reduzida através de melhoria do sistema de produção animal (alimentação segura, condições sanitárias, utilização do espaço, controlo do ambiente), erradicação de doenças infecciosas ou vacinação e uso de probioticos (Van den Bogaard e Stobberingh, 1999; Tollefson e Miller, 2000; Angulo *et al*, 2000). Assim, devem ser implementadas estratégias para o controlo da difusão dos patogénicos no local de produção ou seja, controlo de infecção sem antimicrobianos (Angulo *et al*, 2000).

Além disso, abolindo o uso por rotina de antimicrobianos promotores de crescimento em rações poderá reduzir-se muito a quantidade de antimicrobianos usados em animais, devendo ser encorajado o desenvolvimento de métodos não antimicrobianos alternativos, como os pre e probioticos, que permitam obter os mesmos efeitos no crescimento dos animais (Van den Bogaard e Stobberingh, 1999; Angulo *et al*, 2000). Os benefícios económicos do uso subterapêutico de antimicrobianos devem ser pesados contra o custo da resistência que essas substâncias promovem em patogénicos transmitidos por alimentos em animais e humanos (Angulo *et al*, 2000).

Segundo Dixon (2000), já há 35 anos atrás, um dos pioneiros do estudo da resistência aos antibióticos argumentava que se os criadores melhorassem as condições da produção de animais era possível deixar de utilizar agentes antimicrobianos com funções duplas de profilaxia e promoção do crescimento. Mais recentemente, por exemplo, na Dinamarca e na Suécia, o factor crítico para a remoção dos promotores de crescimento, mantendo uma produção lucrativa, foi a aplicação de boas práticas de criação de animais, não ocorrendo um aumento no uso de antibióticos para terapêutica ou profilaxia durante ou após essa abolição (Van den Bogaard e Stobberingh, 1999; Dixon, 2000). Também, uma prevenção das doenças mais efectiva nos locais de produção é sugerida para reduzir a disseminação de *S.*Typhimurium DT104 multiresistente e para abrandar a evolução de resistência a outros antimicrobianos nesta e noutras estirpes de *Salmonella* (Glynn *et al*, 1998).

No entanto, a criação de leis e regulamentos, isto é, **legislação sobre o uso de antibióticos em veterinária**, é o principal instrumento para limitar o uso de agentes antimicrobianos nos animais de consumo (WHO, 1997). É fundamental existir legislação restritiva que regule o uso de antibióticos na produção animal (Pedersen *et al*, 1999). O licenciamento de substâncias para uso veterinário deve considerar o impacto na saúde humana da resistência a antimicrobianos desenvolvida nos animais em que os agentes sejam usados (WHO, 2000b). As políticas do uso de agentes antimicrobianos nos animais devem pesar os possíveis benefícios para a produção animal contra os riscos médicos e as consequências para a saúde pública que derivam do seu uso (WHO, 1997).

As políticas sobre o uso de antibióticos devem ser mundiais, pois a ocorrência de bactérias resistentes é um problema que atinge todos os países, em virtude da globalização do comércio de alimentos e animais. Assim, é necessário uma harmonização internacional da legislação, relativamente a antibióticos usados em terapêutica ou usados na promoção do crescimento, para ser possível prevenir o desenvolvimento de resistências (Aarestrup, 1999; Pedersen *et al*, 1999; Tollefson e Miller, 2000).

Ao longo de vários anos, várias autoridades de saúde pública apelaram a uma reavaliação do uso de antibióticos na produção animal, começando por sugerir eliminar ou

pelo menos reduzir substancialmente o uso subterapêutico de antibióticos para promoção de crescimento (Levy, 1998; Aarestrup, 1999; Dixon, 2000; Mlot, 2000; Tollefson e Miller, 2000). Por exemplo, já em 1969, um grupo formado no Reino Unido, "Swann Commitee", recomendou que os antibióticos usados nos animais fossem divididos em dois grupos, uso terapêutico e uso como aditivos de rações; além de sugerir que os promotores de crescimento não deviam incluir antimicrobianos usados na terapêutica humana e animal e que estes últimos só deviam estar disponíveis se fossem prescritos por veterinários (Aarestrup, 1999; Van den Bogaard e Stobberingh, 1999; Tollefson e Miller, 2000). Em 1997, a OMS, para minimizar a emergência de resistência a antibióticos em animais de produção, recomendou a abolição de antimicrobianos promotores de crescimento que sejam usados em medicina humana ou que seleccionem resistência cruzada a agentes usados em terapêutica humana (WHO, 1997).

Na Europa, as restrições ao uso de antibióticos para promoção de crescimento começaram a ser legisladas nos anos 70 (Levy, 1998), e em alguns países europeus, políticas específicas com o objectivo de limitar o uso de antibióticos em animais são exemplos para o resto do mundo (Dixon, 2000). Na Suécia desde 1986 que foi banida a utilização de antibióticos como aditivos alimentares estimulantes do crescimento, tal como posteriormente na Finlândia e Dinamarca, em resposta ao aumento da preocupação sobre a proliferação de bactérias insensíveis aos antibióticos e à sua difusão de animais de consumo para humanos (Parecer 98/C407/02; Dixon, 2000). A Comunidade Europeia, em acordo com o proposto pela OMS em 1997, recomenda a diminuição gradual do uso de antibióticos como promotores de crescimento, de modo que no domínio animal a utilização de antibióticos seja limitada à medicina veterinária (Parecer 98/C407/02). Assim, foram sendo retirados vários estimulantes de crescimento (ex. avoparcina, espiramicina, tilosina, virginiamicina e bacitracina zinco) para os quais se demonstrou desenvolvimento de resistência cruzada a substâncias similares usadas em medicina humana (Parecer 98/C407/02; Tollefson e Miller, 2000; Regulamento nº 2821/1998/CE). Em contraste, em alguns países como os USA, ainda são permitidos antimicrobianos promotores de crescimento usados também para tratamento de infecções em humanos, como tetraciclinas e penicilinas (Van den Bogaard e Stobberingh, 1999; Mlot, 2000).

No entanto, actualmente o uso de promotores de crescimento é apenas parte do problema, pois o uso terapêutico de antibióticos nos animais também tem contribuído para a selecção de estirpes resistentes em animais, nomeadamente a agentes importantes na terapêutica humana como são as fluoroquinolonas (Levy, 1998; Tollefson e Miller, 2000). Assim, a OMS em 1998 considerou que devia ser prestada mais atenção aos riscos associados com o largo uso de fluoroquinolonas como medicamentos para animais (Parecer 98/C407/02; Tollefson e Miller, 2000), de modo que é recomendado que o uso destes

agentes antimicrobianos em animais seja limitado devido às consequências potenciais para os humanos (Levy, 1998; Wegener, 1999). Uma vez que as bactérias patogénicas resistentes a antibióticos podem ser transferidas dos animais através dos alimentos, considera-se que os agentes antimicrobianos usados em humanos não devem ser usados em animais, incluindo os que podem causar resistência cruzada (Piddock, 1996).

A implementação de uma política restritiva de uso de antibióticos em veterinária poderá evitar o desenvolvimento e difusão de bactérias resistentes nos animais e nos produtos alimentares de origem animal (Pedersen *et al*, 1999). Vários estudos demonstram que a prevalência de bactérias resistentes aos antimicrobianos pode ser reduzida se a pressão selectiva for diminuída, como resultado da redução do uso de antimicrobianos (Pedersen *et al*, 1999). Por exemplo, na Holanda, foi detectada uma diminuição de isolados humanos e animais de *Salmonella* resistentes a tetraciclina após a abolição do uso deste antimicrobiano nas rações para promoção do crescimento ocorrida em 1974 (Aarestrup, 1999; Pedersen *et al*, 1999). Mais recentemente, na Dinamarca, uma diminuição de resistência a avoparcina e vancomicina em *Enterococcus* isolados de animais foi observada após a abolição deste agente em 1995 (Aarestrup, 1999; Pedersen *et al*, 1999).

É também necessário estabelecer programas multinacionais de vigilância para **monitorizar a ocorrência de bactérias resistentes a antimicrobianos**, incluindo bactérias patogénicas para os animais, agentes de zoonoses (ex. *Salmonella*) e bactérias indicadoras de resistência (ex. *E.coli* e *E.faecium*), isoladas em animais de consumo, alimentos e humanos (WHO, 1997; Parecer 98/C407/02; Pedersen *et al*, 1999; Shryock, 1999; WHO, 2000b). Em 1996, várias entidades americanas, estabeleceram um programa de monitorização de resistências (*National Antimicrobial Monitoring System*) para avaliar alterações de susceptibilidade a antimicrobianos de microrganismos patogénicos zoonóticos, de amostras clínicas de humanos e animais, de animais de produção saudáveis, e de carcaças de animais no matadouro (Tollefson, 1996; Tollefson *et al*, 1998). Na Europa, alguns países também lançaram iniciativas de criação e reforço dos sistemas de vigilância relativamente à resistência aos antimicrobianos, mas ainda não de um modo sistemático, nomeadamente em isolados de alimentos e animais (Parecer 98/C407/02). Para vigilância da resistência a antimicrobianos na Europa, a Comissão Europeia fundou em 1999 um organismo central a nível europeu (*European Antimicrobial Resistance Surveillance System*) e a *Enter-Net* que monitoriza especificamente a resistência em *Salmonella* (Bronzwaer *et al*, 2001).

Segundo a OMS, devem ser monitorizados antimicrobianos usados na terapêutica humana e/ou suspeitos de poderem seleccionar resistência cruzada a antimicrobianos usados em medicina humana. Devem também ser incluídos nestes programas de vigilância

antimicrobianos usados na terapêutica veterinária e como promotores de crescimento (WHO, 1997).

Adicionalmente, as autoridades devem estabelecer sistemas para **monitorizar o consumo de antimicrobianos nos animais**, incluindo o consumo dos diferentes grupos de antibióticos para cada espécie animal (Parecer 98/C407/02; Aarestrup, 1999; Pedersen *et al*, 1999; WHO, 2000b).

Actualmente, a informação sobre o consumo de agentes antimicrobianos em diferentes países e em diferentes espécies animais é muito limitada, de modo que não é possível quantificar a ligação entre consumo e ocorrência de resistência (Aarestrup, 1999; Shryock, 1999). Para ser possível estabelecer uma relação causa-efeito entre o uso de antibióticos em animais de consumo e falhas na terapêutica de doenças em humanos, é fundamental implementar um programa multinacional para monitorizar o consumo de antibióticos nos animais e a resistência em bactérias associadas com esses animais (Shryock, 1999). Assim, a Comunidade Europeia está a criar um sistema continuo de vigilância para monitorizar o consumo de agentes antimicrobianos (Bronzwaer *et al*, 2001).

São necessários **estudos epidemiológicos** para analisar as consequências para a saúde humana e animal do uso de antibióticos, de modo a poderem ser estabelecidas mediadas correctivas (Pedersen *et al*, 1999). O estabelecimento de programas para monitorização do consumo de agentes antimicrobianos e da ocorrência de resistências em reservatórios humanos e animais foi encorajado pela OMS em 1997 (WHO, 1997).

É necessário fomentar a **investigação** sobre o impacto para a saúde pública do uso de agentes antimicrobianos em medicina veterinária para ser possível limitar a emergência e difusão de resistência (Parecer 1998; Aarestrup, 1999; WHO, 2000b). No entanto, uma verdadeira avaliação do grau de contribuição do uso de antibióticos em animais para os problemas de resistência em humanos só pode ser facilitada estabelecendo uma relação entre: dados quantitativos do consumo de antibióticos, estudos de susceptibilidade *in vitro*, experiências em animais *in vivo* e estudos epidemiológicos (Shryock, 1999).

Devem também ser implementadas estratégias de **educação** dando ênfase à importância e benefícios do uso prudente de antimicrobianos nos animais (WHO, 2000b). É necessário implementar recomendações para o uso prudente de antibióticos pelos veterinários, de modo a ser contido o desenvolvimento e difusão de bactérias resistentes associadas com os animais de consumo (Shryock, 1999). A educação dos consumidores e pessoal da saúde também poderá reduzir o uso inadequado de antimicrobianos nos humanos (Levy, 1998). O princípio fundamental do uso de antibióticos para qualquer fim deve ser a protecção das bactérias comensais susceptíveis do nosso ambiente, pois elas são nossas aliadas na reversão da crise da multiresistência (Levy, 1998).

II) Objectivos

A salmonelose e a listeriose de origem alimentar continuam a ser um problema importante de saúde pública, sendo os produtos avícolas veículos frequentes de transmissão de *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*. Adicionalmente, tem sido verificada a emergência de resistência a agentes antimicrobianos em estirpes de *Salmonella* e de *Listeria* isoladas em alimentos, nomeadamente de produtos de origem animal. Assim, foram objectivos do presente trabalho:

- Estudar a incidência de *Salmonella* e *L.monocytogenes* em aves de produção nacional disponíveis para o consumidor;

- Validar a aplicação de um método rápido (PCR multiplex) para identificação de *L.monocytogenes* e outras espécies de *Listeria* e comparar com o método convencional de identificação bioquímica;

- Estudar a susceptibilidade dos isolados de *Salmonella* spp. e *Listeria* spp. a agentes antimicrobianos usados em terapêutica humana e/ou animal;

- Estudar mecanismos de resistência aos antibióticos β-lactâmicos, nomeadamente verificar se esta resistência está associada a elementos genéticos móveis e a possibilidade da sua transferência por conjugação.

FACULDADE DE FARMÁCIA DO PORTO BIBLIOTECA

III) Material e métodos

1) Amostragem

Para este trabalho foram utilizadas amostras de aves (frango e peru), cruas, provenientes de um estabelecimento de restauração colectiva e de dois talhos da cidade do Porto, colhidas durante o ano de 1999. A maioria das amostras estavam rotuladas com o nome do local de produção (aviário), mas não foi possível recolher informação completa sobre a origem de todas as amostras, sabendo-se, no entanto, que correspondiam a animais de produção nacional do tipo intensivo.

Todas as amostras estavam refrigeradas no momento da colheita, sendo a maioria colhida pouco tempo após a sua chegada ao local de comercialização e as restantes após períodos de tempo variáveis, mas no máximo de 3 dias.

As amostras foram colhidas assepticamente utilizando utensílios esterilizados e colocadas em recipientes de plástico individuais esterilizados, transportadas para o laboratório e analisadas imediatamente. Cada amostra de frango era constituída por porções de pele e gordura de várias carcaças do mesmo lote, sendo nos perus por porções de carne, gordura e pele. A colheita das amostras foi executada de modo a não diminuir o grau de qualidade e o aspecto das aves, retirando-se na maioria porções da cavidade abdominal e do pescoço do animal.

2) Isolamento e identificação

2.1) *Salmonella* spp.

A metodologia utilizada para o isolamento de *Salmonella* foi a descrita na Norma ISO 6579 (1993). Inicialmente 25 g de cada amostra foram pesadas e adicionadas assepticamente a 225 ml do meio de pré-enriquecimento *Buffered Peptone Water* (Oxoid) e incubadas 18h a 37° C. Da cultura de pré-enriquecimento foram transferidos 0,1 ml para *Rappaport-Vassiliadis Enrichment Broth* (Oxoid) e 1 ml para *Selenite Broth* (Difco), sendo a incubação realizada a 42 e 37° C, respectivamente, durante 24 e 48h. Após cada incubação os meios de enriquecimento foram semeados em dois meios de isolamento selectivos, *SS Agar* (Oxoid) e *XLD Agar* (Difco), e incubados a 37 °C durante 24 a 48h. As culturas eram analisadas para a presença de colónias típicas de *Salmonella* (colónias transparentes com centros negros no *SS Agar* e colónias vermelhas com centros negros no *XLD Agar*) e várias (5) eram seleccionadas de cada placa e confirmadas por provas bioquímicas: fermentação da glicose, lactose e sacarose e produção de sulfureto de hidrogénio (reacções em meio *Triple Sugar Iron Agar*), produção de urease, desaminação da fenilalanina, descarboxilação da lisina, utilização do citrato, reacção ao vermelho de metilo e produção de indol.

Um isolado por amostra com um perfil bioquímico de *Salmonella* foi confirmado pelo sistema de identificação API 32GN (bioMérieux) e sujeito a provas de aglutinação com soro polivalente anti-*Salmonella* (Difco *Salmonella* O Antiserum Poly A-I and Vi) e vários soros específicos para o antigénio O (Difco). Todos os isolados foram enviados ao Centro Nacional de *Salmonella* (Instituto Nacional de Saúde) para serotipagem de acordo com o esquema de Kauffmann-White.

As estirpes foram mantidas em rampas de *Plate Count Agar* (Oxoid) a 4 °C e alíquotas conservadas em *Tryptone Soya Broth* (Oxoid) com 15% de glicerol a -70 °C. Estirpes de *Salmonella* da colecção do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da UP foram utilizadas como microrganismos de controlo.

2.2) *Listeria* spp. e *L.monocytogenes*

A metodologia utilizada para o isolamento de *Listeria* foi a descrita na Norma ISO 11290-1 (1996). Inicialmente 10 a 25 g de cada amostra foram assepticamente adicionados a 9 volumes de *Half Fraser Broth* (Oxoid) (meio de enriquecimento primário com concentração reduzida de agentes selectivos) e incubados a 30° C durante 24h. Após incubação, 0,1 ml da cultura foi transferido para um tubo com 10 ml de *Fraser Broth* (Oxoid)

(meio de enriquecimento secundário com concentração completa de agentes selectivos) e incubado durante 48h a 37° C. A partir das culturas de enriquecimento primárias e secundárias foram semeadas placas de *Oxford Agar* (Oxoid) e *Palcam Agar* (Sanofi-Pasteur). As placas foram incubadas a 37° C durante 24 a 48h e depois examinadas para a presença de colónias típicas de *Listeria* spp.: em *Oxford Agar* após 48h de incubação colónias com cerca de 2 mm de diâmetro, halos negros e centros cavados e nas placas de *Palcam Agar* colónias esverdeadas com cerca de 1,5 a 2 mm de diâmetro, com uma depressão central e também rodeadas de halos negros indicativos da hidrólise da esculina.

2.2.1) Identificação por métodos convencionais

As colónias escolhidas de cada placa de meio selectivo foram estudadas por provas bioquímicas: coloração Gram, reacção da catalase, fermentação da ramnose (0,5%), xilose (0,5%) e manitol (1%) em *Purple Broth Base* (Difco) e hemólise em gelose sangue (carneiro ou cavalo). As colónias compostas por bacilos Gram positivo curtos, catalase positiva, produzindo ácido por fermentação da ramnose, mas não da xilose e manitol e β-hemolíticas foram consideradas suspeitas de *L.monocytogenes*. Um isolado por amostra com um perfil bioquímico de *L.monocytogenes* foi confirmado com o sistema API *Listeria* (bioMérieux). Quando não havia suspeita de *L.monocytogenes* foram identificadas pelo mesmo sistema outros isolados de *Listeria*, de modo a que cada amostra analisada tivesse pelo menos uma espécie identificada.

Os isolados foram mantidos a 4° C em rampas de *Tryptone Soya Agar* (Oxoid) com 0,6% de Extracto de Levedura (Difco) e alíquotas conservadas em *Tryptone Soya Broth* (Oxoid) com 15% de glicerol a -70 °C. Estirpes de *L.monocytogenes* e de outras espécies de *Listeria* do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da UP foram utilizadas como microrganismos de controlo.

2.2.2) Identificação por PCR

Adicionalmente à utilização do método convencional para identificação bioquímica, as estirpes de *Listeria* foram sujeitas a caracterização genotípica por um método de PCR (*polymerase chain reaction*). Este método permite detectar sequências nucleotídicas específicas, apreciáveis pela sua amplificação por PCR.

Assim, utilizou-se um PCR multiplex com 5 *primers* diferentes, específicos do gene *iap* (*invasion-associated protein*), que permite a detecção e diferenciação de espécies de *Listeria*, de acordo com Bubert *et al* (1999). O gene *iap* comum a todos os membros do

género *Listeria* foi utilizado como alvo, pois possui zonas conservadas nas extremidades 5' e 3', enquanto as porções internas são específicas de cada uma das espécies (Bubert *et al*, 1992a; Bubert *et al*, 1992b). Adicionalmente, o facto de todos os produtos de PCR específicos poderem ser facilmente distinguidos por comparação de tamanho em gel de agarose, permitiu o desenvolvimento de um PCR multiplex constituído por 4 *primers* dirigidos a espécies (MonoA, Ino2, Siwi2 e Mugra1) e um *primer* da região conservada comum a todas as espécies (Lis1B) (Bubert *et al*, 1999) (Figura 2).

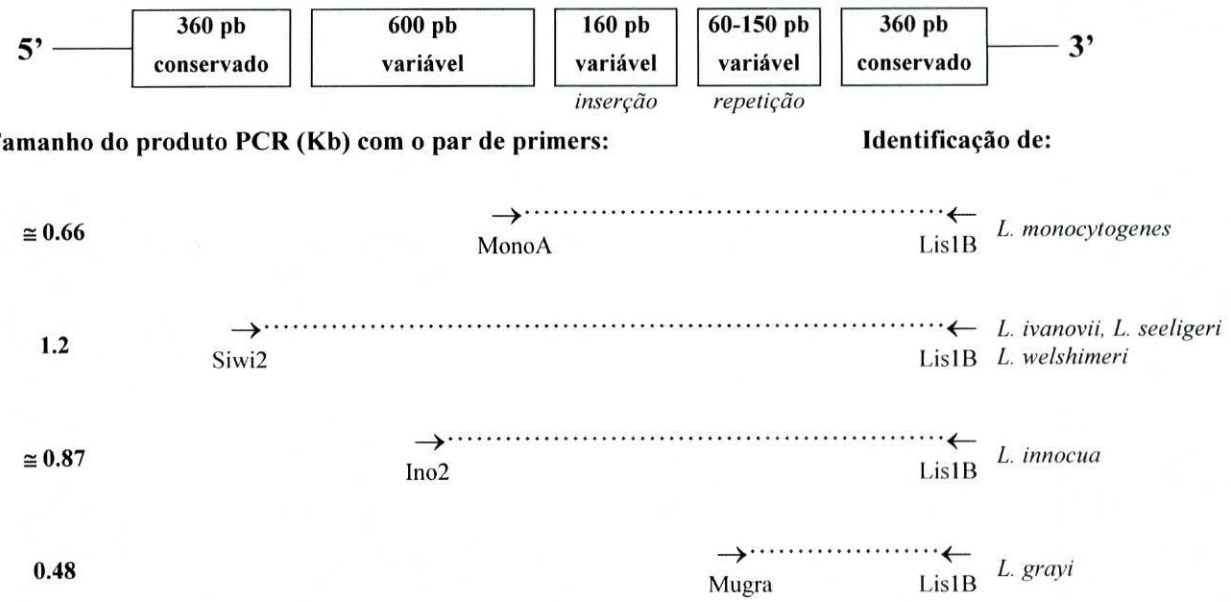


Figura 2: Regiões nos genes *iap* de ligação dos *primers* seleccionados para identificação por PCR de *Listeria* spp.. Adaptado de Bubert *et al* (1999).
A terceira porção do gene, zona de inserção, não está presente no gene *iap* de *L.monocytogenes* e de *L.innocua*. A zona variável do gene *iap* em *L.monocytogenes* inclui uma parte repetitiva.

Os *primers* Lis1B, MonoA, Ino2, Siwi2 e Mugra1, tal como descritos por Bubert *et al* (1999), foram sintetizados por Sigma Genosys. As 3 espécies que não se diferenciam por este PCR apresentam uma grande homologia nas porções centrais do gene *iap* (Bubert *et al*, 1992a). No caso de *L.monocytogenes*, o produto de PCR gerado pelos *primers* inclui a zona repetitiva do gene, cujo número de repetições varia com o serótipo, de modo que o tamanho dos fragmentos pode variar ligeiramente (Bubert *et al*, 1992a).

Preparação do DNA bacteriano

As reacções de PCR foram executadas com modificações ao método proposto por Bubert *et al* (1999) relativamente à obtenção do DNA cromossómico das bactérias usadas para amplificação, de modo a simplificar a fase inicial da lise bacteriana. Todas as estirpes em estudo foram semeadas em placas de *Tryptone Soya Agar* (Oxoid) com 0,6% de Extracto de Levedura (Difco) e incubadas a 37 ºC durante 24 a 48h. Foram utilizados dois métodos para lisar as bactérias, de modo a obter DNA cromossómico para efectuar a técnica de PCR.

Método 1: as amplificações foram feitas directamente a partir de suspensões bacterianas, com turvação ajustada a 0,5 McFarland, em que 1 ou 2 μl dessas suspensões *standard* foram transferidas directamente para a mistura reaccional, procedendo-se a uma fase inicial de lise a 96 ºC durante 10 min.

Método 2: os lisados bacterianos foram preparados suspendendo as células bacterianas em 100 μl de Tween 20 a 0,05% (Sigma) e aquecendo no termociclador a 99 ºC durante 10 min; após centrifugação a 5000 rpm durante 3 min, 1 μl do sobrenadante, contendo o DNA de cada amostra, foi sujeito à reacção de PCR.

Reacção de amplificação

Durante a fase de optimização da técnica foram feitos ajustes na concentração de cloreto de magnésio (passou de 1,5 mM para 2 mM) e ensaios com *Taq* DNA polimerase de marcas diferentes, nomeadamente Sigma e Promega.

Para a realização das reacções de amplificação foi utilizada uma mistura reaccional de 50 μl de volume total que continha: tampão de PCR 1x, 2mM de cloreto de magnésio, Mix dNTP (200 μM de cada), 5 *primers* (100 ηg de cada), 1,5U de *Taq* DNA polimerase e água ultra pura estéril. A amplificação foi efectuada num termociclador (Perkin Elmer, Gene Amp PCR System 2400), efectuando o perfil de temperaturas descrito por Bubert *et al* (1999): desnaturação a 95 ºC durante 15 s, *annealing* a 58 ºC durante 30 s, e extensão a 72 ºC durante 50 s, utilizando-se 30 ciclos.

Os produtos das reacções de PCR foram separados por electroforese em geles de agarose a 1,2% em tampão TAE (Tris-base 40 mM, EDTA 1 mM, ácido acético glacial, pH 8) a 60V durante cerca de 2 h. Os geles foram corados com brometo de etídio (0,5 μg/ml) e o tamanho dos fragmentos de DNA foi calculado com o programa de *software* Kodak Digital Science 1D, por comparação da sua mobilidade com o marcador de peso molecular utilizado.

3) Ensaios de susceptibilidade a agentes antimicrobianos

3.1) Método de difusão em agar com discos

Os perfis de susceptibilidade das estirpes identificadas de *Salmonella* e *Listeria* foram determinados pelo método de difusão em agar com discos, utilizando o meio *Mueller-Hinton Agar 2* (bioMérieux) após incubação das placas a 37 ºC durante 18 a 24h, de acordo com os procedimentos publicados pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 1997). O diâmetro da zona de inibição de crescimento foi registado, de modo a classificar as estirpes ensaiadas nas categorias sensível, intermédia ou resistente, de acordo com o proposto nas tabelas do NCCLS (1999) para *Salmonella* e do NCCLS (1990) para *L.monocytogenes* e outras espécies de *Listeria*.

Os agentes antimicrobianos avaliados e a correspondente concentração foram os seguintes: penicilina (10U), amoxicilina (10μg), amoxicilina/ácido clavulânico (20/10μg), carbenicilina (100μg), piperacilina (100μg), cefalotina (30μg), cefotaxima (30μg), ceftazidima (30μg), estreptomicina (10μg), gentamicina (10μg), canamicina (30μg), tobramicina (10μg), netilmicina (30μg), ácido nalidíxico (30μg), ciprofloxacina (5μg), ofloxacina (5μg), cloranfenicol (30μg), tetraciclina (30μg), minociclina (30μg), trimetoprim/sulfametoxazol (1,25/23,75μg), clindamicina (2μg), eritromicina (15μg), vancomicina (30μg) e rifampicina (5μg).

3.2) Método de difusão em agar com tiras (Etest)

Adicionalmente, para se determinar a concentração mínima inibitória (CMI) em algumas estirpes foi utilizado o método de difusão em agar com tiras, designado por Etest (AB Biodisk), para a amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, piperacilina, cefalotina, ceftazidima, tetraciclina, trimetoprim/sulfametoxazol, enrofloxacina e clindamicina. A técnica foi executada de acordo com as instruções do fabricante usando *Mueller-Hinton Agar 2* (bioMérieux) e uma incubação a 37 ºC durante 18 a 24h. Os limites para a interpretação da resistência e susceptibilidade foram os propostos pelo NCCLS (1999) para *Salmonella* e do NCCLS (1990) para *L.monocytogenes* e outras espécies de *Listeria*, excepto para a enrofloxacina que foi de acordo com outra publicação (Malorny *et al*, 1999). A estirpe *Escherichia coli* ATCC 25 922 foi utilizada como padrão nos ensaios de susceptibilidade.

4) Estudo de mecanismos de resistência aos antibióticos β-lactâmicos

4.1) Determinação do ponto isoeléctrico das β-lactamases

No presente estudo foi utilizado o método de Matthew *et al* (1975) modificado para caracterizar o ponto isoleléctrico (pI) das β-lactamases responsáveis pela resistência aos antibióticos β-lactâmicos.

As estirpes foram semeadas em *Tryptone Soya Broth* (Oxoid) a 37 ºC durante 18h. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas a 3000 rpm, durante 10 min, a 4 ºC, sendo os sedimentos obtidos lavados com soro fisiológico, novamente centrifugados nas mesmas condições e ressuspensos em 500 μl de água destilada. As suspensões obtidas foram sujeitas a choques térmicos, alternando água quente com congelação a -20 ºC, várias vezes. Por fim, foram centrifugados a 13000 rpm durante 1 min e os sobrenadantes processados para a focagem isoeléctrica em sistema Phast System (Pharmacia), de acordo com as instruções do fabricante, para ser determinado o ponto isoeléctrico das β-lactamases em estudo. Foram utilizados geles comerciais de poliacrilamida com anfolitos de pH 3-9 (Phast Gel, Pharmacia) e a revelação das bandas correspondentes às β-lactamases foi efectuada por adição de solução de nitrocefin (100 μM). Paralelamente utilizou-se um padrão constituído por β-lactamases de pIs conhecidos (5.4, 5.6, 7.0, 7.6 e 8.2).

4.2) Prova da acção sinérgica de dois discos

Nas estirpes resistentes aos antibióticos β-lactâmicos foi utilizado o método de Jarlier *et al* (1988) para verificar a produção de β-lactamases de espectro alargado.

Os fenómenos de sinergismo foram avaliados segundo a técnica de difusão em agar com discos, aplicando na placa de *Mueller-Hinton Agar 2* (bioMérieux) discos da cefalosporina de 3ª geração ceftazidima (30 μg) e de amoxicilina/ácido clavulânico (20/10 μg), dispostos a uma distância (25 mm) que permita avaliar o possível efeito sinérgico. O alargamento do halo de inibição na zona próxima do disco com amoxicilina/ácido clavulânico é indicativo da possível presença de uma β-lactamase de espectro alargado.

4.3) Ensaios de conjugação

Para as estirpes que apresentam um comportamento aos antimicrobianos típico de presença de β-lactamases plasmídicas efectuaram-se ensaios de transferência genética por

conjugação, para avaliar a sua capacidade de transferir determinantes de resistência (associação de resistência a β-lactâmicos com plasmídeos conjugativos). Utilizou-se como estirpe receptora *Escherichia coli* K802N (*hsdR*, *hsdM*, *gal*, *met*, *SupE*, *gyrA*), sensível a amoxicilina, resistente ao ácido nalidíxico e desprovida de plasmídeos.

As estirpes dadoras e receptoras foram semeadas em *Tryptone Soya Broth* (Oxoid) a 37 ºC durante 18h. Posteriormente, transferiu-se cerca de 1 ml destas culturas para 50 ml de *Tryptone Soya Broth* (Oxoid) que foi incubado a 37 ºC, com agitação, durante 3h (até se atingir a fase exponencial de cerca de $5x10^8$ bactérias/ml). Em placas de *Mueller-Hinton Agar 2* (bioMérieux) colocou-se 100 μl da cultura da estirpe dadora sobre 100 μl da cultura da estirpe receptora e incubou-se a 37 ºC durante 24h. Da cultura obtida foi preparada uma suspensão-mãe e várias diluições decimais em soro fisiológico. Os transconjugantes foram seleccionados semeando 100 μl da suspensão-mãe e respectivas diluições à superfície de placas de *Mueller-Hinton Agar 2* (bioMérieux) contendo ácido nalidíxico (100 μg/ml) e ampicilina (50 μg/ml).

Previamente, todas as estirpes utilizadas, dadoras e receptoras, e a estirpe de *E.coli* ATCC foram semeadas em placas de *Mueller-Hinton Agar 2* (bioMérieux) contendo apenas ácido nalidíxico (100 μg/ml) ou ampicilina (50 μg/ml) e contendo os dois antibióticos. Foram também executados antibiogramas nos transconjugantes obtidos, utilizando-se discos de amoxicilina (10μg), amoxicilina/ácido clavulânico (20/10μg), ácido nalidíxico (30μg), carbenicilina (100μg) e piperacilina (100μg) e determinadas as CMI por Etest para a amoxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico e piperacilina.

IV) Resultados

1) Estudo da incidência

1.1) *Salmonella* spp.

No Quadro 1 apresentam-se os resultados da pesquisa de *Salmonella* para as 60 amostras analisadas, de acordo com a proveniência e a natureza do produto.

A pesquisa de *Salmonella* foi positiva em 36 das 60 amostras, o que representa uma incidência de 60%. Dessas 36 amostras, 5 tiveram origem no estabelecimento de restauração colectiva, sendo 3 de peru e 2 de frango, enquanto as restantes 31 foram de frangos obtidos nos dois talhos (15 em cada um) e uma de um peru. Salienta-se que de cada amostra positiva só se procedeu à identificação de uma estirpe de *Salmonella*.

Quadro 1: Incidência de *Salmonella* spp. por origem das amostras

Aves	Nº amostras	Nº amostras positivas (%)
Frango	54	32 (59%)
restauração colectiva	7	2
talhos	47	30
Peru	6	4 (67%)
restauração colectiva	3	3
talhos	3	1
TOTAL	60	36 (60%)

Os 36 isolados pertencem a 10 serótipos diferentes, distribuídos pelos grupos B, C, D e E, como se apresenta no Quadro 2. Os serótipos mais frequentemente isolados foram *S*.Enteritidis (16) e *S*.Hadar (10), constituindo mais de metade do total de isolados e sendo todos obtidos de amostras de frango, com excepção de uma *S*.Hadar. Os outros serótipos foram isolados com menor frequência, sendo de salientar que nas 4 amostras de peru se isolaram 4 serótipos diferentes.

Quadro 2: Serótipos de *Salmonella* por tipo de amostra

		Tipo de amostras	
Serótipo (grupo)	Total (%) n=36	Frango n=32	Peru n=4
*S.*Enteritidis (D)	16 (44%)	16	-
*S.*Hadar (C)	10 (28%)	9	1
*S.*Virchow (C)	3 (8%)	3	-
*S.*Derby (B)	1 (3%)	1	-
*S.*Anatum (E)	1 (3%)	1	-
*S.*Heidelberg (B)	1 (3%)	1	-
*S.*Kingston (D)	1 (3%)	1	-
*S.*Sainpaul (B)	1 (3%)	-	1
*S.*Indiana (B)	1 (3%)	-	1
*S.*Blockley (C)	1 (3%)	-	1

1.2) *Listeria* spp. e *L.monocytogenes*

No Quadro 3 apresentam-se os resultados da pesquisa de *Listeria* e de *L.monocytogenes* para as 63 amostras analisadas, de acordo com a proveniência e a natureza do produto.

A pesquisa de *Listeria* spp. foi positiva em todas as amostras analisadas, sendo isoladas *L.monocytogenes* em 26 amostras (41%). Destas 26 amostras, 6 tiveram origem no estabelecimento de restauração colectiva, sendo 4 de frango e 2 de peru, enquanto as restantes, 19 foram de frangos obtidos nos dois talhos (8 no talho A e 11 no talho B) e uma de um peru (talho B).

Quadro 3: Incidência de *Listeria* spp. e *L.monocytogenes* por origem das amostras

		Nº amostras positivas (%)	
Aves	Nº amostras	*Listeria* spp.	*L.monocytogenes*
Frango	57	57 (100%)	23 (40%)
restauração colectiva	8	8	4
talhos	49	49	19
Peru	6	6 (100%)	3 (50%)
restauração colectiva	3	3	2
talhos	3	3	1
TOTAL	63	63 (100%)	26 (41%)

Adicionalmente, outras espécies, incluindo *L.innocua*, *L.welshimeri* e *L.seeligeri* foram isoladas, sendo o número de isolados de 32, 8 e 1, respectivamente. Em três situações, mais do que uma espécie foi recuperada da mesma amostra, ou seja, pelo menos duas continham simultaneamente *L.monocytogenes* e *L.innocua* e na outra para além dessas duas espécies também se isolou *L.welshimeri*. No entanto, pela metodologia utilizada não se pode excluir a presença de outras associações, isto é, não foram estudadas todas as espécies que poderiam estar presentes na mesma amostra, pois a identificação era terminada logo que se encontrava uma cultura positiva para *L.monocytogenes*.

1.2.1) Comparação dos métodos utilizados para identificação

Após isolamento de *Listeria* spp. a identificação foi efectuada utilizando o sistema API *Listeria* e ensaios PCR. Assim, neste estudo verificou-se que todos os isolados identificados como sendo *L.monocytogenes* no sistema API-*Listeria* foram confirmados por PCR, tal como se verificou para as outras espécies (Quadro 4).

Quadro 4: Comparação entre identificação bioquímica (API-*Listeria*) e ensaio PCR

Nº estirpes	Identificação API	Identificação PCR	API/PCR (%)
26	*L.monocytogenes*	+	26/26 (100%)
32	*L.innocua*	+	32/32 (100%)
8	*L.welshimeri* *	+	8/8 (100%)
1	*L.seeligeri* *	+	1/1 (100%)
67			100%

* esta técnica de PCR identifica o grupo das 3 espécies: *L.seeligeri*, *L.welshimeri* e *L.ivanovii*

Relativamente aos dois métodos utilizados para lisar as bactérias, de modo a obter o DNA cromossómico para efectuar a técnica de PCR, os resultados divergiram. Verificou-se que o método em que a amplificação era efectuada directamente a partir de suspensão bacteriana não foi bem sucedido para todas as estirpes, mesmo quando se procedeu a algumas alterações, nomeadamente na concentração de cloreto de magnésio. Nos ensaios de PCR em que a lise bacteriana era feita na presença de Tween 20 a 99 ºC durante 10 minutos conseguiu-se obter produto PCR para todos os isolados testados, efectuando o ajuste da concentração de cloreto de magnésio relativamente ao proposto por Bubert *et al* (1999).

Na Figura 3 encontra-se representada como exemplo uma das electroforeses referentes a isolados deste estudo. Salienta-se que para os isolados de *L.monocytogenes*

ocorreram algumas diferenças no tamanho dos fragmentos obtidos, mas que nunca foram impeditivas da sua identificação face a outras espécies.

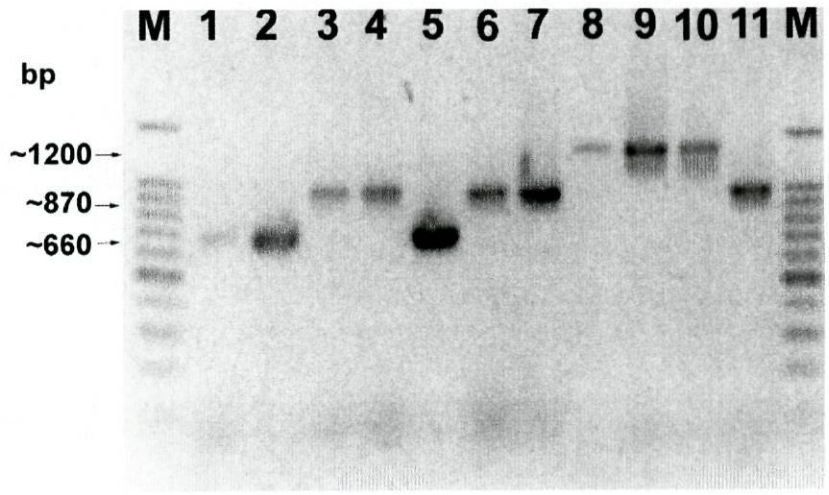


Figura 3: Electroforese em gel de agarose dos produtos de amplificação obtidos no PCR multiplex para identificação de *Listeria* spp. e coloração com brometo de etídio.
Linhas: M - marcador de peso molecular 100 bp DNA (Promega); 1 - *L.monocytogenes* (F41-2); 2 - *L.monocytogenes* (F46-1); 3 - *L.innocua* (F47-1); 4 - *L.innocua* (F48-2); 5 - *L.monocytogenes* (F50-16); 6 - *L.innocua* (F52-16); 7 - *L.innocua* (F54-10); 8 - *L.welshimeri* (F40-14); 9 - *L.welshimeri* (F45-12); 10 - *L.seeligeri* (F44-8); 11- *L.innocua* (F16-25).

2) Estudo da susceptibilidade a agentes antimicrobianos

2.1) *Salmonella* spp.

Após identificação dos 36 isolados de *Salmonella* procedeu-se à caracterização dos seus comportamentos face a vários agentes antimicrobianos usados em humanos e animais.

Verifica-se que apenas 9 (25%) dos isolados apresentam susceptibilidade a todos os agentes antimicrobianos testados, enquanto 27 (75%) apresentam resistência a um (14 estirpes) ou mais (13) desses agentes.

Os resultados obtidos mostram que a resistência ao ácido nalidíxico foi a mais frequente, observada em 18 (50%) dos isolados, seguida pela estreptomicina (39%) e tetraciclina (36%). Uma incidência mais baixa de resistência foi observada para as penicilinas (amoxicilina, carbenicilina e piperacilina), canamicina, cloranfenicol e trimetoprim/sulfametoxazol (Quadro 5).

Quadro 5: Resistência aos antimicrobianos dos isolados de *Salmonella* spp.

Agente antimicrobiano	Nº (%) isolados resistentes
ácido nalidíxico	18 (50%)
estreptomicina	14 (39%)
tetraciclina	13 (36%)
amoxicilina	7 (19%)
carbenicilina	7 (19%)
piperacilina *	7 (19%)
cloranfenicol	1 (3%)
canamicina	1 (3%)
trimetoprim/sulfametoxazol	1 (3%)

* dois isolados apresentam comportamento intermédio

Nos isolados resistentes foi determinada a CMI para alguns agentes antimicrobianos (Quadro 6), verificando-se níveis elevados de resistência para tetraciclina, amoxicilina e trimetoprim/sulfametoxazol nos isolados testados. Todos os isolados foram susceptíveis à associação amoxicilina/ácido clavulânico, às cefalosporinas (cefalotina, cefotaxima e ceftazidima), aos aminoglicosídeos tobramicina, netilmicina e gentamicina, e às fluoroquinolonas (ciprofloxacina e ofloxacina). As 18 estirpes resistentes ao ácido nalidíxico foram estudadas com mais detalhe, sendo determinada a CMI para a fluoroquinolona enrofloxacina, por Etest. Verificou-se que todas as estirpes apresentaram uma CMI $\geq$ 2 μg/ml o que as permite classificar como resistentes segundo Malorny *et al* (1999).

Quadro 6: CMI dos isolados de *Salmonella* spp. resistentes

Agente antimicrobiano (nº isolados)	**Limites CMI (μg/ml)**
tetraciclina (13)	64 - >256
amoxicilina (7)	>256
piperacilina (7) *	32 - >256
amoxicilina/ácido clavulânico (7)	2 - 4
cefalotina (7)	4 - 8
ceftazidima (7)	0,25 - 1
trimetoprim/sulfametoxazol (1)	>256

* dois isolados apresentam comportamento intermédio

Nos 27 isolados de *Salmonella* resistentes a antimicrobianos observam-se 8 padrões diferentes de resistência (Quadro 7). Entre estes resultados salientam-se os 10 isolados com multiresistência ao ácido nalidíxico, estreptomicina e tetraciclina, com um dos isolados ainda resistente às penicilinas. Verifica-se ainda que todos os isolados (13) resistentes à tetraciclina também foram resistentes à estreptomicina. Além disso, este perfil aparece em três dos quatro isolados de perus que apresentam várias resistências (penicilinas, estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol e trimetoprim/sulfametoxazol; penicilinas, estreptomicina, tetraciclina e ácido nalidíxico; estreptomicina, tetraciclina e canamicina).

Quadro 7: Padrões de resistência dos isolados de *Salmonella* spp.

Padrões de resistência	**Nº isolados (n=27)**
NA	8
S	1
A	5
S+T	1
NA+S+T	9
S+T+K	1
NA+S+T+A	1
S+T+A+C+SXT	1

NA = ácido nalidíxico; S = estreptomicina; T = tetraciclina;
A = amoxicilina; K = canamicina; C = cloranfenicol;
SXT = trimetoprim/sulfametoxazol

A distribuição dos serótipos de *Salmonella* pelos resultados de resistência aos antimicrobianos apresenta-se nos Quadros 8 e 9. Salienta-se que os 9 isolados sensíveis a todos os agentes antimicrobianos incluem sete *S*.Enteritidis e uma das *S*.Virchow, todas isoladas de frangos, e a única *S*.Indiana isolada de uma amostra de peru. As restantes 9

*S.*Enteritidis não apresentaram resistência múltipla a agentes de grupos diferentes, sendo 5 resistentes ao ácido nalidíxico e 4 a antibióticos do grupo dos β-lactâmicos (amoxicilina, carbenicilina e piperacilina). Relativamente ao segundo e terceiro serótipo em termos de frequência nas nossas amostras, todas as estirpes de *S.*Hadar (10) foram resistentes ao ácido nalidíxico, sendo 8 resistentes também à tetraciclina e à estreptomicina, tal como duas das três estirpes de *S.*Virchow. Por outro lado, três dos serótipos isolados de perus (*S.*Saintpaul, *S.*Blockley e *S.*Hadar) foram multiresistentes a vários grupos de antimicrobianos (entre 2 e 5).

Quadro 8: Relação entre serótipos de *Salmonella* e resistência aos antimicrobianos

	Nº (%) isolados resistentes						
Serótipos (n isolados)	**NA**	**S**	**TE**	**A**	**C**	**K**	**SXT**
Enteritidis (16	5 (31)	-	-	4 (25)	-	-	-
Hadar (10)	10 (100)	8 (80)	8 (80)	1(10)	-	-	-
Virchow (3)	2 (67)	2 (67)	2 (67)	-	-	-	-
Derby (1)	-	1 (100)	1 (100)	-	-	-	-
Anatum (1)	-	1 (100)	-	-	-	-	-
Heidelberg (1)	-	-	-	1 (100)	-	-	-
Kingston (1)	1 (100)	-	-	-	-	-	-
Saintpaul (1)	-	1 (100)	1 (100)	1 (100)	1 (100)	-	1 (100)
Indiana (1)	-	-	-	-	-	-	-
Blockley (1)	-	1 (100)	1 (100)	-	-	1 (100)	-
TOTAL (36)	**18 (50)**	**14 (39)**	**13 (36)**	**7 (19)**	**1 (3)**	**1 (3)**	**1 (3)**

Quadro 9: Relação entre serótipos de *Salmonella* e padrões de resistência aos antimicrobianos

Padrões de resistência	**Total**	**Ent (16)**	**Had (10)**	**Vir (3)**	**Der (1)**	**Ana (1)**	**Hei (1)**	**Kin (1)**	**Sai (1)**	**Ind (1)**	**Blo (1)**
NA	8	5	2	-	-	-	-	1	-	-	-
S	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
A	5	4	-	-	-	-	1	-	-	-	-
S+T	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
NA+S+T	9	-	7	2	-	-	-	-	-	-	-
S+T+K	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
NA+S+T+A	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
S+T+A+C+SXT	1	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-

NA = ácido nalidíxico; S = estreptomicina; T = tetraciclina; A = amoxicilina; K = canamicina;
C = cloranfenicol; SXT = trimetoprim/sulfametoxazol
Ent = Enteritidis; Had = Hadar; Vir = Virchow; Der = Derby; Ana = Anatum; Hei = Heidelberg; Kin = Kingston;
Sai = Saintpaul; Ind = Indiana; Blo = Blockley

2.1.1) Estudo de mecanismos de resistência aos antibióticos β-lactâmicos

Nos 7 isolados de *Salmonella* em que se observou resistência às três penicilinas avaliadas efectuou-se a pesquisa de β-lactamases por focagem isoeléctrica, verificando-se que todas elas produzem β-lactamases de pI 5,4 (Figura 4). Acresce que não foi observado sinergismo entre amoxicilina/ácido clavulânico e uma cefalosporina de 3ª geração (ceftazidima), pelo que se tratará de uma β-lactamases do tipo TEM-1.

Nos 6 isolados resistentes às penicilinas e sensíveis ao ácido nalidíxico efectuaram-se ensaios de conjugação, obtendo-se transconjugantes para 5 desses isolados, que tal como os isolados dadores apresentaram β-lactamases de pI 5.4 (Figura 4). O isolado que não conjugou apresentava também resistência a agentes antimicrobianos de outros grupos, enquanto o outro não fez parte dos ensaios de conjugação, pois apresentava resistência ao ácido nalidíxico, usado como agente de selecção nestes ensaios. Os cinco transconjugantes obtidos apresentam resistência adquirida à amoxicilina, carbenicilina e um perfil intermédio à piperacilina e à associação amoxicilina/ácido clavulânico.

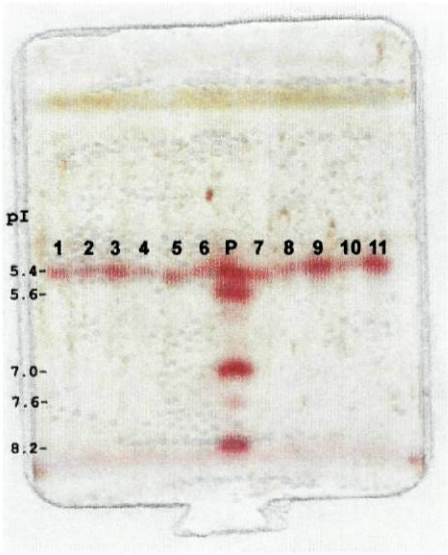


Figura 4: Determinação do pI das β-lactamases por focagem isoeléctrica em sistema Phast System (Pharmacia) e revelação com nitrocefin.
Linhas: 1- *Salmonella* (F18); 2- transconjugante (18-A); 3- *Salmonella* (F21); 4- transconjugante (F21-A); 5- *Salmonella* (F25); 6- transconjugante (F25-A); P- padrão de pI de β-lactamases; 7- *Salmonella* (F38); 8- transconjugante (F38-A); 9- *Salmonella* (F49); 10- *Salmonella* (P1); 11- *Salmonella* (P9).

2.2) *Listeria* spp. e *L.monocytogenes*

Após identificação dos 67 isolados de *Listeria* procedeu-se à caracterização dos seus comportamentos face a vários agentes antimicrobianos usados em humanos e animais.

Verifica-se que 11 (16%) dos isolados apresentam susceptibilidade a todos os agentes antimicrobianos testados, enquanto 56 (84%) apresentam resistência a um (36) ou mais (20) desses agentes de grupos diferentes.

Todos os isolados apresentam sensibilidade a penicilina, amoxicilina, vancomicina, rifampicina, tobramicina, gentamicina, canamicina, cloranfenicol e trimetoprim/sulfametoxazol.

No entanto, os resultados apresentados no Quadro 10 mostram uma incidência significativa de *Listeria* spp. resistentes à clindamicina, sendo mesmo a resistência predominante para *L.innocua* (69%) e *L.welshimeri* (63%), e a segunda resistência para *L.monocytogenes* (35%). A resistência à enrofloxacina também foi frequente nas duas espécies mais frequentemente detectadas, *L.monocytogenes* (58%) e *L.innocua* (41%).

Quadro 10: Resistência aos antimicrobianos dos isolados de *Listeria* spp.

Agente antimicrobiano	**Nº (%) isolados resistentes**				
	***Listeria* spp.** **(67)**	***L.monocytogenes*** **(26)**	***L.innocua*** **(32)**	***L.welshimeri*** **(8)**	***L.seeligeri*** **(1)**
clindamicina	36 (54%)	9 (35%)	22 (69%)	5 (63%)	-
enrofloxacina	29 (43%)	15 (58%)	13 (41%)	-	1 (100%)
tetraciclina	10 (15%)	-	9 (28%)	1 (13%)	-
estreptomicina	5 (7%)	1 (4%)	4 (13%)	-	-
eritromicina	1 (2%)	-	1 (3%)	-	-
ofloxacina	1 (2%)	-	-	-	1 (100%)

Em todos os isolados de *Listeria* foram determinadas as CMIs para clindamicina por *Etest*, sendo a variação entre 0,5 e 12 μg/ml. Foram considerados resistentes 36 isolados, com CMIs entre 4 e 12 μg/ml. Salienta-se que alguns isolados considerados resistentes à clindamicina pelo método de difusão em agar com discos apresentaram valores de CMI pertencentes à categoria intermédia pelo Etest.

Por outro lado, em todos os isolados foram também determinadas as CMIs para a enrofloxacina, que variam entre 0,5 e 4 μg/ml. Foram considerados resistentes 29 isolados, todos com CMI igual a 2 μg/ml, com excepção da única *L.seeligeri* (CMI 4 μg/ml) que também era resistente à ofloxacina.

Nos 10 isolados de *Listeria* resistentes à tetraciclina determinou-se a CMI por *Etest* e a susceptibilidade à minociclina (30μg) por método de difusão em agar com discos. As CMIs para tetraciclina variam entre 16 e 96 μg/ml, sendo 6 estirpes sensíveis à minociclina e 4 classificadas como intermédias.

No Quadro 11 observam-se 12 padrões diferentes de resistência entre os 56 isolados de *Listeria* spp. resistentes a antimicrobianos.

Quadro 11: Padrões de resistência dos isolados de *Listeria* spp.

Padrões de resistência	**Nº isolados**				
	***Listeria* spp.**	***L.monocytogenes***	***L.innocua***	***L.welshimeri***	***L.seeligeri***
	(56)	**(19)**	**(30)**	**(6)**	**(1)**
DA	18	3	10	5	-
ENR	13	10	3	-	-
T	4	-	3	1	-
DA + ENR	11	5	6	-	-
DA + S	2	1	1	-	-
DA + T	1	-	1	-	-
ENR + OFX	1	-	-	-	1
ENR + S	1	-	1	-	-
T + S	1	-	1	-	-
DA + ENR + TE	2	-	2	-	-
DA + T + S	1	-	1	-	-
DA + ENR + T + E	1	-	1	-	-

DA = clindamicina; ENR = enrofloxacina; T = tetraciclina; S = estreptomicina; OFX = ofloxacina; E = eritromicina

Os resultados deste estudo mostram que apenas 7 dos 26 (27%) isolados de *L.monocytogenes* são susceptíveis a todos os antimicrobianos testados. Dos restantes 19 (73%), 15 são resistentes à enrofloxacina e 9 à clindamicina, sendo apenas 6 isolados resistentes a dois agentes de grupos diferentes.

Em contraste, 94% (30 em 32) dos isolados de *L.innocua* são resistentes, salientando-se que quase metade desses isolados apresentam resistência a dois ou mais agentes antimicrobianos diferentes. A maioria dos isolados (69%) é resistente à clindamicina, mas também foram identificados 13 (41%) resistentes à enrofloxacina e 9 (28%) à tetraciclina.

Relativamente às outras duas espécies identificadas, das 8 *L.welshimeri*, 5 apresentam resistência à clindamicina e uma à tetraciclina, enquanto a única *L.seeligeri* é resistente apenas às duas fluoroquinolonas (ofloxacina e enrofloxacina).

V) Discussão

1) Estudo da incidência

1.1) *Salmonella* spp.

A contaminação de carne de aves e derivados por *Salmonella*, especialmente *S.*Enteritidis, é um problema mundial, quer para a indústria, quer para as autoridades responsáveis pela protecção dos consumidores relativamente a doenças transmitidas por alimentos.

Os resultados deste estudo confirmam que também em Portugal as aves são um veículo potencial de *Salmonella*, sendo a incidência nas nossas amostras de 60%. Estes resultados estão de acordo com um estudo anterior realizado no nosso país, em que 57% das carcaças de frangos estavam contaminadas com este patogénico (Machado e Bernardo, 1990). Os dados do presente estudo são também comparáveis com os dados de outros países relativamente a carcaças de aves, embora taxas de isolamento diferentes tenham sido descritas.

Assim, na Grécia, Arvanitidou *et al* (1998) registaram que 69% das amostras de frangos estavam contaminadas com *Salmonella*. Em Espanha, Carramiñana *et al* (1997) observaram também taxas de incidência semelhantes às nossas, com pesquisa positiva para esta bactéria em 60% de carcaças. No Canadá, Lammerding *et al* (1988) isolaram *Salmonella* em 69,1% dos perus e 60,9% das carcaças de frango. No entanto, a prevalência de *Salmonella* em carcaças de aves foi menor noutros estudos: 23% entre 1993 e 1996 na Bélgica (Uyttendaele *et al*, 1998) e 33,8% entre 1997 e 1998 no mesmo país (Uyttendaele *et al*, 1999), 26,4% na Irlanda (Duffy *et al*,1999), 42% (Roberts, 1991), 24,5% (Plummer *et al*, 1995) no Reino Unido e 43% nos USA (Bokanyi *et al*, 1990). Nos USA, estudos mais recentes demonstram que após a implementação do sistema HACCP nos locais de processamento de aves a prevalência desta bactéria baixou de 20% para cerca de 10% em carcaças de frangos (FSIS, 1999a; FSIS, 2000). Em países de outros continentes, as aves também são um veículo potencial de *Salmonella* como indicam os 35,5% de incidência desta bactéria em carcaças de aves na Malásia (Rusul *et al*, 1996).

Estes estudos demonstram que a contaminação das aves com *Salmonella* está largamente difundida, sendo um dos veículos alimentares mais frequentes para esta bactéria. A alta prevalência encontrada nas carcaças de aves, quer ao nível do processamento, quer na venda a retalho, resulta seguramente de um aumento real causado por vários factores, como o rápido crescimento da indústria de aves e a movimentação de

animais vivos (Rusul *et al*, 1996), e também da melhoria da metodologia para detecção desta bactéria (Bokanyi *et al*, 1990).

Por outro lado, é sempre difícil comparar a incidência de patogénicos, incluindo *Salmonella*, registada por vários autores devido ao facto das variações na prevalência poderem ser atribuídas a vários factores: diferenças no local de origem, período da análise e idade das amostras, ao procedimento de amostragem, número inicial de aves portadoras, higiene no matadouro, nível de processamento do produto, a possível contaminação cruzada ao nível da venda a retalho e a variações na metodologia aplicada para detectar os patogénicos (Bryan e Doyle, 1995; Uyttendaele *et al*, 1999; Duffy *et al*, 1999).

Assim, a taxa de contaminação destes produtos depende do **tipo de amostra** analisada. Por exemplo, no estudo de Izat *et al* (1990) nos USA apenas 29% dos frangos congelados estavam contaminados com *Salmonella*, comparativamente com os nossos 60% em aves refrigeradas. Esta situação está de acordo com o facto de algumas populações microbianas serem menores nas carcaças congeladas devido aos efeitos de destruição da congelação e descongelação (Bryan e Doyle, 1995). Por outro lado, a incidência também foi baixa em estudos na Albânia, em que apenas 12,5% (Telo *et al*, 1998) e 8,2% (Beli *et al*, 2001) das amostras de carne de aves analisadas sem pele e produtos relacionados estavam contaminados com *Salmonella*, relativamente a outros trabalhos e ao nosso em que as amostras foram analisadas com pele. Também no estudo de Uyttendaele *et al* (1999) se verificou que as porções de aves sem pele apresentavam contaminação significativamente menor do que as vendidas com pele, 34,6% *versus* 47%, apesar dos níveis de contaminação serem elevados em ambas. Segundo Kotula e Davis (1999), a pele, nomeadamente do pescoço, é o local de amostragem preferível, uma vez que a incidência e número de *Salmonella* são ligeiramente mais elevadas e a sua remoção não altera muito o aspecto da ave, o que pode ter alguma importância na obtenção das amostras para análise.

Também a **idade dos animais** no abate e o **tipo de produção** influenciam a incidência de *Salmonella*, como demonstraram Uyttendaele *et al* (1999) para as carcaças de aves de vida livre até à idade de abate (12 a 13 semanas) que apresentaram uma taxa de contaminação por *Salmonella* significativamente menor do que as aves produzidas em larga escala em capoeiras industriais abatidas com 6 a 8 semanas (14,6% *versus* 46%, respectivamente). Estes resultados de 46% de incidência em aves de produção intensiva, apesar de inferiores aos nossos 60%, estão em concordância com as amostras de frangos analisadas no nosso trabalho que se referem a aves produzidas em aviários industriais. No Canadá, também nos estudos de prevalência ambiental de Poppe *et al* em que 53% dos bandos de galinhas poedeiras (1991b) e 77% dos bandos de frangos (1991a) estavam contaminados com essa bactéria, a diferença de resultados poderá estar associada com a idade dos animais (frangos tinham menos de 8 semanas e as galinhas entre 20 e 72

semanas), tipo de alojamento e contaminação residual nas capoeiras. Também valores diferentes de incidência são encontrados conforme a **espécie de ave**, frango ou peru, provavelmente reflectindo condições de produção diferentes. Assim, Irwin *et al* (1994) verificaram uma mais elevada prevalência de contaminação com *Salmonella* (87%) no ambiente de bandos de perus comercializados no Canadá, comparativamente com os valores encontrados para bandos de frangos (Poppe *et al*, 1991a). No presente trabalho, dado o número reduzido de amostras de perus relativamente às de frangos, não é possível concluir acerca de diferenças entre os dois tipos de aves analisadas, embora os resultados sejam da mesma ordem de grandeza (59% nos frangos e 67% nos perus).

O **processamento** sofrido após o abate também vai influenciar os resultados da incidência. A contaminação origina-se no bando de aves e aumenta através da cadeia de produção por contaminação cruzada durante o abate, corte em peças e demais processamento (Uyttendaele *et al*, 1998). Assim, Uyttendaele *et al* (1999) registaram um aumento, previsível, na incidência de *Salmonella* das carcaças (29,3%) para o corte em porções (44%) e demais processamento (68,3%). No estudo de Carramiñana *et al* (1997), a incidência de *Salmonella* também aumentou gradualmente, de 30% no material fecal colhido dos animais à chegada ao matadouro, para 60% nas carcaças refrigeradas e 80% em fígados de aves, indicando que ocorreu contaminação cruzada durante o processamento. Do mesmo modo, Kotula e Pandya (1995) demonstraram que a incidência de *Salmonella* em frangos após o abate e antes da fase de escaldão foi elevada, variando entre 27,5% e 75%, de acordo com a parte analisada do animal (pele, penas ou patas). Assim, as carcaças de frango serão de maior risco quanto maior for o grau de processamento sofrido, quer nas unidades de processamento, quer nos estabelecimentos de venda a retalho. Por exemplo, nos USA, antes e após a implementação do sistema HACCP, a prevalência de *Salmonella* foi maior em amostras de frango picado (44,6% para 14,4%) e de peru picado (49,9% para 30%) do que em carcaças de frangos (20% para 10%) (FSIS, 1999a; FSIS, 2000). A contaminação cruzada na venda a retalho também influencia os resultados como demonstraram Plummer *et al* (1995) ao detectarem maior contaminação nas amostras de talhos (24,5%) relativamente às pré-embaladas de supermercados (18,6%). Do mesmo modo, os nossos resultados referentes às amostras adquiridas em talhos também poderão reflectir o ambiente desse local, apesar da amostragem se ter efectuado a partir dos animais inteiros e não partidos em porções.

Todos estes trabalhos mostram que as aves representam um risco potencial, especialmente se forem consumidas mal cozinhadas ou se ocorrer contaminação cruzada para alimentos prontos a comer, quer nas cozinhas domésticas e de estabelecimentos de restauração colectiva, quer nos locais de venda a retalho, como os talhos e supermercados.

Relativamente aos serótipos de *Salmonella*, geralmente as carcaças de aves são portadoras de uma grande variedade. Assim, no presente estudo foram isolados dez serótipos diferentes de *Salmonella*, distribuídos principalmente pelos grupos D (17 estirpes) e C (14 estirpes) e em menor número pelos grupos B (4 estirpes) e E (1 estirpe).

O serótipo *S*.Enteritidis, pertencente ao grupo D, foi o predominante (44%). Resultados equivalentes, também a partir de amostras de aves, foram encontrados noutros trabalhos em Portugal (Machado et Bernardo, 1990; INSA, 1999; INSA, 2000), Grécia (Arvanitidou *et al*, 1998), Albânia (Telo *et al*, 1998), Espanha (Carramiñana *et al*, 1997), Bélgica (Uyttendaele *et al*, 1998) e Reino Unido (Plummer *et al*, 1995). Por outro lado, *S*.Enteritidis foi também o serótipo mais frequentemente detectado em isolados humanos e animais em Portugal entre 1995 e 1999 (INSA, 1999; INSA, 2000).

No entanto, outros estudos revelam valores diferentes relativamente à incidência e predomínio de *S*.Enteritidis. Assim, na Bélgica, num estudo mais recente, apenas 5,4% das amostras apresentavam este serótipo relativamente às 36,5% que estavam contaminadas com outros serótipos de *Salmonella* (Uyttendaele *et al*, 1999) e na Irlanda, Duffy *et al* (1999) referem que *S*.Enteritidis não foi o serótipo predominante, ficando apenas na terceira posição. No Canadá, nos estudos de Poppe *et al* (1991a; 1991b), este serótipo só foi isolado de nove bandos de frangos (3%) e de oito bandos de galinhas poedeiras (2,7%), sendo o oitavo e quinto serótipo em termos de prevalência, respectivamente. Num estudo nos USA, *S*.Enteritidis não se encontrou entre os dez serótipos mais comuns em carcaças e derivados de frangos e perus, apesar de ser um dos serótipos mais comum de salmonelose nesse país (Schlosser *et al*, 2000). Do mesmo modo, nos USA, após a implementação do sistema HACCP, *S*.Enteritidis continuou a não ser um dos principais serótipos isolados de carcaças de frangos e de amostras de peru picado (FSIS, 1999b).

Por outro lado, também é de salientar que nas nossas amostras de peru não foram isoladas *S*.Enteritidis e não se verificou predomínio de algum serótipo, apesar do reduzido número analisado desse tipo de amostra. Esta situação também foi registada pelo Centro Nacional de *Salmonella*, pois na carne de peru não aparecem serótipos predominantes, mas uma grande variedade (INSA, 1999; INSA, 2000). Nos estudos de Uyttendaele *et al* (1998; 1999), S.Enteritidis também esteve predominantemente associada com carcaças de frango e nunca ou raramente foi isolada de perus. Do mesmo modo, *S*.Enteritidis não foi isolada de nenhuma amostra ambiental de perus analisada no estudo de Irwin *et al* (1994), sugerindo que estes animais não são uma fonte significativa de *S*.Enteritidis para os humanos. Beli *et al* (2001) nas 11 amostras (8,2%) de carne de peru em que foi recuperada *Salmonella* referem 5 serótipos diferentes, incluindo *S*.Enteritidis em 4 amostras, sendo os isolados do serogrupo B predominantes (6).

Para além de *S*.Enteritidis, outros serótipos também isolados de aves variam largamente entre os diversos estudos. Assim, no presente trabalho, os outros serótipos mais identificados incluem *S*.Hadar (10) e *S*.Virchow (3), ambos pertencentes ao grupo C. O serótipo *S*.Hadar, segundo serótipo mais isolado no presente trabalho, também foi comum em Portugal em carne de frango entre 1995 e 1998 (INSA, 1999) e em 1999 (INSA 2000). Tal como foi dos mais prevalentes entre *Salmonella* isoladas no Canadá por Lammerding *et al* (1988), Poppe *et al* (1991a) e Irwin *et al* (1994) e nos USA por Bokanyi *et al* (1990), Schlosser *et al* (2000) e pelo FSIS (1999b). Na Bélgica, em amostras de aves, a incidência de *S*.Hadar (15,5%) e de *S*.Virchow (14,1%) foi mesmo apenas ligeiramente mais baixa do que a de *S*.Enteritidis (16,3%), sendo estes os três serótipos predominantes (Uyttendaele *et al*, 1998). No entanto, *S*.Hadar e *S*.Virchow foram raramente ou nunca encontradas noutros estudos em aves (Rusul *et al*, 1996; Arvanitidou *et al*, 1998; Duffy *et al*, 1999), incluindo num realizado no nosso país em que estes dois serótipos não foram detectados (Machado e Bernardo, 1990). Actualmente, *S*.Hadar e *S*.Virchow fazem também parte do grupo dos quatro serótipos de origem humana mais frequentemente isolados em Portugal e em vários países da Europa (INSA, 1999). No Reino Unido, já entre 1981 e 1986, as infecções humanas com *S*.Virchow tinham aumentado 30%, sendo as aves a principal fonte (Humphrey *et al*, 1988).

Para além dos três serótipos predominantes no nosso estudo, também foi isolada uma estirpe de cada um dos seguintes serótipos: *S*.Derby, *S*.Anatum, *S*.Heidelberg, *S*.Kingston, *S*.Saintpaul, *S*.Indiana e *S*.Blockley. Do mesmo modo, noutros trabalhos, realizados em regiões ou épocas diferentes, foi isolada uma grande variedade de serótipos de *Salmonella*, semelhantes ou diferentes destes, também a partir de amostras de aves (Lammerding *et al*, 1988; Machado e Bernardo, 1990, Poppe *et al*, 1991b; Irwin *et al*, 1994; Rusul *et al*, 1996; Arvanitidou *et al*, 1998; Uyttendaele *et al*, 1998; Duffy *et al*, 1999; FSIS, 1999b; Schlosser *et al*, 2000). No presente trabalho não foi possível estudar a distribuição geográfica dos diferentes serótipos isolados, uma vez que nem para todas as amostras havia identificação do local de produção, sabendo-se, no entanto, que correspondiam todas a animais de produção nacional.

Apesar de *S*.Typhimurium ser um dos serótipos mais frequentemente incriminado em surtos de salmonelose humana em Portugal (INSA, 1999; INSA, 2000), neste trabalho não foi identificada em nenhum produto, tal como também revelam os dados recentes do Centro Nacional de *Salmonella* (1999; 2000) para as amostras de frango, sendo este serótipo mais frequente em carne de porco e fumados. Um trabalho anterior (Machado e Bernardo, 1990) revela, embora com baixa frequência, o isolamento deste serótipo em produtos avícolas. No entanto, noutros estudos nos USA (Izat et al, 1991) e Canadá (Poppe *et al*, 1991b; Irwin *et al*, 1994) *S*.Typhimurium foi um dos serótipos registados em aves, e no estudo de

Lammerding *et al* (1988) no Canadá foi mesmo o serótipo mais frequentemente isolado em frangos entre 1983 e 1985. Mais recentemente, foi um dos serótipos mais frequentemente detectado em carcaças de frango nos USA (FSIS, 1999b; Schlosser *et al*, 2000). Estes resultados poderão indicar, pelo menos em alguns países, que *S.*Typhimurium começa a estar associada a produtos avícolas.

1.2) *Listeria* spp. e *L.monocytogenes*

Todas as espécies de *Listeria*, nomeadamente *L.monocytogenes*, encontram-se largamente distribuídas no ambiente, de modo que os alimentos crus, incluindo as aves, são um veículo frequente destas bactérias.

Os resultados do presente estudo confirmam esta situação, uma vez que 100% das amostras de frango e peru apresentaram pesquisa positiva para *Listeria* spp. e 41% para *L.monocytogenes*. Estes dados são também comparáveis a estudos realizados noutros países em amostras de aves nos últimos anos.

Assim, na Bélgica, a incidência de *L.monocytogenes* em carcaças de frangos foi de 41,3% entre 1997 e 1998 (Uyttendaele *et al*, 1999) e de 24,6% entre 1992 e 1995 (Uyttendaele *et al*, 1997). No Reino Unido, as aves cruas adquiridas em supermercados foram o alimento mais contaminado com estas bactérias, sendo a incidência de 80% para *Listeria* spp. e de 63% para *L.monocytogenes* (MacGowan *et al*, 1994). Similarmente, na Irlanda do Norte, a pesquisa de *Listeria* spp. e de *L.monocytogenes* foi positiva em 91% e 59%, respectivamente, também em amostras de aves cruas (Lawrence e Gilmour, 1994). Do mesmo modo, num estudo realizado na Austrália, verificou-se que a incidência de *Listeria* spp. e de *L.monocytogenes* foi elevada em aves cruas (45,5% e 30,3%, respectivamente) (Arnold e Coble, 1995).

Já estudos anteriores tinham confirmado que as aves são veículos potenciais de *L.monocytogenes*, como demonstram as incidências registadas que variaram entre 23% e 85% (Pini e Gilbert, 1988; Skovgaard e Morgen, 1988; Bailey *et al*, 1989; Schonberg *et al*, 1989; Wong *et al*, 1990; Lewis e Corry, 1991; Rorvik e Yndestad, 1991), embora outros estudos tenham revelado percentagens menores de contaminação (Varabioff, 1990; Wang *et al*, 1992; Gohil *et al*, 1995; Ojeniyi *et al*, 1996).

Para além dos métodos de isolamento influenciarem a prevalência de *Listeria* spp. nas amostras de produtos cárneos, também é difícil comparar os resultados registados por vários autores devido ao facto das variações na prevalência poderem ser atribuídas a vários factores: diferenças geográficas, diferenças nas práticas de criação e abate dos animais, diferenças nas práticas de manipulação dos alimentos, incluindo condições de armazenamento, especialmente controlo de temperatura (Johnson *et al*, 1990).

A contaminação de alimentos, nomeadamente aves, por *Listeria* spp. está associada não só ao local de produção, mas também ao local de processamento, já que se trata de uma bactéria largamente difundida no ambiente, sendo os resultados da incidência afectados pelo **nível de processamento** dos produtos. Assim, Uyttendaele *et al* (1999) detectaram um aumento gradual da contaminação com *L.monocytogenes* das carcaças de frango (41,3%) para as porções cortadas (46,7%) e destas para produtos mais processados (61%). No estudo de Franco *et al* (1995), as porções de aves no fim do processamento também se encontravam muito contaminadas com *Listeria* spp. (64% a 96%) e com *L.monocytogenes* (52% a 84%), de acordo com a porção analisada. No estudo de Genigeorgis *et al* (1989) também se verificou um aumento da prevalência de *Listeria* spp. e de *L.monocytogenes* à medida que se avança na linha de processamento, tendo os manipuladores um papel importante na difusão dessas bactérias. Do mesmo modo, os nossos resultados também poderão reflectir o ambiente dos locais de aquisição (talhos e estabelecimento de restauração colectiva), apesar da amostragem se ter efectuado a partir de animais inteiros e não partidos em porções ou mais processados no próprio local.

Assim, já num estudo realizado na Malásia, 60% das porções de frango analisadas, vendidas nos supermercados e mercados locais, estavam contaminadas com *L.monocytogenes*, demonstrando uma prevalência elevada desta bactéria em frango cru (Arumugaswamy *et al*, 1994), e superior à detectada no presente trabalho para animais inteiros. No entanto, num estudo realizado na Irlanda, apenas 50% das porções de frango continham *Listeria* spp. e 30% *L.monocytogenes* (Sheridan *et al*, 1994), enquanto num estudo anterior nos USA, percentagens ainda menores foram registadas para *Listeria* spp. (40,6%) e *L.monocytogenes* (13,1%) em produtos do mesmo tipo (Genigeorgis *et al*, 1989). Mais recentemente, num estudo realizado no Japão, a carne de frango picada foi o alimento analisado com maior incidência de *L.monocytogenes* (37%), para além de ser o produto com maior nível de contaminação (Inoue *et al*, 2000), tal como num estudo anterior em Espanha, em que as amostras de carne picada, incluindo aves, foram as mais contaminadas com uma incidência de 80% de *Listeria* spp. e 17% de *L.monocytogenes* (De Simón *et al*, 1992). Estes dois estudos demonstram uma elevada ocorrência de *L.monocytogenes* em carnes picadas, mas inferior à das nossas amostras em aves inteiras.

A taxa de contaminação também depende do **tipo de produto** disponível para venda que é analisado. Por exemplo, num estudo realizado em Portugal, apenas 64% de amostras de carne de frango e peru pré-embaladas estavam contaminadas com *Listeria* spp. e 21% com *L.monocytogenes* (Esteves *et al*, 1996), comparativamente com a maioria das nossas amostras adquiridas em talhos sem qualquer embalagem. Também em contraste com os nossos resultados estão os de Uyttendaele *et al* (1999), em que a incidência de

L.monocytogenes foi significativamente maior nas porções de aves sem pele (17,6%) relativamente às com pele (6,9%), provavelmente consequência de maior manipulação .

Por outro lado, no estudo de Gohil *et al* (1995) verificaram-se diferenças entre as aves no estado fresco e congelado, sendo mais elevada a incidência de *Listeria* spp. e de *L.monocytogenes* nos frangos congelados (82% e 46%, respectivamente) em relação aos frangos frescos (33% e 3,3%, respectivamente), podendo reflectir a diferente origem das amostras (frangos frescos eram de origem local, enquanto os congelados eram importados) e as diferenças no processamento dos produtos. Outros autores também demonstraram maior ocorrência de *Listeria* spp. em carnes congeladas do que em frescas (Varabioff, 1990; Wang *et al*, 1992; Sheridan *et al*, 1994), sendo sugerido também por Wang *et al* (1992) que a maior manipulação que sofrem os congelados aumenta a contaminação por esta bactéria. Além disso, o congelamento pode ter reduzido o número de outros microrganismos, permitindo que as espécies de *Listeria*, resistentes ao congelamento, sejam mais facilmente isoladas (Varabioff, 1990).

No entanto, não se pode excluir a hipótese de também o **tipo de ave** poder influenciar a incidência de *L.monocytogenes*, como demonstraram Uyttendaele *et al* (1997) em que maior contaminação foi detectada em carcaças de galinhas (51%) relativamente a carcaças de frangos (24,6%), possivelmente por maior tempo de permanência no local de produção e menores cuidados de higiene. No presente trabalho, dado o número reduzido de amostras de peru relativamente às de frango, não é possível estabelecer um relação entre a incidência de *L.monocytogenes* e o tipo de ave analisada, embora os resultados sejam da mesma ordem de grandeza (40% em frangos e 50% em perus).

Todos estes trabalhos demonstram que as aves são um veículo importante de *Listeria* spp. e particularmente de *L.monocytogenes*. Assim, as aves podem ser uma fonte potencial de contaminação, nos próprios locais de venda a retalho, como os talhos, onde vários alimentos são vendidos, incluindo, por vezes, alimentos prontos a comer. Também nas cozinhas de estabelecimentos de restauração colectiva ou das casas dos consumidores, estes produtos são de risco, especialmente se ocorrer contaminação cruzada ou se forem ingeridos mal cozinhados. Além disso, tendo em conta a capacidade de *L.monocytogenes* crescer a temperaturas de refrigeração, o armazenamento de alimentos contaminados durante algum tempo poderá permitir a proliferação deste patogénico para níveis perigosos.

Assim, os **produtos prontos a comer** refrigerados feitos à base de aves, como frango e peru, também podem constituir um risco para a saúde pública pela presença de *L.monocytogenes,* como resultado de contaminação pós-processamento, como seria de esperar para uma bactéria de origem ambiental tão difundida. Por exemplo, no estudo de Rijpens *et al* (1997), a presença de *Listeria* spp. e de *L.monocytogenes* foi detectada em

35,5% e 15,5%, respectivamente, das amostras de produtos com aves (frango e peru) prontos a comer, possivelmente por contaminação cruzada no ambiente de processamento de aves ou no supermercado. Sheridan *et al* (1994) só detectaram *Listeria* em amostras de carnes prontas a comer que não estavam pré-embaladas, em vácuo ou em atmosfera modificada, indicando também contaminação pós-processamento durante o corte e distribuição dos produtos. Outros trabalhos que demonstram a ocorrência de *Listeria* spp. e de *L.monocytogenes* em alimentos preparados com frango e peru, sugerem que a presença de *L.monocytogenes* em carnes prontas a comer é preocupante, principalmente porque os níveis da bactéria podem aumentar substancialmente ao fim de alguns dias de armazenamento a temperaturas de refrigeração (Gilbert *et al*, 1989; Hudson *et al*, 1992; Lawrence e Gilmour, 1994; Wilson, 1995; De Simón e Ferrer, 1998).

Relativamente a outras espécies de *Listeria*, geralmente as carcaças de aves são portadoras de várias, como se verificou no presente estudo em que foram detectados isolados de mais três espécies: *L.innocua*, *L.welshimeri* e *L.seeligeri*. Salienta-se o facto de *L.innocua* ter sido a mais prevalente, também relativamente à espécie patogénica *L.monocytogenes*. Estes resultados estão de acordo com outros estudos efectuados em aves, em que as espécies de *Listeria* isoladas foram principalmente *L.monocytogenes* e *L.innocua* (Lewis e Corry, 1991; Arnold e Coble, 1995; Sheridan *et al*, 1994; MacGowan *et al*, 1994), verificando-se também em alguns trabalhos maior prevalência de *L.innocua* relativamente às outras espécies, nomeadamente *L.monocytogenes* (Petersen e Madsen, 2000). O facto de *L.innocua* ser isolada mais frequentemente dos alimentos e do ambiente poderá ser explicada por esta espécie crescer mais facilmente nos caldos de enriquecimento do que *L.monocytogenes*, como demonstrado por vários estudos (Petran e Swanson, 1993; Curiale e Lewus, 1994).

Embora alguns autores sugiram diferenças no poder patogénico de vários serótipos de *L.monocytogenes* e apesar de não terem sido determinados os serótipos dos nossos isolados de *L.monocytogenes*, a detecção desta espécie em 41% das amostras indica um risco elevado de contaminação por estirpes patogénicas.

1.2.1) Comparação dos métodos utilizados para identificação

Uma vez que a identificação das espécies de *Listeria* por métodos convencionais é demorada e trabalhosa, foi aplicada uma técnica de PCR multiplex (Bubert *et al*, 1999) aos isolados identificados por API-*Listeria*, de modo a ser avaliada a possibilidade desse método ser alternativo à confirmação bioquímica. Além disso, a escolha de uma técnica molecular que se baseia em características genotípicas estáveis (gene *iap*) e não em características

bioquímicas, que podem ser variáveis, torna esse método de identificação mais seguro (Bubert *et al*, 1999).

Por outro lado, o sistema API-*Listeria* (Bille *et al*, 1992) permite distinguir as espécies de *Listeria*, mas sendo a diferenciação entre *L.monocytogenes* e *L.innocua* baseada apenas numa prova bioquímica (presença ou ausência de arilamidase), por vezes com algumas dificuldades na leitura do resultado. Além disso, entre outras características correntemente usadas, a hemólise é um dos poucos marcadores que distingue *L.monocytogenes* (hemolítica) de *L.innocua* (não hemolítica) (Bille *et al*, 1992), e que por vezes não é de fácil interpretação. Também se verifica pela lista de perfis numéricos que acompanham o sistema API-*Listeria* (biomérieux) que existem casos em que não é possível distinguir *L.monocytogenes* de outras espécies de *Listeria*. O método que se utilizou foi baseado no proposto por Bubert *et al* (1999) que permite diferenciar espécies de *Listeria*, nomeadamente *L.monocytogenes*, *L.innocua*, *L.grayi* e um grupo de três espécies, constituído por *L.seeligeri*, *L.welshimeri* e *L.ivanovii*, apenas com uma reacção de amplificação.

Os resultados obtidos no presente trabalho, indicam que todos os isolados identificados até à espécie pelo método clássico apresentaram produtos de amplificação por PCR característicos da mesma espécie ou do grupo das três espécies que não se distinguem, ou seja, foi obtido 100% de conformidade entre os dois métodos utilizados para a totalidade dos isolados.

Relativamente aos métodos de preparação de DNA testados no presente trabalho, o aquecimento a 99º C durante 10 minutos na presença de tween 20 (0,05%), efectuado antes da reacção de amplificação, foi o mais adequado para a identificação dos isolados de *Listeria* spp. Este método de preparação de DNA usado para os ensaios de PCR foi mais rápido e mais simples do que o proposto por Bubert *et al* (1999), reduzindo a manipulação, pelo que se minimiza a possibilidade de contaminação das amostras e, consequentemente, resultados errados.

Outros autores, utilizando outros procedimentos rápidos com base em técnicas de PCR, obtiveram também resultados concordantes entre o método cultural e o ensaio de PCR para os seus isolados (Lawrence e Gilmour, 1994; Paziak-Domanska *et al*, 1999). No entanto, muitos desses métodos são limitados, pois só permitem identificar o género *Listeria* e a espécie patogénica *L.monocytogenes*, não sendo possível diferenciar outras espécies, como no método descrito por Bubert *et al* (1999).

Porém, será útil desenvolver técnicas deste tipo para a detecção directa de espécies de *Listeria* em amostras de alimentos, podendo, assim, ser ultrapassada a fase de cultura para isolamento, uma vez que a diferenciação das colónias das várias espécies é impossível nas placas dos meio de cultura recomendadas pela norma ISO 11290-1 (1996). Alguns

autores demonstraram que a associação da fase de pré-enriquecimento com o PCR é um método mais rápido e fácil do que a técnica convencional de enriquecimento e identificação bioquímica para amostras alimentares (Bansal *et al*, 1996; Rijpens *et al*, 1997). Além disso, como estes métodos de PCR permitem detectar baixos níveis de contaminação pode ser possível ultrapassar o problema da *L.innocua* crescer mais rapidamente do que *L.monocytogenes* em caldos de enriquecimento, como sugerem alguns autores, podendo assim sobrepor-se a *L.monocytogenes* quando as duas espécies estão presentes (Petran e Swanson, 1993; Curiale e Lewus, 1994).

2) Estudo da susceptibilidade a agentes antimicrobianos

2.1) *Salmonella* spp.

2.1.1) Resistência e multiresistência

Incidência de resistência

O uso por rotina de antimicrobianos na produção de aves contribui para a resistência observada a estes agentes entre os isolados de *Salmonella* nesses animais e no seu ambiente. Dado que muitos dos antibióticos utilizados no presente estudo para avaliação da resistência são usados extensivamente nas aves, os resultados obtidos não foram inesperados.

Assim, nas amostras analisadas neste estudo a incidência de estirpes de *Salmonella* resistentes aos antimicrobianos foi elevada (75%), sendo 27 o número de isolados resistentes a um ou mais dos agentes ensaiados. Devido a informação incompleta sobre a origem de todas as amostras processadas e ao reduzido número de cada uma das que se encontravam identificadas, não foi possível estabelecer uma relação entre o local de produção e o de comercialização e a prevalência de estirpes resistentes. No entanto, os resultados do presente estudo podem ser comparados aos de outros autores no que concerne à incidência de resistência em isolados de aves.

Assim, elevadas incidências de *Salmonella* resistentes aos antimicrobianos foram também observadas em outros estudos similares realizados noutros países: 57% (Lee *et al*, 1993) e 67,3% (Bokanyi *et al*, 1990) nos USA e 58% na Grécia (Arvanitidou *et al*, 1998). Num estudo no Canadá, as aves foram mesmo o maior reservatório de *Salmonella* resistentes (53,4%) relativamente a outros alimentos (D'Aoust *et al*, 1992). No entanto, outros autores apresentam resistências substancialmente maiores do que as encontradas nesses estudos. Assim, Duffy *et al* (1999) mostram que todas as estirpes de *Salmonella* isoladas de aves, vendidas a retalho numa área da Irlanda, foram resistentes a um ou mais antimicrobianos, tal como Manie *et al* (1998) para as amostras de frangos de um matadouro na África do Sul. Também num estudo no Brasil entre 1978 e 1983, 99% das estirpes isoladas de alimentos, incluindo carcaças de aves, foram resistentes a pelo menos um dos antimicrobianos testados (Campos e Hofer, 1989). Em contraste, noutros trabalhos a frequência de resistência foi inferior, como se verifica pelos resultados do programa de vigilância do Reino Unido, onde 75% das *Salmonella* isoladas de aves foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados (Wray *et al*, 1993).

A comparação da ocorrência de resistências entre bactérias isoladas em vários países deve ter em conta, para além da origem das amostras, as diferenças existentes nas práticas de utilização de antibióticos em animais. Assim, o uso mais limitado de agentes antimicrobianos na Dinamarca relativamente a outros países pode reflectir-se no facto da frequência de estirpes resistentes aos antimicrobianos entre as bactérias isoladas de animais de produção nesse país ser genericamente menor do que o registado em outros países com produção intensiva de animais (Aarestrup *et al*, 1998b).

Também Poppe *et al* (1996) justificaram o facto da proporção de *Salmonella* resistentes a antimicrobianos ser maior entre os isolados ambientais de bandos de frangos (28,9%) do que entre os de galinhas poedeiras (12,9%), provavelmente porque é mais comum o uso de antibióticos nos pintos destinados a frangos do que nos pintos destinados a galinhas poedeiras no Canadá. Outra razão apontada por esses autores foi a idade dos bandos, que implica que os frangos tenham sido expostos a antibióticos alguns dias ou semanas antes da amostragem, enquanto nas poedeiras o intervalo de tempo entre a administração de antibióticos e o isolamento das estirpes foi maior, ou seja, quando a pressão selectiva sobre as bactérias é removida, algumas podem perder as propriedades de resistência. Comparativamente com os bandos de perus, os mesmos autores (Poppe *et al*, 1995) verificaram uma maior frequência de resistência aos antimicrobianos nos isolados destes últimos, provavelmente porque a utilização desses agentes seja uma prática ainda mais frequente nestes animais (ex. injectar antimicrobianos nos ovos incubados como medida preventiva). Devido ao reduzido número de amostras, os nossos resultados relativamente à frequência de resistência entre os isolados de frango (75%) e de peru (75%) não permitem concluir acerca das práticas de utilização de antibióticos conforme a espécie animal em causa. No entanto, é de salientar que as estirpes com maior número de resistências (multiresistência) foram isoladas em três das quatro amostras de peru analisadas.

Incidência de multiresistência

No presente estudo, verifica-se que 13 das 36 (36%) estirpes de *Salmonella* isoladas são resistentes a dois ou mais antibióticos de grupos diferentes. Os dados de outros autores também confirmam a importância das aves como reservatório de *Salmonella* multiresistentes, como se verifica pela percentagem de isolados com esse perfil registada em vários estudos: 30,6% na Grécia (Arvanitidou *et al*, 1998), 38,7% no Canadá (D'Aoust *et al*, 1992), 27,2% (Bokanyi *et al*, 1990) e 45% (Lee *et al*, 1993) nos USA. No estudo de Ansari *et* Khatoon (1994), também foram isoladas de aves uma grande percentagem de bactérias Gram negativo, incluindo *Salmonella*, que apresentavam resistências múltiplas aos antimicrobianos. Estes resultados não são inesperados, uma vez que geralmente se

considera que os isolados resistentes a dois ou mais antibióticos têm origem em fontes de contaminação de alto risco, como os locais de produção industrial de aves, onde estes agentes são frequentemente utilizados (Manie *et al*, 1998).

Na sequência do aumento na incidência de estirpes de *Salmonella* resistentes a partir de reservatórios animais, o isolamento em humanos de estirpes resistentes a um ou mais agentes antimicrobianos também tem sido superior. Por exemplo, nos USA, Lee *et al* (1994) mostram que entre 1979 e 1990 a resistência e a multiresistência aumentou de 17% para 31% e de 12% para 25%, respectivamente. Mais recentemente, dados dum programa de vigilância nesse país, mostram que 36% dos isolados humanos de *Salmonella* foram resistentes a pelo menos um agente antimicrobiano, e 30% apresentaram multiresistência (Tollefson *et al*, 1998). O aumento do número de pessoas com maior risco de adquirirem infecções causadas por bactérias resistentes pode ser outra das razões para este aumento, pois o uso difundido de antibióticos para tratar infecções em humanos é um dos factores de risco para a ocorrência de infecções por *Salmonella* resistentes (Lee *et al*, 1994).

Incidência de resistência e multiresistência nos diferentes serótipos

Nem todos os serótipos identificados neste trabalho apresentaram frequências similares de resistência e multiresistência aos antimicrobianos. Relativamente aos três serótipos mais frequentes nas amostras analisadas, salienta-se a elevada percentagem de isolados resistentes de *S*.Hadar (100%) e de *S*.Virchow (67%), relativamente aos de *S*.Enteritidis (56%), apesar de nestes também ser elevada. Encontra-se descrito que determinados serótipos de *Salmonella* podem ter mais probabilidade de adquirirem resistência a antimicrobianos (Hakanen *et al*, 1999), podendo também a manutenção ou perda dessa resistência estar relacionada com o serótipo ao qual pertence a estirpe de *Salmonella* (Poppe *et al*, 1996).

Verificou-se também noutros estudos que o isolamento de *S*.Enteritidis resistentes foi menos frequente relativamente a outros serótipos. Por exemplo, os resultados de Threlfall *et al* (1993) relativos a 1990 no Reino Unido, mostram que a incidência de *S*.Enteritidis resistentes isoladas de aves foi baixa (14%), sendo a maioria das estirpes resistentes pertencentes aos serótipos *S*.Virchow (46%) e *S*.Typhimurium (37%). Do mesmo modo, noutro estudo no Canadá, Poppe *et al* (1996) verificaram que 25 das 45 (55,6%) estirpes de *S*.Enteritidis estudadas, isoladas de bandos de frangos, eram resistentes a antibióticos, mas tendo sido registado maior percentagem de isolados resistentes de outros serótipos. Nos USA, em 1998, pelos dados do programa de vigilância referentes a isolados veterinários, nomeadamente de frangos, também se verificam diferenças entre os serótipos relativamente à frequência de resistência, sendo esta mais frequente em *S*.Hadar e *S*.Typhimurium relativamente a *S*.Enteritidis (NARMS, 1998). Níveis mais baixos foram detectados em

estudos na Dinamarca, onde apenas 1% das estirpes de *S*.Enteritidis (Brown *et al*, 1994) e 9,2% das estirpes de *S*.Typhimurium (Seyfarth *et al*, 1997) isoladas de aves apresentaram resistência aos antimicrobianos.

A baixa incidência de isolados de *S*.Enteritidis resistentes pode ser justificada pelo facto deste serótipo não causar, na maioria dos casos, sintomas clínicos nos bandos de aves afectados, o que implica que os animais não sejam tratados com antibióticos. Em contraste, uma vez que vários isolados de *S*.Typhimurium causam doenças graves nos animais afectados, esses animais são tratados com antibióticos e como resultado da pressão selectiva essas estirpes têm tendência a tornar-se resistentes e multiresistentes (Van den Bogaard e Stobberingh, 1999).

Excepcionalmente, alguns estudos, realizados apenas com estirpes de *S*.Enteritidis, registaram valores mais elevados para a frequência de isolados resistentes desse serótipo. Assim, na Grécia, entre 1987 e 1993, a incidência de *S*.Enteritidis resistentes isoladas de animais e alimentos, sendo a maioria de aves, foi de 69,3% (Tassios *et al*, 1997), enquanto no estudo de Nair *et al* (1995) nos USA, 91% das estirpes de *S*.Enteritidis isoladas de fontes não humanas, incluindo frangos e ovos, eram resistentes a um ou mais dos antimicrobianos testados.

Por outro lado, verifica-se que as 16 *S*.Enteritidis isoladas neste trabalho não apresentam resistência simultânea a antimicrobianos de grupos diferentes. Similarmente outros estudos em aves só esporadicamente detectaram resistência múltipla em isolados deste serótipo (Lee *et al*, 1993; Threlfall *et al*, 1993; Poppe *et al*, 1996). Num estudo americano, foi uma excepção a presença de estirpes de *S*.Enteritidis resistentes a vários agentes de grupos diferentes ter sido frequente entre isolados não humanos que incluíram frangos e ovos (Nair *et al*, 1995).

Em relação a outros serótipos, verificou-se que a maioria dos nossos isolados dos serótipos *S*.Hadar (8 em 10) e *S*.Virchow (2 em 3), pertencentes ao grupo C, apresentavam resistências múltiplas. Já D'Aoust *et al* (1992) tinha verificado que a resistência múltipla foi mais frequente nas estirpes de *Salmonella* pertencentes aos grupos B e C, isoladas de alimentos, incluindo aves, no Canadá entre 1986 e 1989. Do mesmo modo, no Reino Unido, a incidência de isolados de aves multiresistentes de *S*.Typhimurium (grupo B) e de *S*.Virchow (C) aumentou entre 1981 e 1990, enquanto pelo contrário se manteve constante e rara em *S*.Enteritidis (D) (Threlfall *et al*, 1993).

Em isolados humanos também se verificam diferenças na incidência de resistência e de multiresistência consoante o serótipo de *Salmonella*. Assim, foi detectada reduzida incidência de *S*.Enteritidis resistentes comparativamente com outros serótipos, nomeadamente *S*.Typhimurium, *S*.Virchow e *S*.Hadar, em estudos realizados nos USA (Lee *et al*, 1994; Tollefson *et al*, 1998; NARMS, 1999), Reino Unido (Threlfall *et al*, 1993; Threlfall

et al, 1997b), Alemanha (Grob *et al*, 1998), Espanha (Rivera *et al*, 1991; Ramos *et al*, 1996), Irlanda (Cormican *et al*, 1998), Dinamarca (Brown *et al*, 1994; Seyfarth *et al*, 1997), Finlândia (Hakanen *et al*, 1999), Itália (Nastari *et al*, 2000) e França (Breuil *et al*, 2000). Por exemplo, nos USA, no relatório de 1999 do programa de monitorização de resistências (NARMS), verifica-se que os serótipos com maior resistência e multiresistência foram *S*.Hadar (100% e 93%) e *S*.Typhimurium (49% e 46%), enquanto em isolados de *S*.Enteritidis a prevalência foi reduzida (16% e 10%), situação esta registada desde 1996, quando foi estabelecido este sistema de vigilância (NARMS, 1999). Além disso, alguns trabalhos demonstram que a incidência de isolados humanos multiresistentes de *S*.Typhimurium, *S*.Virchow e *S*.Hadar tem aumentado, enquanto pelo contrário se tem mantido constante e rara em *S*.Enteritidis (Threlfall *et al*, 1993; Ramos *et al*, 1996; Threlfall *et al*, 1997b; Grob *et al*, 1998).

Em contraste, tal como já referido para as amostras de origem não humana, Nair *et al* (1995) verificaram que 50% dos isolados humanos de *S*.Enteritidis eram resistentes a um ou mais dos antimicrobianos testados. Também na Grécia, a prevalência de estirpes resistentes de *S*.Enteritidis de fontes humanas atingiu os 66% entre 1987 e 1993, parecendo, no entanto, que entre 1991 e 1993, as frequências de resistência se mantiveram sem alteração em todas as origens (humanas, animais e alimentos), devido talvez à introdução de medidas restritivas do uso de antibióticos nos locais de produção (Tassios *et al*, 1997).

2.1.2) Resistência às quinolonas

Neste estudo, a resistência de estirpes de *Salmonella* à **quinolona** ácido nalidíxico foi a mais frequente, sendo registada em metade dos isolados (18). Os dados nacionais de 1999 relativos a *Salmonella* também mostram que a resistência ao ácido nalidíxico é das mais frequentes, ocorrendo em 65,1% dos isolados de alimentos, em que a maioria são aves (INSA, 2000). No estudo de Duffy *et al* (1999), na Irlanda, a resistência de *Salmonella* a este agente foi similar (68%), apesar de não ser a mais frequentemente detectada por esses autores. Na Alemanha, Malorny *et al* (1999) verificaram um aumento na incidência de estirpes de *Salmonella* resistentes ao ácido nalidíxico, isoladas de animais, incluindo em isolados de aves (0,3% em 1989 para 14,4% em 1994). Em contraste, poucas ou nenhumas estirpes isoladas de aves foram resistentes ao ácido nalidíxico em estudos realizados nos USA (Bokanyi *et al*, 1990; Lee *et al*, 1993; NARMS, 1998), Reino Unido (Wray *et al*, 1993; Threlfall *et al*, 1993), Grécia (Arvanitidou *et al*, 1998), França (Avril *et al*, 1995) e Dinamarca (Brown *et al*, 1994; Seyfarth *et al*, 1997; Aarestrup *et al*, 1998b).

Relativamente à distribuição por serótipos, todas as nossas estirpes de *S*.Hadar (10) foram resistentes a este antimicrobiano, o que corresponde a mais de metade do total de

isolados resistentes ao ácido nalidíxico. Os outros resistentes incluem duas das três *S.*Virchow, cinco das dezasseis *S.*Enteritidis e a única *S.*Kingston.

Similarmente, na Alemanha, no estudo de Malorny *et al* (1999) a maioria das *Salmonella* resistentes ao ácido nalidíxico em aves também pertenciam ao serótipo *S.*Hadar. Além disso, a prevalência de estirpes deste serótipo resistentes a este agente aumentou, sendo de 57% nos isolados de aves dos últimos 5 anos do estudo (1994-1998). Também em França, a resistência ao ácido nalidíxico foi mais frequente em isolados humanos e animais de *S.*Hadar, salientando-se que entre os isolados de animais, particularmente aves, a prevalência de resistência a este agente aumentou de 3% em 1994 para 72% em 1997 (Breuil *et al*, 2000). Na Finlândia, a maioria das estirpes de *Salmonella* humanas resistentes às quinolonas foram dos serótipos *S.*Virchow (34%) e *S.*Hadar (18%), verificando-se uma emergência significativa de resistência a estes agentes entre 1995 e 1997, principalmente nos isolados com origem externa a esse país (Hakanen *et al*, 1999).

Por outro lado, num estudo nacional nos USA apesar de apenas 0,5% das estirpes humanas de *Salmonella* serem resistentes ao ácido nalidíxico, os serótipos mais comuns foram *S.*Typhimurium, *S.*Enteritidis e *S.*Virchow (Herikstad *et al*, 1997). Num estudo realizado em França, apenas três em 41 estirpes isoladas de animais (*S.*Virchow e *S.*Saintpaul de aves e *S.*Typhimurium de bovinos) foram resistentes ao ácido nalidíxico em 1993 (Avril *et al*, 1995). Posteriormente, noutro trabalho neste país verificou-se um incremento significativo de resistência a esse antimicrobiano, entre 1995 (8,5%) e 1996 (18,6%), para as estirpes de *S.*Typhimurium de origem humana e animal, aumentando nos isolados de aves de 7,7% em 1995 para 20% em 1996 (Heurtin-Le Corre *et al*, 1998), mas sendo inferior ao já referido para *S.*Hadar no mesmo país (Breuil *et al*, 2000).

No presente estudo, salienta-se ainda que dez isolados, incluindo sete *S.*Hadar, apresentaram resistência múltipla ao ácido nalidíxico, estreptomicina e tetraciclina, sendo um deles ainda resistente a β-lactâmicos. Este comportamento é semelhante ao descrito em isolados finlandeses de *S.*Hadar simultaneamente resistentes às quinolonas, estreptomicina e tetraciclina e, em alguns isolados, também à ampicilina (Hakanen *et al*, 1999).

Actualmente, a maioria das quinolonas são fluoradas, o que permite uma melhor actividade e um maior espectro de acção (Sousa *et al*, 1998). Assim, neste estudo foram avaliadas três **fluoroquinolonas**, duas de utilização humana, ofloxacina e ciprofloxacina, e uma de utilização veterinária, enrofloxacina. Os resultados revelaram que todas as estirpes resistentes ao ácido nalidíxico exibiram altos níveis de resistência à enrofloxacina (CMI≥2 μg/ml), apesar de se apresentarem sensíveis à ofloxacina e à ciprofloxacina.

Do mesmo modo, outros estudos em vários países indicam uma emergência de resistência às fluoroquinolonas entre *Salmonella*, sendo de notar a ausência de dados

nacionais para este grupo de antimicrobianos. Assim, no estudo de Griggs *et al* (1994), no Reino Unido, a maioria dos isolados veterinários (principalmente de frangos e perus) de vários serótipos de *Salmonella* resistentes ao ácido nalidíxico foram também resistentes às fluoroquinolonas enrofloxacina, norfloxacina, enoxacina e ofloxacina, com excepção da ciprofloxacina, embora a susceptibilidade estivesse diminuída. Já anteriormente, num estudo realizado no mesmo país, Piddock *et al* (1990) descreveram vários serótipos de *Salmonella* isolados de aves resistentes ao ácido nalidíxico que apresentaram valores de CMI para enrofloxacina acima dos limites recomendados e valores para a ciprofloxacina próximos desses limites (2 μg/ml).

Mais recentemente, na Alemanha, Malorny *et al* (1999) verificaram um aumento na incidência de estirpes de *Salmonella* isoladas de animais resistentes ao ácido nalidíxico e com susceptibilidade reduzida à enrofloxacina, após o licenciamento desta fluoroquinolona, em 1989, nesse país. Esta situação foi particularmente notória em isolados do serótipo *S*.Hadar, cujas CMIs variaram entre 0,5 e 8 μg/ml (valor máximo registado para uma estirpe isolada de aves em 1997) entre 1994 e 1998 (Malorny *et al*, 1999). Em França, os isolados animais de *S*.Hadar resistentes ao ácido nalidíxico também mostram uma reduzida susceptibilidade à fluoroquinolona ofloxacina, variando de 0% em 1994 para 13% em 1997 (Breuil *et al*, 2000). Do mesmo modo, no presente estudo, a resistência à fluoroquinolona enrofloxacina ocorreu principalmente nos isolados de *S*.Hadar (100%).

Relativamente a isolados humanos, também Breuil *et al* (2000) salientam que a incidência de *S*.Hadar está a aumentar e que a percentagem de estirpes desse serótipo com susceptibilidade reduzida às fluoroquinolonas foi, em 1997, de 15% em França. Na Finlândia, Hakanen *et al* (1999) também mostram a emergência de resistência às fluoroquinolonas em *Salmonella*, particularmente em *S*.Virchow e *S*.Hadar. Adicionalmente, no Reino Unido ocorreram aumentos substanciais na incidência de isolados humanos de *S*.Hadar e *S*.Virchow resistentes às fluoroquinolonas, mas também em *S*.Typhimurium, após o licenciamento de enrofloxacina para uso veterinário, em 1993 (Threlfall *et al*, 1997b). Neste país, a incidência de isolados humanos de *S*.Typhimurium DT104 com resistência à ciprofloxacina aumentou exponencialmente (0% em 1993 para 14% em 1996), começando também a aumentar a proporção de isolados que adicionalmente à resistência do tipo ACSSuT, também possuem resistência a essa fluoroquinolona (Threlfall *et al*, 1997a). A emergência e difusão destas estirpes com resistência adicional à ciprofloxacina parece estar associada com o licenciamento em Novembro de 1993 da fluoroquinolona enrofloxacina para uso veterinário no Reino Unido, subsequentemente usada para tratamento e profilaxia em gado e aves (Threlfall *et al*, 1997a).

Em contraste, com a situação no Reino Unido e de outros países europeus referidos, onde o aumento da prevalência de *Salmonella* resistentes às quinolonas tem sido descrito,

nos USA, os estudos nacionais raramente identificaram isolados humanos de *Salmonella* resistentes à ciprofloxacina (Herikstad *et al*, 1997; NARMS, 1999). No mesmo país, Glynn *et al* (1998) não identificaram isolados humanos de *S.*Typhimurium DT104 resistentes a esse agente, sugerindo que a diferença relativamente ao Reino Unido pode estar relacionada com o uso veterinário de fluoroquinolonas, a partir de 1995, ocorrer apenas em aves, e por S.Typhimurium DT104 ainda não ter sido isolada em aves nesse país. Também, o programa de vigilância dos USA para isolados veterinários, referente a 1998, não detectou amostras de carcaças de frangos e perus contendo *Salmonella* resistentes à ciprofloxacina (NARMS, 1998).

Assim, apesar da resistência a este grupo de antibióticos ter emergido nos últimos anos em vários países, alguns estudos revelam ainda uma baixa frequência de resistência ao ácido nalidíxico ou fluoroquinolonas entre estirpes de *Salmonella*. Na Dinamarca, Aarestrup *et al* (1998b) verificaram que todas as *Salmonella* isoladas de frangos foram sensíveis à enrofloxacina e similarmente, no mesmo país, Seyfarth *et al* (1997) verificaram que nenhuma das estirpes de *S.*Typhimurium isoladas de aves foi resistente à ciprofloxacina e à enrofloxacina, apesar desta fluoroquinolona ter sido permitida para uso veterinário nesse país. No entanto, em espécies bacterianas associadas com doença nos animais (ex. *E.coli*) os mesmos autores verificaram, mais recentemente, um aumento da resistência às fluoroquinolonas (Aarestrup *et al*, 2000). Também no Canadá, no estudo de Poppe *et al* (1995), apesar do provável uso de enrofloxacina na produção de perus, em substituição da gentamicina, nenhuma das estirpes de *Salmonella* isoladas de amostras do ambiente de exploração de perus apresentou resistência a outras fluoroquinolonas, como a ciprofloxacina, tal como no estudo dos mesmos autores relativamente a frangos e galinhas poedeiras (Poppe *et al*, 1996).

Relativamente a diferentes estudos em isolados humanos, também não foi observada resistência à ciprofloxacina em estirpes de *Salmonella* de vários serótipos, incluindo *S.*Typhimurium e *S.*Enteritidis (Seyfarth *et al*, 1997; Cormican *et al*, 1998; Grob *et al*, 1998). Em vários estudos realizados em França, algumas das estirpes humanas e animais de *Salmonella* resistentes ao ácido nalidíxico apresentaram uma sensibilidade diminuida a algumas fluoroquinolonas (Avril *et al*, 1995; Heurtin-Le Corre *et al*, 1998; Breuil *et al*, 2000), o que pode ser o primeiro passo para a selecção de estirpes mutantes com maior resistência a este grupo de agentes antimicrobianos (Heurtin-Le Corre *et al*, 1998).

Apesar das fluoroquinolonas não serem usadas como promotores de crescimento, são correntemente usadas em muitos países para tratamento e prevenção de doenças em animais (WHO, 1998). Actualmente, na Comunidade Europeia várias quinolonas, como a

enrofloxacina, danofloxacina, difloxacina e sarafloxacina, são utilizadas em medicamentos veterinários para prevenir e tratar infecções em aves (Regulamento nº 508/1999/CE).

Após a introdução desse grupo de antimicrobianos em veterinária surgiram *Salmonella* isoladas de animais com reduzida susceptibilidade às fluoroquinolonas, existindo o risco dessas estirpes infectarem o Homem (WHO, 1998; Piddock, 1998). Além disso, o uso de fluoroquinolonas em humanos parece não ter tido impacto na resistência em *Salmonella*, começando a surgir isolados de *Salmonella* com susceptibilidade diminuída às fluoroquinolonas apenas após o seu licenciamento para veterinária (Angulo *et al*, 2000).

Assim, o uso destes agentes antimicrobianos em medicina veterinária tem causado preocupação e mantém-se um assunto controverso (Tollefson, 1996; Piddock, 1998). Uma vez que as fluoroquinolonas são um importante grupo de antibióticos da medicina humana, em 1998, a OMS considerou que devia ser prestada mais atenção aos riscos associados com o seu uso como medicamento em animais (Parecer 98/C407/02). Mesmo quando as fluoroquinolonas são limitadas ao uso terapêutico em animais reconhece-se que podem facilitar a emergência de resistência, especialmente em bactérias como *Campylobacter* e *Salmonella*, transmitidas pelos alimentos (Tollefson, 1996). Por outro lado, a resistência cruzada ocorre nesta classe de antimicrobianos, de modo que a resistência a uma fluoroquinolona pode comprometer a eficácia de todas as fluoroquinolonas (Tollefson, 1996).

Em muitos países, as fluoroquinolonas são o grupo de antibióticos escolhido para o tratamento de gastroenterites no Homem (Aarestrup, 1999), sendo também utilizados com eficácia no tratamento de salmoneloses invasivas nos humanos, de modo que a emergência de resistências a estes agentes em bactérias como a *Salmonella* é preocupante (Avril *et al*, 1995; Ramos *et al*, 1996; Heurtin-Le Corre *et al*, 1998; WHO, 1998; Piddock, 1998; Hakanan *et al*, 1999; Aarestrup, 1999; Molbak *et al*, 1999; Angulo *et al*, 2000). Em situações graves, particularmente infecções com estirpes de *Salmonella* multiresistentes, o tratamento com fluoroquinolonas também é recomendado (Malorny *et al*, 1999). Assim, o aparecimento de resistência à ciprofloxacina em estirpes de S.Typhimurium DT104 multiresistentes pode levantar graves problemas terapêuticos (Threlfall *et al*, 1996; Threlfall *et al*, 1997a; Glynn *et al*, 1998). Por exemplo, em 1998, na Dinamarca, num surto causado por S.Typhimurium DT104 resistente aos 5 antibióticos (ACSSuT), ao ácido nalidíxico e com susceptibilidade diminuída às fluoroquinolonas, as infecções foram difíceis de tratar, verificando-se um efeito reduzido do tratamento com as fluoroquinolonas (Molbak *et al*, 1999).

Assim, para minimizar a emergência de resistências às quinolonas deve ser encorajado o uso prudente de fluoroquinolonas em veterinária e apenas quando houver necessidade clínica, ou seja, quando todas as outras opções falharem (Piddock, 1998; Wegener, 1999; Aarestrup *et al*, 2000; Angulo *et al*, 2000). Alguns autores (Molbak *et al*, 1999; Wegener, 1999; Angulo *et al*, 2000) propõem mesmo que as fluoroquinolonas não

devem ser licenciadas para uso em animais enquanto existirem outras alternativas, pelo menos até novas opções terapêuticas estarem disponíveis para o tratamento de infecções em humanos.

2.1.3) Resistência aos aminoglicosídeos

No presente estudo, a resistência à estreptomicina (39%) foi frequente, sendo observada em 14 estirpes. Outros estudos revelam resultados semelhantes em *Salmonella* isoladas de aves (Bokanyi *et al*, 1990; D'Aoust *et al*, 1992; Lee *et al*, 1993). Mais recentemente, nos USA, a frequência de *Salmonella* resistentes à estreptomicina foi das mais elevadas em isolados de carcaças de frango (28%) e de peru (41%) (NARMS, 1998). Em contraste, noutros estudos poucos ou nenhuns isolados de *Salmonella* apresentaram resistência à estreptomicina (Brown *et al*, 1994; Seyfarth *et al*, 1997; Aarestrup *et al*, 1998b; Arvanitidou *et al*, 1998). No entanto, a resistência a este aminoglicosídeo foi substancialmente maior nos estudos de Duffy *et al* (1999) (81,9%) e de Manie *et al* (1998) (86,4%). Os dados nacionais de 1999 relativos à resistência aos antibióticos em *Salmonella* isoladas de alimentos, sendo a maioria aves, também mostram uma elevada percentagem de resistência à estreptomicina (71,4%) (INSA, 2000). Apesar dos nossos resultados serem inferiores a estes, é de notar que a resistência a este antibiótico em *Salmonella* foi das mais frequentemente observadas.

Adicionalmente, salienta-se o facto de neste trabalho apenas uma estirpe (*S*.Anatum) ter apresentado resistência simples a este antimicrobiano, enquanto as outras treze estirpes foram todas resistentes à tetraciclina, e algumas ainda apresentaram outras associações. Assim, nas estirpes isoladas no presente estudo, a resistência à estreptomicina parece estar associada com a resistência à tetraciclina, tal como descrito por outros autores (Bokanyi *et al*, 1990; D'Aoust *et al*, 1992; Manie *et al*, 1998). Em relação aos serótipos, verificámos que a resistência a esses dois agentes foi mais proeminente entre representantes do grupo serológico C, particularmente *S*.Hadar e *S*.Virchow, enquanto a maior susceptibilidade esteve associada com isolados de *S*.Enteritidis, principal serótipo do grupo D registado, tal como ocorreu no estudo de D'Aoust *et al* (1992). Do mesmo modo, em estudos realizados em aves nos USA, a resistência à estreptomicina e à tetraciclina prevalece principalmente em *S*.Hadar (Bokanyi *et al*, 1990; NARMS, 1998), sendo inexistente em *S*.Enteritidis (NARMS, 1998). No mesmo país, pelos dados do NARMS (1999) para isolados humanos, a resistência à estreptomicina foi também mais frequente entre 1996 e 1999 nos isolados de *S*.Hadar, ocorrendo em grande parte dessas estirpes resistência simultânea à tetraciclina. No estudo de Threlfall *et al* (1993) verifica-se que a resistência a estes dois agentes foi mais frequente em *S*.Typhimurium do que em *S*.Enteritidis e *S*.Virchow isoladas de aves. Do

mesmo modo em isolados humanos, vários estudos mostram que a resistência ao grupo dos aminoglicosídeos é mais baixa em *S.*Enteritidis do que noutros serótipos, particularmente em S.Typhimurium (Threlfall *et al*, 1993; Brown *et al*, 1994; Seyfarth *et al*, 1997; Threlfall *et al*, 1997b; Cormican *et al*, 1998). Por exemplo, no Reino Unido, a estirpe predominante de *S.*Typhimurium, isto é, DT104, apresentou mesmo aumentos substanciais de resistência à estreptomicina nos últimos anos (Threlfall *et al*, 1997a).

Os resultados obtidos não foram totalmente inesperados dado o uso extensivo de alguns aminoglicosídeos na criação de animais. Segundo a legislação da Comunidade Europeia (Regulamento nº 508/1999/CE) vários aminoglicosídeos, como estreptomicina, neomicina, espectinomicina e aminosidina, são permitidos em medicamentos para uso em aves, sendo excepção a gentamicina e apramicina permitidas apenas para bovinos e suínos.

No presente trabalho, para além da resistência à estreptomicina só se registou resistência a mais um aminoglicosídeo. A estirpe de *S.*Blockley, isolada de uma amostra de peru, apresentou resistência à canamicina simultaneamente com a resistência à estreptomicina e à tetraciclina, não havendo registos de resistência para gentamicina, netilmicina e tobramicina em nenhum dos isolados.

Em contraste, no Canadá, Poppe *et al* (1995) verificaram que um grande número de estirpes de *Salmonella* do ambiente de exploração de perus foram resistentes a vários aminoglicosídeos, como canamicina (27,7%), gentamicina (25,8%) e neomicina (14,2%). A ocorrência simultânea de resistência a dois ou três agentes deste grupo é explicada pelo facto da resistência a um dos aminoglicosídeos poder resultar em resistência cruzada a outros agentes deste grupo de antibióticos (Poppe *et al*, 1995). Assim, Lee *et al* (1993) ao verificarem que 10% das estirpes de S.Enteritidis isoladas de frangos, nos USA, eram resistentes à gentamicina sugeriram que embora este aminoglicosídeo não seja aprovado como aditivo de rações, a exposição a outros agentes deste grupo pode ter seleccionado para resistência à gentamicina.

Adicionalmente, sendo nesse país, a gentamicina usada frequentemente para prevenção de infecções através de injecção nos ovos de frangos e perus, a prevalência de resistência à gentamicina foi elevada em *Salmonella* isoladas de frangos (18%) e perus (17%) (Marano *et al*, 1999), tal como registado pelo NARMS em 1998 para carcaças de frangos (16%) e perus (18%). Poppe *et al* (1995) também referem que o elevado número de estirpes de *Salmonella* resistentes à gentamicina em perus no Canadá é provavelmente resultante do uso deste agente na produção desses animais. No entanto, nesse país, a resistência a aminoglicosídeos foi baixa nos isolados dos bandos de poedeiras e de frangos (Poppe *et al*, 1996). Na Europa, em contraste, a gentamicina não é utilizada em aves, de tal modo que no estudo de Hollinger *et al* (1999) não foi inesperado o baixo isolamento de

*S.*Typhimurium resistentes a este antimicrobiano em aves e humanos na Dinamarca, e mais elevado no mesmo tipo de isolados nos USA, reflectindo as práticas de uso de gentamicina em aves neste país. No mesmo estudo (Hollinger *et al*, 1999) os resultados relativos ao aminoglicosídeo estreptomicina mostram que é comum o uso deste agente na produção animal nos dois países.

Também os dados nacionais de 1999 para isolados de alimentos, sendo a maioria aves, revelam uma frequência de resistência à gentamicina baixa (4,8%) relativamente à estreptomicina (71,4%), tal como em isolados humanos provenientes de toxinfecções alimentares, onde a incidência de resistência à estreptomicina foi de 63,2% e à gentamicina de 9,8% (INSA, 2000). Nos USA, em 1999, a resistência à estreptomicina (17%) foi das principais resistências, enquanto baixas frequências foram registadas para gentamicina (2%) (NARMS, 1999). No entanto, salienta-se que neste país a incidência de resistência à gentamicina foi mais elevada em isolados humanos pertencentes a serótipos associados com aves (ex. 19% em S.Heidelberg e 4% em S.Enteritidis), reflectindo o uso difundido deste agente em aves nos USA (Marano *et al*, 1999).

A prevalência de resistência aos aminoglicosídeos, nomeadamente estreptomicina e gentamicina, em humanos e animais de consumo reflecte o uso destes agentes na produção animal. Assim, para evitar as consequências adversas para a saúde humana, são necessárias intervenções para limitar o uso de antimicrobianos em animais, para a gentamicina continuar a poder ser usada no tratamento de várias infecções humanas causadas por Gram negativos (Hollinger *et al*, 1999; Marano *et al*, 1999).

2.1.4) Resistência às tetraciclinas

No presente estudo, a resistência a esta família de antibióticos também foi frequente entre os isolados de *Salmonella* (36%), sendo 13 os isolados resistentes a este agente. Outros registos de resistência à tetraciclina em *Salmonella* isoladas de aves são similares aos do presente trabalho (Bokanyi *et al*, 1990; D'Aoust *et al*, 1992; Lee *et al*, 1993). Mais recentemente, dados do programa de vigilância dos USA, mostram que uma das resistências mais comuns em isolados de aves tem sido à tetraciclina (Tollefson *et al*, 1998; NARMS, 1998), sendo no relatório de 1998 de 21% em carcaças de frango e de 46% de peru (NARMS, 1998). Poppe *et al* (1995), também detectaram um número considerável de estirpes resistentes à tetraciclina (38,1%) em amostras ambientais de explorações de perus, sugerindo que esta resistência se devia ao uso de tetraciclina no tratamento e prevenção de infecções por *Salmonella* nesses animais. Num estudo dos mesmos autores a resistência à tetraciclina foi mais baixa nos isolados dos bandos de poedeiras e de frangos, apesar de também ser usada em pintos (Poppe *et al*, 1996).

Em contraste, noutros estudos, poucos ou nenhuns isolados foram registados com resistência a este agente antimicrobiano (Brown *et al*, 1994; Seyfarth *et al*, 1997; Aarestrup *et al*, 1998b; Arvanitidou *et al*, 1998). No entanto, a resistência à tetraciclina foi substancialmente maior nos estudos de Duffy et al (1999) e de Manie *et al* (1998), com 57,3% e 96,6%, respectivamente, de estirpes resistentes. Em Portugal, a resistência à tetraciclina foi a mais frequente (72,6%) entre *Salmonella* isoladas de alimentos, principalmente aves, segundo os dados nacionais relativos a 1999 (INSA, 2000). Apesar de não ser a resistência mais detectada entre as estirpes de *Salmonella* isoladas no presente estudo, e da incidência ser inferior aos dados nacionais, salienta-se que foi a terceira resistência.

Sendo a tetraciclina (activa contra bactérias Gram negativo e Gram positivo) o antibiótico mais frequentemente usado na produção animal em alguns países, estes resultados não foram inesperados também para este grupo. Nos USA e Canadá, ainda é permitida a utilização de alimentos para animais, nomeadamente aves, contendo tetraciclinas em doses subterapêuticas como promotor de crescimento (Van den Bogaard e Stobberingh, 1999; Mlot, 2000), enquanto na Europa, estes agentes foram incorporados nas rações para animais como promotores de crescimento só até aos anos 70. Actualmente, na Comunidade Europeia, várias tetraciclinas (clortetraciclina, doxiciclina, oxitetraciclina e tetraciclina) são apenas permitidas em medicamentos para aves, estando definidos os limites máximos de resíduos em alimentos de origem animal (Regulamento nº 508/1999/CE).

No presente estudo, a resistência à tetraciclina parece estar associada com a resistência à estreptomicina, pois todas as nossas estirpes (13) resistentes à tetraciclina foram também resistentes à estreptomicina, tal como no estudo de Bokanyi *et al* (1990). Manie *et al* (1998) também verificaram que uma grande proporção de *Salmonella* (81,3%) foram simultaneamente resistentes a estes dois agentes. No estudo de D'Aoust *et al* (1992) dos 27 padrões de resistência encontrados, 25 incluíam a resistência à estreptomicina e/ou tetraciclina e a resistência a estes dois agentes estava associada em 15. Esta elevada prevalência de resistência à estreptomicina e tetraciclina, nomeadamente em isolados de aves, mostra o impacto potencial do uso de rações com doses baixas de antibióticos na selecção de populações microbianas resistentes nos animais, para além de mostrar que o uso de um só antimicrobiano pode seleccionar estirpes com múltiplas resistências (D'Aoust *et al*, 1992).

Adicionalmente, no presente estudo, das 13 estirpes resistentes, onze são do grupo C, particularmente *S*.Hadar e *S*.Virchow, e duas do grupo B, não sendo nenhuma do principal serótipo isolado, *S*.Enteritidis, pertencente ao grupo D. Já D'Aoust *et al* (1992) verificaram que a resistência à tetraciclina e à estreptomicina era mais proeminente entre os

grupos B, C e G, enquanto a maior susceptibilidade estava associada com grupos D e E. Do mesmo modo, em estudos realizados em aves, a resistência a esses dois agentes prevalece principalmente em *S*.Hadar e em *S*.Typhimurium, sendo baixa ou inexistente em *S*.Enteritidis (Bokanyi *et al*, 1990; Threlfall *et al*, 1993; Wray *et al*, 1993; NARMS, 1998; Tollefson *et al*, 1998). Por outro lado, Nair *et al* (1995) detectaram uma elevada percentagem de *S*.Enteritidis isoladas de frangos (81%) resistentes à tetraciclina e β-lactâmicos, em contraste com o nosso estudo em que nenhuma *S*.Enteritidis foi resistente à tetraciclina.

Tal como verificado em alimentos, em Portugal, em 1999, a resistência à tetraciclina também foi das resistências mais frequentes em *Salmonella* de origem humana, como demonstram os 61,7% de estirpes resistentes (INSA, 2000). Nos USA, os dados de 1999 indicam que a resistência à tetraciclina foi a mais frequente (19%), entre os isolados clínicos de *Salmonella* (NARMS, 1999), tal como verificado em anos anteriores no mesmo país (Lee *et al*, 1994; Tollefson *et al*, 1998). Em isolados humanos também se verificam diferenças na incidência de resistência à tetraciclina consoante o serótipo de *Salmonella*. Assim, foi detectada reduzida incidência de *S*.Enteritidis resistentes à tetraciclina comparativamente com outros serótipos, nomeadamente *S*.Typhimurium, *S*.Virchow e *S*.Hadar, em vários estudos (Threlfall *et al*, 1993; Brown *et al*, 1994; Ramos *et al*, 1996; Seyfarth *et al*, 1997; Threlfall *et al*, 1997b; Cormican *et al*, 1998; Grob *et al*, 1998). Relativamente a S.Typhimurium DT104, a frequência de isolados com resistência à tetraciclina aumentou substancialmente no Reino Unido entre 1990 e 1996 (Threlfall *et al*, 1997a). Nos USA, a resistência à tetraciclina também é frequente entre os isolados humanos de S.Typhimurium, mas está associada principalmente com estirpes de S.Hadar, ocorrendo nestas simultaneamente resistência à estreptomicina (NARMS, 1999).

A ocorrência frequente de resistência à tetraciclina em isolados de *Salmonella* de todas as origens é provavelmente uma consequência da sua elevada utilização em produção animal, e sugere que as estirpes resistentes resultantes dessa situação sejam subsequentemente transmitidas ao Homem, através da cadeia alimentar.

2.1.5) Resistência aos β-lactâmicos

A resistência aos antibióticos β-lactâmicos do grupo das **penicilinas** (amoxicilina, carbenicilina e piperacilina) foi frequente, ocorrendo em 19% das estirpes (7) de *Salmonella* isoladas. A prevalência foi similar à encontrada noutros trabalhos realizados em amostras de aves (Campos e Hofer, 1989; Poppe *et al*, 1995; Arvanitidou *et al*; 1998). Segundo Poppe *et al* (1995), a utilização de β-lactâmicos na prevenção e tratamento de infecções por

Salmonella em perus pode ser a responsável pelas resistências detectadas. Recentemente, dados do programa de vigilância nos USA, também mostram que a incidência de resistência à ampicilina foi frequente em *Salmonella* isoladas de frangos (14%) e de perus (7%) (Tollefson *et al*, 1998), e no relatório de 1998 realizado em carcaças de aves verificou-se que 13% dos isolados de frangos e 10% dos isolados de perus eram resistentes a esse agente (NARMS, 1998). Em Portugal, os dados de 1999 indicam que 30,2% das *Salmonella* isoladas de alimentos, sendo a maioria de aves, apresentaram resistência à ampicilina (INSA, 2000). Em contraste, porém, baixos níveis de resistência a antibióticos do grupo das penicilinas em estirpes de *Salmonella* isoladas de aves foram observados por outros autores (Bokanyi *et al*, 1990; D'Aoust *et al*, 1992; Poppe *et al*, 1996; Seyfarth *et al*, 1997; Aarestrup *et al*, 1998b; Duffy *et al*, 1999).

No presente estudo, a resistência observada aos β-lactâmicos testados (7 estirpes) está associada principalmente com o serótipo S.Enteritidis (4 estirpes), sendo a única resistência manifestada por esses isolados, enquanto duas estirpes de outros serótipos apresentam também resistência a outros grupos de antimicrobianos. Similarmente, os dados do NARMS (1998) nos USA indicam que em S.Enteritidis isoladas de frangos, a única resistência detectada foi a antibióticos β-lactâmicos, principalmente à ampicilina (18%). Nesse país, estudos anteriores realizados em aves mostram que a resistência às aminopenicilinas foi bastante frequente em isolados desse serótipo (cerca de 80%), sendo a única resistência na maior parte dos isolados de Lee *et al* (1993) e associada a outros agentes, nomeadamente tetraciclina, no estudo de Nair *et al* (1995). Na Grécia, a resistência à ampicilina também foi das mais detectadas, nomeadamente em isolados de animais, principalmente aves, (63,6%), e de alimentos, principalmente frango, (37,5%), e uma proporção substancial de S.Enteritidis apresentava, em simultâneo, resistência a outros grupos de antibióticos (Tassios *et al*, 1997).

Actualmente, nalguns países ainda é permitida a adição aos alimentos para animais, nomeadamente aves, de penicilinas em doses subterapêuticas (Mlot, 2000). Na Europa, alguns β-lactâmicos, incluindo amoxicilina e ampicilina, embora já não se utilizem como promotores de crescimento, continuam a ser usados para tratamento de todas as espécies animais destinadas à produção de alimentos, incluindo as aves (Regulamento nº 508/1999/CE). No entanto, é de salientar que alguns β-lactâmicos como as cefalosporinas e a amoxicilina associada ao ácido clavulânico não são permitidos em aves, mas apenas em gado (Regulamento nº 508/1999/CE).

Assim, relativamente aos outros agentes antimicrobianos do grupo dos β-lactâmicos que foram testados, nomeadamente a associação **amoxicilina/ácido clavulânico** e **cefalosporinas**, não foram isoladas estirpes resistentes. Noutros estudos semelhantes, em

vários países da Europa, USA e Canadá, também poucas ou nenhumas estirpes de *Salmonella* resistentes a esses agentes antimicrobianos foram registadas (D'Aoust *et al*, 1992; Lee *et al*, 1993; Poppe *et al*, 1995; Poppe *et al*, 1996; Seyfarth *et al*, 1997, Arvanitidou *et al*; 1998; Duffy *et al*, 1999; Hakanen *et al*, 1999). No nosso estudo a resistência entre os antibióticos β-lactâmicos testados não atingiu as cefalosporinas, e a associação de inibidores de β-lactamases (ác. clavulânico) restaurou a actividade da amoxicilina. Embora este facto pudesse ser explicado por na terapêutica de aves apenas ser permitido o uso de penicilinas, os dados nacionais, referentes a 1999, de resistências a antibióticos em *Salmonella* isoladas de alimentos, principalmente de aves, mostram uma elevada percentagem de resistência à amoxicilina/ácido clavulânico (23,8%) e a várias cefalosporinas, incluindo às da 3ª geração, como a cefotaxima (4,9%), para além da ampicilina (INSA, 2000), o que poderá indiciar a utilização indevida de outros antibióticos β-lactâmicos.

Já nos USA, o relatório do NARMS (1998) salienta que a resistência às cefalosporinas tem aumentado, nomeadamente a resistência à cefalotina e à ceftriaxona em isolados de frangos, sendo em 1998 de 4,4% e 0,5%, respectivamente e nos mesmos isolados de 2% em relação à amoxicilina/ácido clavulânico. Também num estudo realizado nos USA, Nair *et al* (1995) observaram um grande número de estirpes de *S*.Enteritidis não humanas, nomeadamente de frangos, resistentes aos antibióticos β-lactâmicos, incluindo à cefalotina (66%) e cefotaxima (15%).

A resistência às penicilinas representa um problema adicional, para além das preocupações em veterinária e da indústria alimentar, uma vez que registos de vários países mostram o aumento de resistência aos β-lactâmicos, nomeadamente aminopenicilinas, envolvendo vários serótipos de *Salmonella* isolados de humanos (Threlfall *et al*, 1993; Lee *et al*, 1994; Vatopoulos *et al*, 1994; Ramos *et al*, 1996; Tassios *et al*, 1997; Threlfall *et al*, 1997b; Llanes *et al*, 1999; Breuil *et al*, 2000). Além disso, em alguns estudos verificam-se diferenças entre os principais serótipos, sendo *S*.Enteritidis menos resistente, apesar da resistência a β-lactâmicos ser das mais registadas entre isolados desse serótipo, tal como verificado para os isolados animais (Ramos *et al*, 1996; Threlfall *et al*, 1997b; NARMS, 1999; Breuil *et al*, 2000). No estudo de Threlfall *et al* (1997b), no Reino Unido, é de notar o aumento da incidência de resistência a ampicilina em isolados humanos de *S*.Typimurium, *S*.Virchow e de *S*.Hadar, com excepção de S.Enteritidis. Neste país, a percentagem de *S*.Typhimurium DT104 com resistência à ampicilina aumentou substancialmente entre 1990 e 1996 (Threlfall *et al*, 1997a). Além disso, em estirpes de *S*.Typhimurium a resistência à ampicilina tem estado associada a outros agentes, nomeadamente cloranfenicol,

estreptomicina, sulfonamidas e tetraciclina (Threlfall *et al*, 1997a; Brisabois *et al*, 1997; Cormican *et al*, 1998).

Em Portugal, os dados de 1999 relativos a *Salmonella* de origem humana mostram que 54,4% eram resistentes à ampicilina, sendo também elevada a percentagem de resistência à amoxicilina/ácido clavulânico (42,1%) e a várias cefalosporinas, observando-se resistência às cefalosporinas de 3ª geração em 16,6% dos isolados humanos (INSA, 2000). Desde 1991 que têm sido registados noutros países estirpes humanas de *Salmonella* resistentes às cefalosporinas de espectro alargado, ocorrendo contudo numa reduzida prevalência (Fey *et al*, 2000). Por exemplo, num estudo entre 1990 e 1998 no sul de Itália foram identificadas 6 estirpes humanas de S.Enteritidis resistentes a vários antibióticos β-lactâmicos, incluindo cefalosporinas de 3ª geração (Nastari *et al*, 2000). Também nos USA, o relatório do NARMS (1999) referente a isolados humanos salienta que a percentagem de isolados de *Salmonella* não *S.*Typhi com sensibilidade reduzida à ceftriaxona aumentou de 0,1% em 1996 para 2% em 1999, sendo neste último ano registados 0,4% de isolados resistentes a essa cefalosporina. Nesse país, vários autores têm salientado a emergência de infecções por estirpes de *Salmonella*, principalmente *S.*Typhimurium, resistentes à ceftriaxona adquiridas a nível local (Dunne *et al*, 2000; Fey *et al*, 2000). Uma vez que existe resistência cruzada entre a única cefalosporina (ceftiofur) aprovada nos USA para uso sistémico nos animais de produção, incluindo frangos e perus, e que estes animais são a principal fonte de infecções por *Salmonella*, o uso de ceftiofur nos animais poderá estar a contribuir para a disseminação de estirpes de *Salmonella* resistentes à ceftriaxona que são transmitidas aos consumidores através da cadeia alimentar (Dunne *et al*, 2000). Assim, pode ser indicada a limitação do uso de cefalosporinas de espectro alargado nos animais de produção, particularmente se tais resistências aumentarem (Dunne *et al*, 2000).

A existência de resistências a esta família de antibióticos em estirpes de *Salmonella* é preocupante, pois a selecção de agentes antimicrobianos para o tratamento de infecções fica restringida. No passado, a ampicilina, juntamente com o cloranfenicol e o trimetoprim/sulfametoxazol, foram dos agentes antimicrobianos mais usados no tratamento da salmonelose (Campos e Hofer, 1989; Duffy *et al*, 1999; D'Aoust *et al*, 1992; Lee *et al*, 1994; Ramos *et al*, 1996; Angulo *et al*, 2000), no entanto o aparecimento de resistência a esses agentes implicou o recurso a outros, como as fluoroquinolonas e as cefalosporinas de 3ª geração, agora as mais utilizadas em adultos e crianças, respectivamente (Angulo *et al*, 2000). Com efeito, actualmente, as cefalosporinas de 3ª geração são frequentemente usadas no tratamento de infecções como as salmoneloses invasivas, principalmente em crianças, devido às suas propriedades farmacológicas e à baixa prevalência de resistências a esses agentes (Angulo *et al*, 2000; Dunne *et al*, 2000; Fey *et al*, 2000). Se as estirpes de *Salmonella* desenvolverem resistência a fluoroquinolonas e a cefalosporinas, como está a

acontecer com a emergência e disseminação de estirpes resistentes à ceftriaxona nos USA, restam poucas alternativas disponíveis, o que pode ter consequências graves para a saúde humana (Angulo *et al*, 2000; Dunne *et al*, 2000).

2.1.5.1) Estudo de mecanismos de resistência

Os determinantes genéticos de resistência aos antimicrobianos são codificados no cromossoma bacteriano ou em plasmídeos (D'Aoust, 1997). A resistência a alguns antimicrobianos em *Enterobacteriaceae* é frequentemente mediada por plasmídeos, sendo as bactérias do género *Salmonella* as que mais frequentemente transportam esses plasmídeos (plasmídeos R) (Poppe *et al*, 1995; Poppe *et al*, 1996). A propensão para a transferência de plasmídeos, por exemplo por conjugação, pode assim favorecer a emergência e difusão de *Salmonella*, veiculadas por alimentos, resistentes a um ou mais agentes antimicrobianos, incluindo aos usados em terapêutica humana (D'Aoust, 1997).

Um dos factores que contribui para o aumento das resistências é a presença dos genes que as determinam em elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposões, capazes de se disseminarem para outras bactérias. Esta situação em bactérias isoladas de aves, como a *Salmonella*, propicia a sua transferência para bactérias do mesmo género, ou para bactérias de géneros diferentes, existentes no ambiente de produção desses animais. Assim, fomos estudar a associação a plasmídeos da resistência aos β-lactâmicos e a possibilidade da sua transferência genética por conjugação.

Em todas as estirpes (7) que se apresentaram resistentes às penicilinas, sensíveis à associação amoxicilina/ácido clavulânico e às cefalosporinas foi detectada a presença de β-lactamases de pI 5.4, um comportamento característico de TEM-1. Para além do ponto isoeléctrico, como a prova de sinergismo, entre amoxicilina/ácido clavulânico e ceftazidima, não revelou a presença de β-lactamases de espectro alargado, foi possível classificar as β-lactamases encontradas como TEM-1. Esta situação era previsível, uma vez que a produção de β-lactamases constitui o principal determinante de resistência aos antibióticos β-lactâmicos em *Enterobacteriaceae*, e as cefalosporinas e inibidores das β-lactamases (ex. ácido clavulânico) associados a penicilinas hidrolisáveis (ex. amoxicilina) escapam à acção hidrolítica das β-lactamases plasmídicas clássicas, como a TEM-1 (Sousa *et al*, 1998).

Por outro lado, das seis estirpes ensaiadas, o facto de cinco das estirpes resistentes à amoxicilina terem transferido por conjugação a β-lactamase TEM-1, sugere que, nessas estirpes, a resistência à amoxicilina é mediada por plasmídeos. De um modo geral as β-lactamases codificadas por genes plasmídicos são do tipo penicilinase, enquanto as β-lactamases cromossómicas são do tipo cefalosporinase (Sousa *et al*, 1998). Também,

noutros estudos realizados com *Salmonella*, todas ou quase todas as estirpes resistentes a penicilinas transferiram facilmente por conjugação a resistência a β-lactâmicos, por codificação em plasmídeos conjugativos da β-lactamase TEM-1 (Rivera *et al*, 1991; Vatopoulos *et al*, 1994; Tassios *et al*, 1997; Arvanitidou *et al*, 1998; Llanes *et al*, 1999).

Salienta-se que a estirpe que não transferiu por conjugação a resistência aos β-lactâmicos, apesar de possuir a β-lactamase TEM-1, apresentava resistência a outros agentes antimicrobianos, como estreptomicina, tetraciclina, cloranfenicol e trimetoprim/sulfametoxazol, para além das penicilinas. Do mesmo modo, Rivera *et al* (1991) verificaram que estirpes com o perfil de resistência semelhante ao nosso também não transferiram, por conjugação, os seus determinantes de resistência aos β-lactâmicos, identificados nessas estirpes como β-lactamases TEM-2. Segundo Tassios *et al* (1997), nas estirpes que não transferem a resistência às penicilinas por conjugação, a resistência deve residir ou no cromossoma ou num plasmídeo não conjugativo. Do mesmo modo, nos isolados de *S.*Typhimurium DT104 com resistência múltipla do tipo ACSSuT, similar à detectada na nossa estirpe, foi demonstrado que os genes de resistência estão localizados no cromossoma (Threlfall *et al*, 1996; Threlfall *et al*, 1997a).

Para além de β-lactamases do tipo TEM-1, outras β-lactamases, que determinam resistência às penicilinas e não às cefalosporinas de espectro alargado, têm sido descritas em estirpes de *Salmonella*, tais como TEM-2, PSE-1, OXA-1, OXA-2, CARB (Brisabois *et al*, 1997; Llanes *et al*, 1999). Além disso, também já foram registadas estirpes de *Salmonella* produtoras de β-lactamases de espectro alargado que determinam resistência a cefalosporinas de 3ª geração, como por exemplo dos tipos CTX-M (CTX-M2), TEM (TEM-3, TEM-25, TEM-27), SHV (SHV-2, SHV-5), sendo a sua produção normalmente codificada por plasmídeos (Shannon e French, 1998). Adicionalmente, no caso referido por Fey *et al* (2000) da infecção com uma estirpe de *Salmonella* resistente à ceftriaxona verificou-se que a β-lactamase que conferia resistência a essa e outras cefalosporinas de espectro alargado não foi inibida pelo ácido clavulânico, sendo depois classificada como β-lactamase do tipo AmpC plasmídica (CMY-2). Nos USA, a maioria dos isolados humanos de *Salmonella* resistentes a ceftriaxona, registados pelo NARMS, também apresentaram em comum β-lactamases do tipo AmpC codificadas por plasmídeos (Dunne *et al*, 2000).

A identificação em estirpes de *Salmonella* de β-lactamases codificadas por plasmídeos, nomeadamente das que conferem resistência a cefalosporinas de 3ª geração, usadas no tratamento de salmoneloses, sugere que a emergência de resistência a este grupo de antibióticos está facilitada e que as estirpes de *Salmonella* podem facilmente adquirir e transferir genes de resistência que codificam β-lactamases.

Assim, a transferência de *Salmonella* resistentes dos animais para o Homem é um grave problema de saúde pública, não só devido aos consequentes problemas na terapêutica, mas também devido ao risco de difusão de resistência para microrganismos intestinais, incluindo a população normal, através de plasmídeos (Tassios *et al*, 1997). Balis *et al* (1996) demonstraram em *Escherichia coli* entéricas da população normal e em S.Enteritidis, resistentes à ampicilina, isoladas de dois doentes, a presença de plasmídeos R conjugativos similares, o que corrobora a hipótese de transferência *in vivo* de genes de resistência entre *Salmonella* e *E.coli* e consequentemente, do possível papel de reservatório de genes de resistência exercido pela população normal. O potencial da população microbiana normal causar infecções endógenas ou transferir os seus determinantes de resistência a outros patogénicos ilustra a importância para a saúde pública da transferência de genes de resistência entre bactérias de origem animal e humana (Balis *et al*, 1996).

2.1.6) Resistência ao cloranfenicol

No presente estudo apenas foi isolada, de uma amostra de peru, uma estirpe de *Salmonella* (*S*.Saintpaul) resistente ao cloranfenicol. Noutros trabalhos semelhantes realizados em vários países em aves, todas ou quase todas as estirpes de *Salmonella* também foram susceptíveis ao cloranfenicol (Bokanyi *et al*, 1990; D'Aoust *et al*, 1992; Lee *et al*, 1993; Threlfall *et al*, 1993; Wray *et al*, 1993; Brown *et al*, 1994; Nair *et al*, 1995; Poppe *et al*, 1995; Poppe *et al*, 1996; Seyfarth *et al*, 1997; Aarestrup *et al*, 1998b; NARMS, 1998; Duffy *et al*, 1999). No entanto, pelos dados do programa de vigilância americano de 1998, a incidência de resistência a este agente em isolados de frango e peru apresenta-se mais elevada em determinados serótipos de *Salmonella*, nomeadamente *S*.Typhimurium (NARMS, 1998). Em Portugal, em 1999, apesar da percentagem de resistência ao cloranfenicol em *Salmonella* isoladas de alimentos, sendo a maioria aves, não ser das mais elevadas relativamente a outros agentes antimicrobianos testados, foi de 19,4% (INSA, 2000).

Os resultados apresentados pela maioria dos estudos estão de acordo com o facto do cloranfenicol não ser permitido como medicamento para tratamento e prevenção de infecções em animais, em países europeus (Regulamento nº 508/1999/CE) e noutros, como o Canadá (Poppe *et al*, 1995). No entanto, um agente do mesmo grupo, florfenicol, está autorizado em animais, incluindo aves (Regulamento nº 508/1999/CE). Bolton *et al* (1999) descreveram um gene em *Salmonella* que confere resistência cruzada ao florfenicol e ao cloranfenicol, de modo que o uso de florfenicol pode comprometer também o uso de cloranfenicol.

Relativamente a isolados humanos, em Portugal, em 1999, verificou-se que 29% de isolados humanos de *Salmonella* eram resistentes ao cloranfenicol (INSA, 2000). Nos USA, em 1999 foram registados 9% de isolados de *Salmonella* com resistência a esse agente, e 8% ao florfenicol (NARMS, 1999), incidência essa superior à de estudos anteriores (4%) (Lee *et al*, 1994). Como já verificado para outros agentes antimicrobianos e para os isolados de aves referidos acima, a incidência de estirpes de *S*.Enteritidis resistentes ao cloranfenicol apresenta-se mais baixa do que noutros serótipos isolados de humanos, nomeadamente *S*.Typhimurium, de acordo com os dados de vários estudos (Brown *et al*, 1994; Nair *et al*, 1995; Ramos *et al*, 1996; Seyfarth *et al*, 1997; Cormican *et al*, 1998; NARMS, 1999). No Reino Unido, o aumento no número de isolados humanos de *S*.Typhimurium DT104, foi acompanhado por aumentos substanciais de resistência a alguns antibióticos, incluindo ao cloranfenicol (32% em 1990 para 94% em 1996) (Threlfall *et al*, 1997a). Além disso, o padrão de resistência mais comum no Reino Unido desde 1990, nos isolados de *S*.Typhimurium DT104, é o fenótipo de multiresistência ACSSuT (Threlfall *et al*, 1996; Threlfall *et al*, 1997a), semelhante ao detectado nesta nossa única estirpe resistente ao cloranfenicol (*S*.Saintpaul). Num estudo na Irlanda, também foram isoladas estirpes de *Salmonella* com este perfil de resistência, nomeadamente em 73% das *S*.Typhimurium, mas também em duas estirpes de outros dois serótipos (*S*.Derby e *S*.Hadar) (Cormican *et al*, 1998).

Embora a resistência ao cloranfenicol não seja elevada em estirpes de *Salmonella* isoladas de aves, a emergência de estirpes resistentes de *S*.Typhimurium em humanos é preocupante. O cloranfenicol é um dos agentes antimicrobianos que pode ser utilizado no tratamento da salmonelose (Campos e Hofer, 1989; D'Aoust *et al*, 1992; Lee *et al*, 1994; Ramos *et al*, 1996; Duffy *et al*, 1999), apesar de já não ser um dos mais utilizados actualmente (Angulo *et al*, 2000).

2.1.7) Resistência ao trimetoprim/sulfametoxazol

Neste estudo, a resistência ao trimetoprim/sulfametoxazol (SXT) só foi observada na única *S*.Saintpaul isolada, que apresenta um nível elevado de resistência (CMI>256μg/ml). Tal como ocorreu no nosso estudo, noutros trabalhos também foi registada uma reduzida ou nula incidência de resistência a este agente em isolados de aves (D'Aoust *et al*, 1992; Lee *et al*, 1993; Threlfall *et al*, 1993; Wray *et al*, 1993; Nair *et al*, 1995; Poppe *et al*, 1995; Poppe *et al*, 1996; Seyfarth *et al*, 1997; NARMS, 1998). No entanto, os dados nacionais de 1999 indicam que 14,3% das *Salmonella* isoladas de alimentos, principalmente aves, foram resistentes ao SXT (INSA, 2000). Apesar destes resultados serem mais elevados do que os observados no presente estudo, é de salientar que, tal como no nosso trabalho, a

resistência a este agente antimicrobiano foi das menos frequentes entre os isolados de *Salmonella* estudados a nível nacional.

Por outro lado, em alguns estudos verificou-se uma maior percentagem de resistência a sulfonamidas do que ao trimetoprim em isolados de *Salmonella* (Threlfall *et al*, 1993; Aarestrup *et al*, 1998b; Duffy *et al*, 1999). Por exemplo, nos USA, os dados do NARMS (1998) para isolados veterinários mostram uma prevalência de resistência ao sulfametoxazol bastante superior relativamente à associação desse agente com o trimetoprim em isolados de carcaças de frango (24% e 0,5%, respectivamente) e de peru (32% e 2,5%, respectivamente). Adicionalmente, a resistência ao sulfametoxazol foi comum a todos os serótipos isolados de aves, com excepção de *S*.Enteritidis, mas em relação ao SXT a resistência foi reduzida ou nula para os isolados de todos os serótipos (NARMS, 1998).

Na Europa, as sulfonamidas estão autorizadas como medicamento para tratamento e prevenção de infecções em todas as espécies destinadas a produção animal, tal como o trimetoprim também está autorizado em aves (Regulamento nº 508/1999/CE). Assim, os resultados obtidos para estes dois agentes em separado e associados podem estar relacionados com o facto das sulfonamidas serem geralmente muito mais utilizadas na produção animal.

Também em isolados humanos, em 1999, os dados de resistência ao SXT foram em Portugal mais elevados (7,8%) (INSA, 2000) do que nos USA (2%) (NARMS, 1999), apesar de neste país já serem superiores relativamente a estudos anteriores (Lee *et al*, 1994). Em alguns estudos verifica-se ainda que a incidência de estirpes de *S*.Enteritidis resistentes ao SXT é baixa ou mesmo nula, o que já não acontece com outros serótipos (Nair *et al*, 1995; Cormican *et al*, 1998; NARMS, 1999). Num estudo na Dinamarca, Seyfarth *et al* (1997) verificaram que a resistência às sulfonamidas foi uma das mais frequentes entre isolados humanos de S.Typhimurium (12%), mas relativamente ao SXT os valores foram mais baixos (4%).

No entanto, no Reino Unido tem ocorrido um aumento no número de isolados humanos de *S*.Typhimurium DT104 resistentes ao trimetoprim (0,4% em 1990 para 24% em 1996), verificando-se também um aumento destas estirpes que, adicionalmente à resistência do tipo ACSSuT, também possuem resistência ao trimetoprim (Threlfall *et al*, 1996; Threlfall *et al*, 1997a). O aparecimento de resistência ao trimetoprim neste fagotipo pode ter resultado da sua utilização terapêutica em gado infectado com *S*.Typhimurium DT104 resistente a ACSSuT (Threlfall *et al*, 1996). Em comum com estas estirpes isoladas no Reino Unido, verificou-se resistência ao trimetoprim entre vários serótipos de *Salmonella*, incluindo S.Typhimurium com fenótipo do tipo ACSSuT num estudo realizado na Irlanda (Cormican *et al*, 1998). Salienta-se que a nossa única estirpe resistente ao SXT, apesar de

não ser do serótipo S.Typhimurium, apresenta também esse padrão de multiresistência (ACSSuT).

Embora com incidência baixa, a resistência ao SXT é uma situação preocupante, uma vez que este agente é um dos utilizados no tratamento de infecções em humanos (Campos e Hofer, 1989; D'Aoust *et al*, 1992; Lee *et al*, 1993; Lee *et al*, 1994; Ramos *et al*, 1996), apesar de actualmente já não ser muito utilizado no tratamento de salmoneloses (Angulo *et al*, 2000).

2.2) *Listeria* spp. e *L.monocytogenes*

2.2.1) Resistência e multiresistência

No presente estudo, a prevalência de isolados de *Listeria* spp. resistentes foi elevada (84%), incluindo *L.monocytogenes* (73%). Relativamente às outras espécies obtidas nas amostras analisadas, salienta-se a elevada incidência de isolados de *L.innocua* resistentes (94%), isto é, com excepção de dois, todos os restantes isolados desta espécie apresentaram resistência a um ou mais dos agentes antimicrobianos testados.

Do mesmo modo, num estudo recente realizado em Espanha, em *Listeria* spp. de origem alimentar, incluindo produtos cárneos, foi observado um número substancial de isolados resistentes a um ou mais dos agentes antimicrobianos testados, quer em *L.monocytogenes*, quer em *L.innocua* (Rota *et al*, 1996). Os resultados obtidos por Rota *et al* (1996), tal como os registados no presente estudo, sugerem que pode ter ocorrido uso inadequado de antibióticos ao nível da criação de animais, incluindo não serem cumpridos os períodos de suspensão antes do abate dos animais destinados a consumo humano.

Salienta-se que em vários estudos anteriores sobre resistência a antimicrobianos em *Listeria* spp. isoladas de alimentos, incluindo produtos cárneos (Slade e Collins-Thompson, 1990; Facinelli *et al*, 1991; Barbuti *et al*, 1992; Franco *et al*, 1994; Charpentier *et al*, 1995), a prevalência de resistência foi substancialmente menor relativamente ao estudo de Rota *et al* (1996) e ao nosso estudo. Por exemplo, no trabalho de Facinelli *et al* (1991) em produtos lácteos e cárneos italianos, apenas foram isoladas 4 em 98 (4%) *L.monocytogenes* e 15 em 85 (18%) *L.innocua* resistentes a um ou mais agentes antimicrobianos. Em isolados humanos, a incidência de estirpes de *Listeria* spp. resistentes também se tem mantido baixa ou nula (Larsson *et al*, 1985; MacGowan et al, 1990; Charpentier et al, 1995; Heger *et al*, 1997).

No presente estudo, a percentagem de isolados de *Listeria* resistentes a dois ou mais dos agentes antimicrobianos testados de grupos diferentes também foi elevada (30%),

mas difere de acordo com a espécie. Assim, a resistência múltipla foi mais frequente em isolados de *L.innocua* (44%) do que em isolados de *L.monocytogenes* (23%), *L.welshimeri* (0%) e *L.seeligeri* (0%).

No estudo de Rota *et al* (1996) também foi detectada uma elevada prevalência de resistência múltipla em isolados de *Listeria* spp. de alimentos de origem animal, particularmente em todas as espécies isoladas de produtos cárneos. Já num estudo de 1991, em Itália, cerca de metade das estirpes de *L.monocytogenes* e de *L.innocua* de origem alimentar resistentes apresentavam resistência a dois ou mais agentes antimicrobianos (Facinelli *et al*, 1991). Adicionalmente, também têm sido registados alguns isolados clínicos de *L.monocytogenes* multiresistentes em vários países europeus, como França (Poyart-Salmeron *et al*, 1990; Quentin *et al*, 1990), Suiça (Hadorn *et al*, 1993) e Grécia (Tsakris *et al*, 1997).

2.2.2) Resistência aos macrólidos e lincosamidas

Neste estudo, a resistência à lincosamida **clindamicina** foi a mais frequente, sendo registada em mais de metade dos isolados (36) de *Listeria* spp.. Relativamente à distribuição por espécies, foi a resistência predominante em *L.innocua* (69%) e *L.welshimeri* (63%) e foi a segunda mais frequente em *L.monocytogenes* (35%).

No estudo de Barbuti *et al* (1992) realizado em produtos cárneos italianos, a resistência à clindamicina, apesar de menos frequente do que no nosso estudo, também foi observada em algumas estirpes de *L.monocytogenes* (3%) e de *L.innocua* (27%). Além disso, reduzida susceptibilidade a esta e outras lincosamidas, como a lincomicina, foi observada em isolados humanos de *Listeria* spp., nomeadamente de *L.monocytogenes* (Benson *et al*, 1987; Barry *et al*, 1988; Soriano *et al*, 1995; Martínez-Martínez *et al*, 1998; Soriano *et al*, 1998).

Por outro lado, no nosso trabalho só se detectou um (2%) isolado resistente ao macrólido **eritromicina**, pertencente à espécie *L.innocua*.

Similarmente, Barbuti *et al* (1992) em produtos cárneos apenas registaram uma (2%) estirpe de *L.monocytogenes* resistente a este macrólido e nenhuma *L.innocua*. Num estudo anterior também em Itália, foram isoladas de produtos cárneos apenas duas (2%) *L.innocua* e uma (1%) *L.monocytogenes* resistentes à eritromicina (Facinelli *et al*, 1991). No estudo de Franco *et al* (1994), também foi detectada uma elevada susceptibilidade à eritromicina entre isolados de *Listeria* de origem alimentar, incluindo aves. No estudo de Charpentier *et al* (1995) que incluiu 1040 estirpes de *Listeria* isoladas de alimentos e do ambiente não foi detectada resistência à eritromicina.

Apesar da resistência à eritromicina já ter sido observada em algumas estirpes humanas de *L.monocytogenes* (MacGowan *et al*, 1990; Poyart-Salmeron *et al*, 1990; Quentin *et al*, 1990; Hadorn *et al*, 1993), a susceptibilidade a este agente mantém-se na maioria dos isolados de *Listeria* spp. dessa origem (Larsson *et al*, 1985; Benson *et al*, 1987; Barry *et al*, 1988; Charpentier *et al*, 1995; Soriano *et al*, 1995; Soriano *et al*, 1998; Martínez-Martínez *et al*, 1998).

Excepcionalmente, no estudo já referido de Rota *et al* (1996), mais de 90% dos isolados de produtos cárneos foram resistentes à eritromicina, incluindo *L.monocytogenes*, *L.innocua* e *L.welshimeri*. É de notar que nesta altura ainda era permitido na Comunidade Europeia a utilização de vários macrólidos (tilosina e espiramicina), como promotores de crescimento em animais de criação, posteriormente associados com selecção de resistência cruzada ao macrólido eritromicina usado em humanos. Devido à selecção dessa resistência, o uso de macrólidos (tilosina e espiramicina) como promotores de crescimento foi banido de toda a Comunidade Europeia desde Julho de 1999 (Parecer 98/C407/02; Tollefson e Miller, 2000; Regulamento nº 2821/1998/CE), apesar de ainda ser permitido o seu uso na terapêutica animal (Regulamento nº 508/1999/CE).

O aparecimento de estirpes resistentes à eritromicina, um dos agentes antimicrobianos usados na terapêutica de infecções por bacilos Gram positivo não esporulados, inluindo *L.monocytogenes*, é uma situação preocupante relativamente à segurança dos consumidores, pois a escolha de agentes antimicrobianos para o tratamento da listeriose fica restringida (Rota *et al*, 1996; Soriano *et al*, 1998).

No presente trabalho, foram observados dois **padrões de resistência** aos antimicrobianos do grupo macrólidos/lincosamidas: uma estirpe resistente simultaneamente à eritromicina e à clindamicina e 35 estirpes resistentes à clindamicina, mas sensíveis à eritromicina, ou seja, dos 36 isolados de *Listeria* spp. resistentes à lincosamida clindamicina, apenas um isolado apresenta resistência simultânea ao macrólido eritromicina.

Esta situação também se verificou no estudo de Barbuti *et al* (1992) em produtos cárneos, onde todas as estirpes de *L.innocua* (27) resistentes à clindamicina se apresentaram sensíveis à eritromicina, tal como uma das duas *L.monocytogenes* resistentes à clindamicina. Relativamente a isolados humanos, em vários estudos também têm sido registadas estirpes de *Listeria* spp. com um comportamento intermédio ou resistente às lincosamidas clindamicina ou lincomicina, mas simultaneamente sensíveis à eritromicina (Benson *et al*, 1987; Barry *et al*, 1988; Soriano *et al*, 1995; Martínez-Martínez *et al*, 1998; Soriano *et al*, 1998). No caso clínico ocorrido na Grécia descrito por Tsakris *et al* (1997) causado por uma estirpe de L.*monocytogenes* multiresistente verificou-se que uma das resistências apresentada era à clindamicina, mas mantendo sensibilidade à eritromicina.

Nas estirpes simultaneamente resistentes a macrólidos e lincosamidas, como ocorreu na nossa única *L.innocua* resistente à eritromicina e à clindamicina e na estirpe de *L.monocytogenes* responsável pelo caso de listeriose estudado por Hadorn *et al* (1993), o mecanismo de resistência clássico consiste na modificação do alvo desses antibióticos por metilases codificadas por genes do tipo *erm* (*erythromycin ribosome methylation*) (Roberts *et al*, 1999). Vários genes *erm* foram já descritos em estirpes de *Listeria* (Poyart-Salmeron *et al*, 1990; Hadorn *et al*, 1993; Roberts *et al*, 1996). Por exemplo, Roberts *et al* (1996) detectaram uma *L.monocytogenes* e uma *L.innocua* isoladas de alimentos com genes *erm C* conjugativos. A transferência de um transposão com gene de resistência ao grupo dos macrólidos/lincosamidas (*erm* AM) de *E.faecalis* para *L.monocytogenes* já foi descrita *in vitro* e *in vivo* em ratos (Doucet-Populaire *et al*, 1991).

Em contraste, o fenótipo de resistência a lincosamidas e sensibilidade a macrólidos, que foi o mais frequente no nosso e noutros trabalhos em estirpes de *Listeria*, poderá estar a ocorrer por um mecanismo diferente do anterior. Vários mecanismos de resistência a apenas um dos antibióticos do grupo macrólidos, lincosamidas e estreptograminas foram descritos, nomeadamente inactivação do agente antimicrobiano por uma enzima específica ou um sistema de efluxo específico para um dos agentes (Roberts *et al*, 1999). Uma bomba de efluxo específica para lincosamidas já foi descrita em *Streptomyces* (Roberts *et al*, 1999) e enzimas inactivadoras de lincosamidas já foram descritas em *Enterococcus* e *Staphylococcus* (Roberts *et al*, 1999; Bozdogan *et al*, 1999). Salienta-se que Mata *et al* (2000) detectaram um gene cromossómico (*mdrL*) em *L.monocytogenes* que codifica a primeira bomba de efluxo descrita nesta bactéria, mas que afecta vários agentes antimicrobianos deste grupo, incluindo os macrólidos eritromicina e josamicina e a lincosamida clindamicina.

Se a emergência de resistência a antibióticos em estirpes de *Listeria* está associada com a aquisição de genes em plasmídeos e transposões com origem em *Enterococcus* (Charpentier e Courvalin, 1999), também será de considerar a hipótese do gene que codifica o mecanismo de inactivação de lincosamidas (enzima lincomicina nucleotidiltransferase) descrito em *Enterococcus* (Bozdogan *et al*, 1999) poder ser transferido para *Listeria*. Além disso, uma elevada frequência de resistência a este grupo de antibióticos, particularmente às lincosamidas, é normalmente observada em estirpes de *Enterococcus*, como se verificou no estudo de Aarestrup *et al* (1998a) para isolados de várias espécies animais, incluindo aves (91% de *E.faecium* resistentes à lincomicina e 65% à eritromicina).

2.2.3) Resistência às fluoroquinolonas

No presente trabalho, a resistência à fluoroquinolona de uso veterinário enrofloxacina também foi frequente (43%), sendo observada em 29 isolados de *Listeria*. A resistência à enrofloxacina foi mais frequente em *L.monocytogenes* (58%) do que em *L.innocua* (41%). Salienta-se que a *L.seeligeri* foi a única resistente simultaneamente às duas fluoroquinolonas testadas (enrofloxacina e ofloxacina).

Em contraste, nos estudos em que tem sido avaliada a actividade *in vitro* de fluoroquinolonas contra estirpes de *Listeria* não há registos de resistência a este grupo de antimicrobianos. Por exemplo, em Espanha, no estudo de Soriano *et al* (1998) todas as estirpes de *Listeria* de origem clínica estudadas apresentaram susceptibilidade à fluoroquinolona levofloxacina, tal como se verificou num estudo anterior dos mesmos autores (Soriano *et al*, 1995) para a ciprofloxacina. É de notar que num estudo mais recente em França com 685 estirpes de *L.monocyotgenes* de origem humana foi observada uma estirpe resistente à ciprofloxacina (Charpentier *et al*, 1999).

A elevada incidência de resistência à fluoroquinolona enrofloxacina observada nas nossas estirpes de *Listeria* isoladas de aves, poderá estar relacionada com o uso extensivo destes agentes antimicrobianos em terapêutica veterinária, tal como verificado para o género *Salmonella*. Deste modo, o aparecimento de resistência a um agente deste grupo de antimicrobianos, como verificado no presente estudo para a enrofloxacina, poderá constituir o primeiro passo para a selecção de estirpes com resistência a outras fluoroquinolonas, incluindo de uso em humanos.

Embora o tratamento habitual das infecções por *Listeria* continue a ser a combinação de ampicilina com gentamicina, as fluoroquinolonas poderão ser alternativa a essa terapêutica (Temple e Nahata, 1999). Estudos *in vitro* com fluoroquinolonas sugerem que algumas das mais recentemente desenvolvidas poderão ter um papel importante no tratamento da listeriose, uma vez que apresentam uma boa actividade contra *L.monocytogenes* intracelular (Michelet *et al*, 1997).

2.2.4) Resistência às tetraciclinas

No presente estudo, a resistência à tetraciclina também foi frequente entre os isolados de *Listeria* (15%). Relativamente às espécies, a resistência a este grupo de antibióticos só foi observada em *L.innocua* (28%) e *L.welshimeri* (13%).

Do mesmo modo, num estudo em Espanha, Franco *et al* (1994) verificaram que a maioria das estirpes de *L.innocua* isoladas de aves e do ambiente de um matadouro de aves eram resistentes à tetraciclina, enquanto nenhuma das estirpes de *L.monocytogenes* era

resistente a este agente. Tal como se verificou no estudo de *Facinelli et al* (1991) em que a resistência à tetraciclina não foi detectada entre os isolados de *L.monocytogenes*, mas foi a mais comum entre *L.innocua* isoladas de produtos cárneos, ocorrendo em 12% das estirpes dessa espécie. As primeiras duas estirpes de *L.innocua*, de origem alimentar, resistentes à tetraciclina foram identificadas num estudo no Canadá em 1990 (Slade e Collins-Thompson, 1990).

No entanto, noutros estudos com produtos alimentares já foram isoladas estirpes de *L.monocytogenes* resistentes a este agente. Assim, no estudo de Barbuti *et al* (1992), algumas estirpes de *L.monocytogenes* isoladas de produtos cárneos eram resistentes à tetraciclina (3%), enquanto nenhuma das *L.innocua* apresentou essa resistência. Num estudo mais recente, a resistência à tetraciclina foi a mais observada entre as 1040 estirpes de *Listeria* spp. de fontes alimentares e ambientais estudadas, sendo registadas 61 (6%) estirpes resistentes a este agente que incluíram *L.monocytogenes* (37), *L.innocua* (22) e *L.welshimeri* (2) (Charpentier *et al*, 1995). Também no estudo de Rota *et al* (1996), a resistência à tetraciclina foi das mais observadas em isolados de produtos cárneos, sendo mais de 90% os isolados de *L.monocytogenes*, *L.innocua* e *L.welshimeri* resistentes a este agente.

Segundo Charpentier e Courvalin (1999), a incidência de resistência à tetraciclina está a aumentar em estirpes de *Listeria* spp. isoladas de alimentos e de fontes ambientais. O uso largamente difundido deste grupo de antibióticos, em particular na alimentação dos animais, pode ser responsável pela relativamente elevada incidência de *Listeria* spp. resistentes à tetraciclina (Charpentier *et al*, 1995). Já Facinelli *et al* (1991) tinham sugerido que o uso difundido de tetraciclina nas rações para aves pode ter sido o responsável pela resistência observada em *L.innocua*, isoladas de produtos à base de frango e peru.

Em *L.monocytogenes* isoladas de humanos, a resistência à tetraciclina é também das mais frequentes (Charpentier e Courvalin, 1999). Os primeiros casos registados causados por *L.monocytogenes* multiresistentes, incluíram resistência à tetraciclina (Poyart-Salmeron *et al*, 1990; Quentin *et al*, 1990; Hadorn *et al*, 1993). Também num estudo realizado no Reino Unido com 621 estirpes de estirpes de *L.monocytogenes* verificou-se que a principal resistência foi a este agente, sendo 13 (2%) estirpes resistentes à tetraciclina (MacGowan *et al*, 1990).

Apesar de no presente estudo não terem sido isoladas estirpes de *L.monocytogenes* resistentes à tetraciclina, os resultados registados para as outras espécies, nomeadamente para *L.innocua*, são preocupantes, pois estas estirpes são transmitidas ao Homem através da cadeia alimentar. Estirpes de *L.innocua* também podem servir de reservatório de genes de resistência à tetraciclina para outras espécies, incluindo *L.monocytogenes*, como mostram os resultados de Facinelli *et al* (1993). A transferência de resistência entre

L.innocua e *L.monocytogenes* pode ocorrer no tracto gastrointestinal de animais onde ambas as espécies podem estar e onde são esperados níveis subinibitórios de tetraciclina, uma vez que é um dos antibióticos usado em animais de criação, nomeadamente em aves (Facinelli *et al*, 1993).

Relativamente aos **padrões de resistência**, verifica-se que no presente estudo entre os dez isolados resistentes à tetraciclina, 4 isolados (3 *L.innocua* e 1 *L.welshimeri*) apresentam um comportamento intermédio à minociclina e os restantes 6 (*L.innocua*) sensibilidade a este agente.

Pelo contrário, Charpentier *et al* (1995) verificaram que a resistência à tetraciclina estava sempre associada com a minociclina, apesar de terem sido observados dois níveis de resistência. Pela caracterização dos determinantes de resistência nas 61 *Listeria* spp. resistentes à tetraciclina, esses autores detectaram o gene *tet*(M) em 57 isolados e o gene *tet*(S) em 3 estirpes de *L.innocua* e numa *L.welshimeri*, sendo estas as estirpes que apresentavam os níveis mais baixos de resistência à minociclina, tal como as 4 observadas no presente estudo. Nas estirpes de *Listeria* estudadas por Poyart-Salmeron *et al* (1992) e Facinelli *et al* (1993) também foi mais frequente a presença de genes *tet*(M). Nas estirpes resistentes à tetraciclina e sensíveis à minociclina é provável a presença de outros genes *tet* (*tet* K, *tet* L) (Charpentier *et al*, 1995), que poderão existir nos 6 isolados que apresentam este perfil no nosso estudo. Também a resistência à tetraciclina em *Listeria* pode resultar da aquisição de genes transportados em plasmídeos ou transposões com origem em *Enterococcus* e *Streptococcus* (Poyart-Salmeron *et al*, 1992; Facinelli *et al*, 1993; Charpentier *et al*, 1994; Charpentier *et al*, 1995).

2.2.5) Resistência aos aminoglicosídeos

No presente estudo apenas foram isoladas 5 estirpes de *Listeria* resistentes ao aminoglicosídeo estreptomicina, sendo uma *L.monocytogenes* e 4 *L.innocua*. Além disso, nenhum desses isolados apresentou resistência aos outros aminoglicosídeos testados, isto é, gentamicina, tobramicina e canamicina.

A resistência à estreptomicina foi observada em algumas estirpes de *Listeria* spp. isoladas de fontes alimentares e ambientais por outros autores. Por exemplo, Facinelli *et al* (1991) observaram uma (1%) *L.monocytogenes* e uma (1%) *L.innocua* isoladas de produtos cárneos resistentes a este agente, mas ao contrário do nossos isolados, apresentando também resistência a outros aminoglicosídeos, como canamicina e gentamicina. Mais recentemente, no trabalho de Rota *et al* (1996) em produtos cárneos à base de porco cerca de 75% dos isolados de *Listeria*, incluindo *L.monocytogenes*, *L.innocua* e *L.welshimeri*,

foram resistentes à tobramicina e à gentamicina, não tendo sido testada a estreptomicina. Esta situação pode estar associada relacionada com o facto de na Europa a gentamicina ser permitida nesses animais, mas não em aves.

Tal como no nosso estudo, Franco *et al* (1994), também detectaram uma elevada susceptibilidade à gentamicina entre isolados de *Listeria* de origem alimentar, incluindo aves. No estudo de Barbuti *et al* (1992), em isolados de *L.monocytogenes* e de *L.innocua* de produtos cárneos italianos, todos eram susceptíveis aos aminoglicosídeos testados, incluindo gentamicina e tobramicina. Num estudo mais recente, também em isolados de alimentos, não foram detectadas estirpes de *Listeria* resistentes à estreptomicina, gentamicina e canamicina (Charpentier *et al*, 1995).

Em algumas estirpes humanas de *L.monocytogenes* tem sido observada resistência à estreptomicina (Slade e Thompson, 1990; Facinelli *et al*, 1991;Charpentier *et al*, 1995), mas não à gentamicina (MacGowan *et al*, 1990; Soriano *et al*, 1995; Charpentier *et al*, 1995; Heger *et al*, 1997), havendo no primeiro caso associado a uma estirpe de *L.monocytogenes* multiresistente resistência à estreptomicina e sensibilidade à gentamicina (Poyart-Salmeron *et al*, 1990). Contudo, na Grécia, foi descrito o primeiro caso de infecção humana com *L.monocytogenes* multiresistente que apresentava resistência aos aminoglicosídeos estreptomicina e gentamicina e reduzida susceptibilidade à tobramicina (Tsakris *et al*, 1997). Este comportamento pode traduzir-se em dificuldades terapêuticas, pois a gentamicina é o aminoglicosídeo usado em associação com a ampicilina no tratamento de listeriose.

2.2.6) Resistência a outros agentes antimicrobianos

Neste estudo não foram observados isolados de *Listeria* resistentes aos antibióticos β-lactâmicos do grupo das penicilinas, ao trimetoprim/sulfametoxazol, ao glicopeptído vancomicina, ao cloranfenicol e à rifampicina.

Tal como no presente estudo, vários autores verificaram que todas as estirpes de *Listeria*, incluindo *L.monocytogenes*, isoladas de produtos alimentares, se apresentaram susceptíveis aos antibióticos β-lactâmicos do grupo das **penicilinas** (Facinelli *et al*, 1991; Barbuti *et al*, 1992; Franco *et al*, 1994; Charpentier *et al*, 1995). Do mesmo modo, vários estudos em amostras de origem humana mostram que as estirpes de *Listeria* spp., incluindo *L.monocytogenes*, têm mantido susceptibilidade às penicilinas (MacGowan *et al*, 1990; Soriano *et al*, 1995; Charpentier *et al*, 1995; Heger *et al*, 1997; Soriano *et al*, 1998).

No entanto, Soriano *et al* (1995), notaram um aumento dos valores da CMI para a ampicilina em *L.monocytogenes* de origem humana, sugerindo que a resistência a esta agente se pudesse difundir. No trabalho de Rota *et al* (1996), apesar da resistência aos

antibióticos β-lactâmicos do grupo das penicilinas ser das menos frequentes em isolados de *Listeria* de produtos cárneos, ainda ocorreu em 10% das *L.monocytogenes* e em cerca de 20% das *L.innocua*.

As penicilinas são o grupo de antibióticos escolhido para o tratamento de listeriose nos humanos, de modo que a emergência de resistência a estes agentes em *L.monocytogenes* seria um problema. É de notar que já foram descritas estirpes de *Enterococcus* com β-lactamases codificadas por plasmídeos ou transposões, de modo que a aquisição de resistência a esse grupo de antibióticos poderia representar um grave problema terapêutico (Charpentier e Courvalin, 1999).

Relativamente aos antibióticos β-lactâmicos do grupo das cefalosporinas, estes não são indicados no tratamento de listeriose, uma vez que apresentam pouca actividade contra *L.monocytogenes* (Larsson *et al*, 1985; Heger *et al*, 1997; Temple e Nahata, 1999). Com efeito, as estirpes de *Listeria* exibem um alto grau de resistência às cefalosporinas, principalmente às da segunda e terceira geração, tal como tem sido demonstrado em vários estudos (Larsson *et al*, 1985; Soriano *et al*, 1995; Rota *et al*, 1996; Heger *et al*, 1997).

No presente estudo não foi detectada resistência à associação **trimetoprim/sulfametoxazol**, outra associação de antimicrobianos que pode ser usada no tratamento de listeriose. Esta susceptibilidade ao SXT também tem sido referida em isolados humanos de vários estudos (Larsson *et al*, 1985; Charpentier *et al*, 1995; Heger *et al*, 1997). Por outro lado em estudos com estirpes de origem alimentar, a situação tem sido diferente. No estudo de Barbuti *et al* (1992), foram registadas algumas estirpes de *L.monocytogenes* (3%) e de *L.innocua* (7%) resistentes à associação trimetoprim-sulfametoxazol em isolados de produtos cárneos. Contudo, no estudo de Facinelli *et al* (1991) não foram detectadas estirpes de *Listeria* resistentes à associação trimetoprim/sulfametoxazol, mas foi registada resistência ao sulfametoxazol numa estirpe de *L.monocytogenes* e numa *L.innocua* isoladas de produtos cárneos. Pelo contrário, num estudo mais recente realizado com 1040 estirpes de *Listeria* spp. isoladas de fontes alimentares e ambientais, foi detectada uma estirpe de *L.monocytogenes* resistente a níveis elevados de trimetoprim, mas susceptível ao sulfametoxazol, de modo que neste isolado a resistência ao trimetoprim conseguiu abolir o sinergismo geralmente observado entre estes dois agentes (Charpentier *et al*, 1995).

A resistência ao trimetoprim é preocupante, uma vez que a associação trimetoprim/sulfametoxazol é usada na terapêutica da listeriose, especialmente em casos de alergia às penicilinas (Charpentier *et al*, 1995; Temple e Nahata, 1999). A emergência e difusão da resistência ao trimetoprim pode resultar em falhas terapêuticas, uma vez que é abolido o efeito sinérgico entre os dois agentes (Charpentier *et al*, 1995).

Relativamente à **vancomicina**, não ha registos de resistência em isolados de *Listeria* de origem humana (Soriano *et al*, 1995; Charpentier *et al*, 1995; Soriano *et al*, 1998) e alimentar (Facinelli *et al*, 1991; Barbuti *et al*, 1992; Charpentier *et al*, 1995), tal como no presente estudo. Contudo, um estudo *in vitro* registou a transferência por conjugação de um plasmídeo com o gene *Van* A, que confere resistência aos glicopeptídos, entre *Enterococcus* e estirpes de várias espécies de *Listeria* (Biavasco *et al*, 1996). Apesar da frequência desta transferência ter sido baixa, o que pode ser responsável pelo facto de não ter sido registada resistência a este agente em estirpes de *Listeria*, não se pode excluir a possibilidade de transferência natural de genes *Van A* para *Listeria* (Biavasco *et al*, 1996). A emergência de *Enterococcus* resistentes à vancomicina em animais, após a utilização do glicopeptído avoparcina (actualmente abolido como promotor de crescimento), tem sido registada, de tal modo que a presença de genes que podem ser transferidos por conjugação pode representar um problema em estirpes de *Listeria* presentes em produtos de origem animal, pois a vancomicina também pode ser usada no tratamento da listeriose.

Do mesmo modo, noutros estudos em produtos alimentares, todos os isolados de *Listeria* foram susceptíveis ao **cloranfenicol** (Facinelli *et al*, 1991; Barbuti *et al*, 1992; Charpentier *et al*, 1995), tal como em isolados humanos (Larsson *et al*, 1985; MacGowan *et al*, 1990; Charpentier *et al*, 1995). Em contraste, num estudo com isolados de alimentos, Franco *et al* (1994) observaram níveis significativos de resistência ao cloranfenicol em estirpes de *L.seeligeri* e de *L.innocua*, sendo a incidência de resistência a este agente de 19% em *L.innocua*. No trabalho de Rota *et al* (1996), em produtos cárneos, todos os isolados de *Listeria*, incluindo *L.monocytogenes*, com excepção de um foram resistentes ao cloranfenicol. Salienta-se que já foram descritos alguns casos de listeriose em que a estirpe de *L.monocytogenes* multiresistente também apresentava resistência ao cloranfenicol (Poyart-Salmeron *et al*, 1990; Quentin *et al*, 1990; Hadorn *et al*, 1993; Tsakris *et al*, 1997).

Também, noutros estudos em produtos alimentares, todos os isolados de *Listeria* foram susceptíveis à **rifampicina** (Barbuti *et al*, 1992), tal como em isolados humanos (Soriano *et al*, 1995). Contudo, resistência à rifampicina já foi observada numa única estirpe de *L.monocytogenes* multiresistente isolada de um produto cárneo (Facinelli *et al*, 1991).

VI) Conclusões

Estudo da incidência

Os resultados deste estudo demonstram uma elevada incidência de ***Salmonella*** (60%) nas amostras dos produtos avícolas analisados. Relativamente à serotipagem dos isolados, o facto de *S.*Enteritidis ter sido o serótipo mais isolado nas nossas amostras (44%) e ser também o serótipo mais frequente em isolados humanos no nosso país, sugere que as aves sejam um veículo importante na transmissão da salmonelose humana. Da mesma forma, *S.*Hadar ter sido o segundo serótipo mais frequente parece estar de acordo com este serótipo de *Salmonella* estar a emergir em países europeus, incluindo Portugal, sendo o terceiro ou quarto mais frequente em isolados humanos, sugerindo que os sistemas de vigilância epidemiológica se devem manter atentos.

Relativamente ao estudo da incidência de ***L.monocytogenes***, a detecção desta espécie em 41% das amostras também indica um risco elevado, nomeadamente para as pessoas mais susceptíveis. Embora não tenham sido determinados os serótipos dos nossos isolados de *L.monocytogenes*, todas as estirpes devem ser consideradas potencialmente patogénicas para os humanos.

Assim, as aves são um veículo importante de *Salmonella* e de *L.monocytogenes*, representando um risco potencial para os consumidores, especialmente se estes alimentos forem consumidos mal cozinhados ou se ocorrer contaminação cruzada com outros alimentos. Também nos locais de venda a retalho, como os talhos, onde vários tipos de produtos alimentares são comercializados, a elevada contaminação de frangos e perus crus pode ser uma fonte de *Salmonella* e de *L.monocytogenes* para alimentos prontos a comer. Além disso, tendo em conta a capacidade de *L.monocytogenes* crescer a temperatura de refrigeração, o armazenamento desses alimentos contaminados durante algum tempo poderá permitir a proliferação desta bactéria patogénica para níveis perigosos.

Consequentemente, é necessário a implementação de boas práticas de confecção e procedimentos correctos de manipulação e de higiene durante a preparação destes produtos avícolas. Assim, é fundamental a educação dos manipuladores e dos consumidores, principalmente dos grupos da população mais susceptíveis a estas doenças, sobre os riscos microbianos associados com o consumo de aves e como os prevenir. No entanto, o controlo destes microrganismos patogénicos deve ocorrer ao longo de toda a cadeia de produção, desde a criação dos animais, abate, processamento e distribuição da carne até à manipulação dos alimentos nos estabelecimentos de venda a retalho e de restauração colectiva e em casa dos consumidores.

Métodos de identificação de *L.monocytogenes*

Pela comparação dos dois métodos utilizados para identificar as espécies de *Listeria* isoladas nas nossas amostras verificou-se que o método de PCR multiplex constitui uma alternativa adequada ao método convencional de identificação bioquímica. Os resultados do presente trabalho obtidos com 67 isolados de *Listeria* spp. mostram que este PCR multiplex é um modo mais seguro, rápido e menos trabalhoso de identificação de *L.monocytogenes* e de outras espécies de *Listeria*.

Assim, este método poderá ser de grande utilidade para a indústria alimentar e para os laboratórios de vigilância responsáveis pela segurança alimentar e pelo estudo da listeriose. No entanto, será desejável desenvolver técnicas deste tipo para a detecção directa de espécies de *Listeria* em amostras de alimentos, evitando a fase de cultura para isolamento e identificação das estirpes e que, adicionalmente, permitissem ultrapassar o problema de *L.innocua* crescer mais rapidamente do que *L.monocytogenes*.

Estudo da susceptibilidade a agentes antimicrobianos

Além da ocorrência elevada de *Salmonella* e de *L.monocytogenes* nas nossas amostras verificou-se que as aves são reservatórios de isolados resistentes a um ou mais agentes antimicrobianos, tendo alguns perfis de resistência preocupantes.

Nos isolados de ***Salmonella***, a incidência de resistência foi de 75%, sendo mais frequente para o ácido nalidíxico e enrofloxacina. Foi também relevante a incidência de isolados multiresistentes, principalmente em amostras de perus. Relativamente aos serótipos mais frequentes, salienta-se a menor incidência de isolados de *S*.Enteritidis resistentes e multiresistentes relativamente a *S*.Hadar, sugerindo que o potencial para desenvolvimento de resistência a antimicrobianos de *S*.Hadar deva ser monitorizado.

Os nossos resultados mostram que em *Salmonella* as β-lactamases TEM-1 são o principal determinante de resistência aos antibióticos β-lactâmicos. É de notar a associação verificada da resistência à amoxicilina a plasmídeos conjugativos que pode promover a disseminação desta resistência no ambiente de produção de aves quando ocorre a colonização da população microbiana intestinal.

Sendo ***L.monocytogenes*** uma espécie bacteriana considerada, até recentemente, susceptível a quase todos os antibióticos, a elevada incidência de isolados resistentes (73%), nomeadamente à enrofloxacina (58%) e à clindamicina (35%) é preocupante. É também de salientar a proporção de isolados de *Listeria* spp. multiresistentes (30%), nomeadamente *L.innocua* (44%) e *L.monocytogenes* (23%).

A presença destas bactérias patogénicas resistentes a antibióticos em alimentos é um problema grave de saúde pública, pois poderá reflectir-se no isolamento em humanos de estirpes resistentes, que poderão comprometer o tratamento de infecções.

O uso não controlado de agentes antimicrobianos nos animais de produção pode ter contribuído para o desenvolvimento dos padrões de resistência observados em algumas estirpes de *Salmonella*, uma vez que o principal reservatório deste patogénico são os animais, incluindo as aves. Devido à distribuição ubíqua de *L.monocytogenes*, este microrganismo também está exposto a uma grande variedade de inibidores ambientais, incluindo antibióticos, para além de contactar com outras bactérias que constituem reservatórios de genes de resistência, nomeadamente no tracto intestinal dos animais. Assim, a presunção de que espécies de *Listeria* são susceptíveis a antibióticos deve ser reavaliada, tal como o risco de infecções de origem alimentar por estirpes de *L.monocytogenes* resistentes.

Uma vez que a resistência observada em *Salmonella* e *Listeria* isoladas de aves é a antibióticos permitidos para uso terapêutico nesses animais, é importante implementar acções para controlar o seu uso em medicina veterinária. Adicionalmente, os nossos resultados parecem demonstrar que as medidas para controlar o uso de promotores de crescimento em animais têm sido insuficientes para minimizar a emergência de estirpes bacterianas resistentes.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, é necessário implementar sistemas de monitorização de resistências em bactérias isoladas de animais e de produtos de origem animal. São necessários mais dados sobre a frequência e os padrões de resistência aos antibióticos em bactérias patogénicas isoladas de animais, incluindo aves, e informação sobre os agentes antimicrobianos efectivamente usados na produção animal, para ser possível monitorizar as alterações de resistência e determinar se estão relacionadas com o uso específico de determinados antibióticos. Só assim é que será possível prevenir e controlar a emergência de bactérias zoonóticas, como *Salmonella* e *L.monocytogenes*, resistentes a agentes antimicrobianos.

VII) Bibliografia

Aarestrup, F.M., Bager, F., Jensen, N.E., Madsen, M., Meyling, A., Wegener, H.C. 1998a. Surveillance of antimicrobial resistance in bacteria isolated from food animals to antimicrobial growth promoters and related therapeutic agents in Denmark. APMIS 106:606-622.

Aarestrup, F.M., Bager, F., Jensen, N.E., Madsen, M., Meyling, A., Wegener, H.C. 1998b. Resistance to antimicrobial agents used for animal therapy in pathogenic-, zoonotic- and indicator bacteria isolated from different food animals in Denmark: a baseline study for the Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring Programme (DANMAP). APMIS 106:745-770.

Aarestrup, F.M. 1999. Association between the consumption of antimicrobial agents in animal husbandry and the occurrence of resistant bacteria among food animals. Int. J. Antimicrob. Agents 12:279-285.

Aarestrup, F.M., Jensen, N.E., Jorsal, S.E., Nielsen, T.K. 2000. Emergence of resistance to fluoroquinolones among bacteria causing infections in food animals in Denmark. Vet. Rec. 146:76-78.

Angulo, F.J., Johnson, K., Tauxe, R.V., Cohen, M.L. 2000. Significance and sources of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. Microb. Drug Resist. 6:77-83.

Ansari, F.A., Khatoon, H. 1994. Multiple antibiotic resistance among Gram negative bacteria isolated from poultry. Indian J. Exp. Biol. 32:211-212.

Arnold, G.J., Coble, J. 1995. Incidence of *Listeria* species in foods in NSW. Food Australia 47:71-75.

Arumugaswamy, R.K., Ali, G.R.R., Hamid, S.N.B.A. 1994. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods in Malaysia. Int. J. Food Microbiol. 23:117-121.

Arvanitidou, M., Tsakris, A., Sofianou, D., Katsouyannopoulos, V. 1998. Antimicrobial resistance and R-factor transfer of *Salmonellae* isolated from chicken carcasses in Greek hospitals. Int. J. Food Microbiol. 40:197-201.

Aureli, P., Fiorucci, G.C., Caroli, D., Marchiaro, G., Novara, O., Leone, L., Salmaso, S. 2000. An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. N. Engl. J. Med. 342:1236-1241.

Avril, J.R., Couete, I., Travert, M.F., Autuly, F., Plessis, P. 1995. Sensibilité aux quinolones des Salmonella isolées chez l'homme et l'animal. Path. Biol. 43:270-273.

Bailey, J.S., Fletcher, D.L., Cox, N.A. 1989. Recovery and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* from broiler chickens in the southeastern United States. J. Food Prot. 52:148-150.

Balis, E., Vatopoulos, A.C., Kanelopoulou, M., Mainas, E., Hatzoudis, G., Kontogianni, V., Malamou-Lada, H., Kitsou-Kiriakopoulou, S., Kalapothaki, V. 1996. Indications of in vivo transfer of an epidemic R plasmid from *Salmonella enteritidis* to *Escherichia coli* of the normal human gut flora. J. Clin. Microbiol. 34:977- 979.

Bansal, N.S., McDonell, F.H.Y., Smith, A., Arnold, G., Ibrahim, G.F. 1996. Multiplex PCR assay for routine detection of *Listeria* in food. Int. J. Food Microbiol. 33:293-300.

Barbuti, S., Maggi, A., Casoli, C. 1992. Antibiotic resistance in strains of *Listeria* spp. from meat products. Lett. Appl. Microbiol. 15:56-58.

Barnes, R., Archer, P., Strack, J., Istre, GR. 1989. Epidemiological notes and reports listeriosis associated with consumption of turkey franks. MMWR 38(15):267-268.

Barry, A.L., Jones, R.N., Thornsberry, C. 1988. In vitro activities of azithromycin (CP 62,993), clarithromycin (A-56268; TE-031), erythromycin, roxithromycin, and clindamycin. Antimicrob. Agents Chemother. 32:752-754.

Baumler, A.J., Hargis, B.M., Tsolis, R.M. 2000. Tracing the origins of *Salmonella* outbreaks. Science 287:50-52.

Bean, N.H., Griffin, P.M. 1990. Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973-1987: pathogens, vehicles, and trends. J. Food Prot. 53:804-817.

Bean, N.H., Goulding, J.S., Daniels, M.T., Angulo, F.J. 1997. Surveillance for foodborne disease outbreaks-United States, 1988-1992. J. Food Prot. 60:1265-1286.

Beli, E., Telo, A., Duraku, E. 2001. *Salmonella* serotypes isolated from turkey meat in Albania. Int. J. Food Microbiol. 63:165-167.

Benson, C.A., Segreti, J., Beaudette, F.E., Hines, D.W., Goodman, L.J., Kaplan, R.L., Trenholme, G.M. 1987. In vitro activity of A-56268 (TE-031), a new macrolide, compared with that of erythromycin and clindamycin against selected Gram-positive and Gram-negative organisms. Antimicrob. Agents Chemother. 31:328-330.

Bernard, D.T., Scott, V.N. 1999. *Listeria monocytogenes* in meats: new strategies are needed. Food Technol. 53:124.

Beumer, R.R., Giffel, M.C., Spoorenberg, E., Rombouts, F.M. 1996. *Listeria* species in domestic environments. Epidemiol. Infect. 117:437-442.

Biavasco, F., Giovanetti, E., Miele, A., Vignaroli, C., Facinelli, B., Varaldo, P.E. 1996. In vitro conjugative transfer of *VanA* vancomycin resistance between *Enterococci* and *Listeriae* of different species. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 15:50-59.

Bille, J., Catimel, B., Bannerman, E., Jacquet, C., Yersin, M.-N., Caniaux, I., Monget, D., Rocourt, J. 1992. API *Listeria*, a new and promising one-day system to identify *Listeria* isolates. Appl. Environ. Microbiol. 58:1857-1860.

Boer, E., Hahné, M. 1990. Cross-contamination with *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* spp. from raw chicken products during food preparation. J. Food Prot. 53:1067-1068.

Boisivon, A., Guiomar, C., Carbon, C. 1990. In vitro bactericidal activity of amoxicillin, gentamicin, rifampicin, ciprofloxacin and trimethoprim-sulfamethoxazole alone or in combination against *Listeria monocytogenes*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 9:206-209.

Bokanyi, R.P., Stephens, J.F., Foster, D.N. 1990. Isolation and characterization of *Salmonella* from broiler carcasses or parts. Poult. Sci. 69:592-598.

Bolton, L.F., Kelley, L.C., Lee, M.D., Fedorka-Cray, P.J., Maurer, J.J. 1999. Detection of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104 based on a gene which confers cross-resistance to florfenicol and chloramphenicol. J. Clin. Microb. 37:1348-1351.

Bozdogan, B., Berrezouga, L., Kuo, M.-S., Yurek, D.A., Farley, K.A., Stockman, B.J., Leclercq R. 1999. A new resistance gene, *linB*, conferring resistance to lincosamides by nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025. Antimicrob. Agents Chemother. 43:925-929.

Brenner, F.W., Villar, R.G., Angulo, F.J., Tauxe, R., Swaminathan, B. 2000. *Salmonella* nomenclature. J. Clin. Microbiol. 38:2465-2467.

Breuil, J., Brisabois, A., Casin, I., Armand-Lefèvre, L., Frémy, S., Collatz, E. 2000. Antibiotic resistance in salmonellae isolated from humans and animals in France: comparative data from 1994 and 1997. J. Antimicrob. Chemother. 46:965-971.

Brisabois, A., Cazin, I., Breuil, J., Collatz, E. 1997. Surveillance of antibiotic resistance in *Salmonella*. Eurosurveillance report 2(3): 3-4.

Bronzwaer, S.L.A.M., Buchholz, U., Kool, J.L. 2001. International surveillance of antimicrobial resistance in Europe: now we also need to monitor antibiotic use. Eurosurveillance 6(1):1-2.

Brown, D.J., Baggesen, D.L., Hansen, H.B., Hansen, H.C., Bisgaard, M. 1994. The characterization of Danish isolates of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis by phage typing and plasmid profiling: 1980-1990. APMIS 102:208-214.

Bryan, F.L., Doyle, M.P. 1995. Health risks and consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. J. Food Prot. 58:326-344.

Bubert, A., Kohler, S., Goebel, W. 1992a. The homologous and heterologous regions within the *iap* gene allow genus- and species-specific identification of *Listeria* spp. by polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol. 58:2625-2632.

Bubert, A., Kuhn, M., Goebel, W., Kohler, S. 1992b. Structural and functional properties of the p60 proteins from different *Listeria* species. J. Bacteriol. 174:8166-8171.

Bubert, A. Hein, I., Rauch, M., Lehner A., Yoon, B., Goebel, W., Wagner, M. 1999. Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR. Appl. Environ. Microbiol. 65:4688-4692.

Campos, L.C., Hofer, E. 1989. Antimicrobial resistance among *Salmonella* serovars isolated from different sources in Brazil during 1978-1983. Antonie van Leeuwenhoek 55:349-359.

Campos Cunha, I., Santos, I., Benoliel, J., Campos, L., Cardoso, L.M., Correia, C., Costa, C., Ferreira, I., Furtado, R., Guimarães, M., Moita, L., Teixeira, J., Tentúgal, O., Torres, L., Saraiva, M.M., Novais, M.R. 1998. Laboratory and epidemiological investigation of foodborne disease outbreaks (1992-1997). Libro de ponencias, comunicaciones y posters, XI Congreso Nacional de Microbiología de los alimentos, Pamplona, 9-11 de Septiembre de 1998.

Carramiñana, J.J., Yanguela, J., Blanco, D., Rota, C., Agustin, A.I., Ariño, A., Herrera, A. 1997. *Salmonella* incidence and distribution of serotypes throughout processing in a Spanish poultry slaughterhouse. J. Food Prot. 60:1312-1317.

CDC. 1997. *Salmonella* serotype Montevideo infections associated with chicks – Idaho, Washington, and Oregon, Spring 1995 and 1996. MMWR. 46(11):237-239.

CDC. 1998. Multistate outbreak of listeriosis – United States, 1998. MMWR 47(50):1085-1086.

CDC. 2000a. Surveillance for foodborne-disease outbreaks – United States, 1993-1997. MMWR 49/SS-1.

CDC. 2000b. Salmonellosis associated with chicks and ducklings – Michigan and Missouri, Spring 1999. MMWR 49(14):297-299.

CDC. 2000c. Multistate outbreak of listeriosis – United States, 2000. MMWR 49(50): 1129-1130.

CDR. 1997. Listeriosis in England and Wales: 1983 to 1996. Communicable Disease Report 7(11):95.

Charpentier, E., Gerbaud, G., Courvalin, P. 1994. Presence of the *Listeria* tetracycline resistance gene *tet*(S) in *Enterococcus faecalis*. Antimicrob. Agents Chemother. 38:2330-2335.

Charpentier, E., Gerbaud, G., Jacquet, C., Rocourt, J., Courvalin, P. 1995. Incidence of antibiotic resistance in *Listeria* species. J. Infect. Dis. 172:277-281.

Charpentier, E., Courvalin, P. 1999. Antibiotic resistance in *Listeria* spp. Antimicrob. Agents Chemother. 43:2103-2108.

Cormican, M., Butler, C., Morris, D., Corbett-Feeney, G., Flynn, J. 1998. Antibiotic resistance amongst *Salmonella enterica* species isolated in the Republic of Ireland. J. Antimicrob. Chemother. 42:116-118.

Curiale, M.S., Lewus, C. 1994. Detection of *Listeria monocytogenes* in samples containing *Listeria innocua*. J. Food Prot. 57:1048-1051.

D'Aoust, J.-Y., Sewell, A.M., Daley, E, Greco, P. 1992. Antibiotic resistance of agricultural and foodborne *Salmonella* isolates: 1986-1989. J. Food Prot. 55:428-434.

D'Aoust, J-Y. 1994. *Salmonella* and the international food trade. Int. J. Food Microbiol. 24:11-31.

D'Aoust, J.-Y. 1997. *Salmonella* species, p. 129-158. M.P. Doyle, L.R. Beuchat, and T.J. Montville (ed.), *In*: Food microbiology fundamentals and frontiers. ASM Press, Washington, D.C.

Dalton, C.B., Austin, C.C., Sobel, J., Hayes, P.S., Bibb, W.F., Graves, L.M., Swaminathan, B., Proctor, M.E., Griffin, P.M. 1997. An outbreak of gastroenteritis and fever due to *Listeria monocytogenes* in milk. N. Engl. J. Med. 336:100-105.

De Simón, M., Tarragó, C., Ferrer, M.D. 1992. Incidence of *Listeria monocytogenes* in fresh foods in Barcelona (Spain). Int. J. Food Microbiol. 16:153-156.

De Simón, M., Ferrer, M.D. 1998. Initial numbers, serovars and phagevars of *Listeria monocytogenes* isolated in prepared foods in the city of Barcelona (Spain). Int. J. Food Microbiol. 44:141-144.

Decreto-Lei nº 289/99, de 29 de Julho. Relativo a aditivos nos alimentos para animais.

Dixon, B. 2000 Antibiotics as growth promoters: risks ans alternatives. ASM News 66:264-265.

Doucet-Populaire, F., Trieu-Cuot, P., Dosbaa, I., Andremont, A., Courvalin, P. 1991. Inducible transfer of conjugative transposon Tn*1545* from *Enterococcus faecalis* to *Listeria monocytogenes* in the digestive tracts of gnotobiotic mice. Antimicrob. Agents Chemother. 35:185-187.

Duffy, G., Cloak, O.M., O'Sullivan, M.G., Guillet, A., Sheridan, J.J., Blair, I.S., McDowell, D.A. 1999. The incidence and antibiotic resistance profiles of *Salmonella* spp. on Irish retail meat products. Food Microbiol. 16:623-631.

Duggan, J., Philips, C.A. 1998. *Listeria* in the domestic environment. Nutrition & Food Science 2:73-79.

Dunne, E., Fey, P., Reporter, R., Mostashari, F., Shillam, P., Wicklund, J., Miller, C., Holland, B., Stamey, K., Barrett, T., Rasheed, J., Tenover, F., Ribot, E., Angulo, F. 2000. Emergence of domestically acquired ceftriaxone-resistant *Salmonella* infections associated with AmpC-type β-lactamase. J. Am. Med. Assoc. 284: 3151-3156.

Dykes, G.A., Geornaras, I., Papathanasopoulos, M.A., von Holy, A. 1994. Plasmid profiles of Listeria species associated with poultry processing. Food Microbiol. 11:519-523.

Esteves, A., Saraiva, C., Ribeiro, P., Patarata, L., Martins, C. 1996. *Listeria monocytogenes* and hygienic quality of raw meat. Livro de resumos "Meat for the Consumer" – 42nd ICoMST 1996.

Estupiñán, J. 1998. Latin American network for the epidemiological surveillance of foodborne diseases - organization and experiences. Proceedings 4th World Congress Foodborne Infections and Intoxications, Berlin, 7-12 June 1998, vol. 1, 81-92. Berlin: Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine.

Evans, S.J., Davies, R.H., Wray, C. 1999. Epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis infection in British poultry flocks, p.313-323. A.M. Saeed, Richard K. Gast, Morris E. Potter, Patrick G. Wall, *In*: *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in humans and animals Epidemiology, pathogenesis, and control. Iowa State University Press / AMES.

Facinelli, B., Giovanetti, E., Varaldo, P.E., Casolari, C., Fabio, U. 1991. Antibiotic resistance in foodborne *Listeria*. Lancet 338:1272.

Facinelli, B., Roberts, M.C., Giovanetti, E., Casolari, C., Fabio, U., Varaldo, P.E. 1993. Genetic basis os tetracycline resistance in food-borne isolates of *Listeria innocua*. Appl. Environ. Microbiol. 59:614-616.

Fantasia, M., Filetici, E. 1994. *Salmonella enteritidis* in Italy. Int. J. Food Microbiol. 21:7-13.

Farber, J.M., Peterkin, P.I. 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol. Rev. 55:476-511.

Farber, J.M., Harwig, J. 1996. The Canadian position on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Food Control 7:253-258.

Farber, J.M., D'Aoust, J.-Y., Diotte, M., Sewell, A., Daley, E. 1998. Survival of *Listeria* spp. on raw whole chickens cooked in microwave ovens. J. Food Prot. 61:1465-1469.

Fey, P.D., Safranek, T.J., Rupp, M.E., Dunne, E.F., Ribot, E., Iwen, P.C., Bradford, P.A., Angulo, F.J., Hinrichs, S.H. 2000. Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from cattle. N. Engl. J. Med. 342:1242-1249.

Fisher, I.S.T. 1997. *Salmonella enteritidis* and *S.typhimurium* in Western Europe for 1993-1995: a surveillance report from Salm-Net. Eurosurveillance 2(1):4-6.

Fisher, I.S.T. 2000. *Salmonella* in Europe – Enter-net report, April-June 2000. Eurosurveillance Weekly 36(4): 7 September 2000.

Franco, C.M., Quinto, E.J., Fente, C., Rodriguez-Otero, J.L., Dominguez, L. Cepeda, A. 1994. Susceptibilities of *Listeria* species isolated from food to nine antimicrobial agents. Antimicrob. Agents Chemother. 38:1655-1657.

Franco, C.M., Quinto, E.J., Fente, C., Rodriguez-Otero, J.L., Dominguez, L. Cepeda, A. 1995. Determination of the principal sources of *Listeria* spp. contamination in poultry meat and a poultry processing plant. J. Food Prot. 58:1320-1325.

Fransen, N.G., van der Elzen. A.M.G., Urlings, B.A.P., Bijker, P.G.H. 1996. Pathogenic micro-organisms in slaughterhouse sludge - a survey. Int. J. Food Microbiol. 33:245-256.

FSIS (Food Safety and Inspection Service). 1999a. HACCP implementation: first year *Salmonella* test results. USDA. http://www.fsis.usda.gov/

FSIS (Food Safety and Inspection Service). 1999b. *Salmonella* serotypes isolated from raw meat and poultry. USDA. http://www.fsis.usda.gov/

FSIS (Food Safety and Inspection Service). 2000. Interim progress report on *Salmonella* testing of raw meat and poultry products. USDA. http://www.fsis.usda.gov/

Genigeorgis, C.A., Dutulescu, D., Garayzabal, J.F. 1989. Prevalence of *Listeria* spp. in poultry meat at the supermarket and slaughterhouse level. J. Food Prot. 52:618-624.

Gilbert, R.J., Miller, K.L., Roberts, D. 1989. *Listeria monocytogenes* and chilled foods. Lancet i:383-384.

Glass, K.A., Doyle, M.P. 1989. Fate of *Listeria monocytogenes* in processed meat products during refrigerated storage. Appl. Environ. Microbiol. 55:1565-1569.

Glynn, M.K., Bopp, C., Dewitt, W., Dabney, P., Mokhtar, M., Angulo, F.J. 1998. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium Dt104 infections in the United States. N. Engl. J. Med. 338:1333-1338.

Gohil, V.S., Ahmed, M.A., Davies, R., Robinson, R.K. 1995. Incidence of *Listeria* spp. in retail foods in the United Arab Emirates. J. Food Prot. 58:102-104.

Griggs, D.J., Hall, M.C., Jin, Y.F., Piddock, J.V. 1994. Quinolone resistance in veterinary isolates of *Salmonella*. J. Antimicrob. Chemother. 33:1173-1189.

Grob, U., Tschape, H., Bednarek, I., Frosch, M. 1998. Antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 17:385-387.

Haapapuro, E.R., Barnard, N.D., Simon, M. 1997. Review – Animal waste used as livestock feed: dangers to human health. Prev. Med. 26:599-602.

Hadorn, K., Hachler, H., Schaffner, A., Kayser, F.H. 1993. Genetic characterization of plasmid-encoded multiple antibiotic resistance in a strain of *Listeria monocytogenes* causing endocarditis. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 12:928-937.

Hakanen, A., Siitonen, A., Kotilainen, P., Huovinen, P. 1999. Increasing fluoroquinolone resistance in salmonellas serotypes in Finland during 1995-1997. J. Antimicrob. Chemother. 43:145-148.

Headrick, M.L., Tollefson, L. 1998. Food borne disease summary by food commodity. Vet. Clin. North Am. Food Animal Practice 14:91-100.

Heger, W., Dierich, M.P., Allerberger, F. 1997. In vitro susceptibility of *Listeria monocytogenes*: comparison of the E test with the agar dilution test. Chemother. 43:303-310.

Herikstad, H., Hayes, P., Mokhtar, M., Fracaro, M.L., Threlfall, E.J., Angulo, F.J. 1997. Emerging quinolone-resistant *Salmonella* in the United States. Emerg. Infect. Dis. 3:371-372.

Heurtin-Le Corre, C., Donnio, P.Y., Bonnier, M., Travert, M.F., Lacourt, A., Avril, J.R. 1998. Incidence croissant de la résistance à l'acide nalidixique et sensibilité aux quinolones des souches de *Salmonella typhimurium* isolées chez l'homme ou l'animal. Path. Biol. 46:587-590.

Hollinger, K., Bager, F., Marano, N., Angulo, F., Aarestrup, F., Tollefson, L., Gerner-Smidt, Wegener, H. Aminoglycoside (AG) resistance in the United States and Denmark: an association between resistance and AG use in food animals, particularly in US poultry. 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. San Francisco CA, September 1999.

Holmberg, S.D., Osterholm, M.T., Senger, K.A., Cohen, M.L. 1984a. Drug-resistant *Salmonella* from animals fed antimicrobials. N. Engl. J. Med. 311:617-622.

Holmberg, S.D., Wells, J.G., Cohen, M.L. 1984b. Animal-to-man transmission of antimicrobial-resistant *Salmonella*: investigations of U.S. outbreaks, 1971-1983. Science August 833-835.

Hudson, J.A., Mott, S.J., Delacy, K.M., Edridge, A.L. 1992. Incidence and coincidence of *Listeria* spp., motile aeromonads and *Yersinia enterocolitica* on ready-to-eat fleshfoods. Int. J. Food Microbiol. 16:99-108.

Hudson, J.A., Mott, S.J. 1993. Presence of *Listeria monocytogenes*, motile aeromonads and *Yersinia enterocolitica* in environmental samples taken from a supermarket delicatessen. Int. J. Food Microbiol. 18:333-337.

Hume, M.E., Byrd, J.A., Stanker, L.H., Ziprin, R.L. 1998. Reduction of caecal *Listeria monocytogenes* in leghorn chicks following treatment with a competitive exclusion culture (PREEMPT^{TM}). Lett. Appl. Microbiol. 26:432-436.

Humphrey, T.J., Mead, G.C., Rowe, B. 1988. Poultry meat as a source of human salmonellosis in England and Wales. Epidemiol. Infect. 100:175-184.

Husu, J.R., Beery, J.T., Nurmi, E., Doyle, M.P. 1990. Fate of *Listeria monocytogenes* in orally dosed chicks. Int. J. Food Microbiol. 11:259-270.

ICMSF. 1996a. *Salmonellae*, p. 217-225. *In*: Microorganisms in Foods 5: Characteristics of Microbial Pathogens. Blackie Academic e Professional.

ICMSF. 1996b. *Listeria monocytogenes*, p. 141-182. *In*: Microorganisms in Foods 5: Characteristics of Microbial Pathogens. Blackie Academic e Professional.

INSA. 1999. Vigilância epidemiológica laboratorial de *Enterobacteriaceae*. Informações Nº1 1999.

INSA. 2000. Vigilância epidemiológica laboratorial de *Enterobacteriaceae*. Informações Nº2 2000.

Inoue, S., Nakama, A., Arai, Y., Kokubo, Y., Maruyama, T., Saito, A., Yoshida, T., Terao, M., Yamamoto, S., Kumagai, S. 2000. Prevalence and contamination levels of *Listeria monocytogenes* in retail foods in Japan. Int. J. Food Microbiol. 59:73-77.

Irwin, R.J., Poppe, C., Messier, S., Finley, G.G., Oggel, J. 1994. A national survey to estimate the prevalence of *Salmonella* species among Canadian registered commercial turkey flocks. Can. J. Vet. Res. 58:263-267.

ISO 6579 (1993). Microbiology. General guidance on methods for the detection of *Salmonella*.

ISO 11290:1 (1996). Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part1: detection method.

Izat, A.L., Kopek, J.M., McGinnis, J.D. 1991. Incidence, number, and serotypes of *Salmonella* on frozen broiler chickens at retail. Poult. Sci. 70:1438-1440.

Jarlier, V., Nicolas, M.-H., Fournier, G., Philippon, A. 1988. Extended broad-spectrum β-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev. Infect. Dis. 10:867-878.

Jay, J.M. 1996. Prevalence of *Listeria* spp. in meat and poultry products. Food Control 7:209-214.

Johnson, J.L., Doyle, M.P., Cassens, R.G. 1990. *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in meat and meat products – a review. J.Food Prot. 53:81-91.

Jones, E.M., MacGowan, A.P. 1995. Antimicrobial chemotherapy of human infection due to *Listeria monocytogenes*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 14:165-175.

Junttila, J.R., Niemela, S.I., Hirn, J. 1988. Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and non-haemolytic listeria. J. Appl. Bacteriol. 65:321-327.

Kaferstein F., Abdussalam M. 1999. Food safety in the 21st century. Bull. WHO 77:347-351.

Kapperud, G., Lassen, J., Hasseltvedt, V. 1998. *Salmonella* infections in Norway: descriptive epidemiology and a case-control study. Epidemiol. Infect. 121:569-577.

Kerr, K.G., Dealler, S.F., Lacey, R.W. 1988. Materno-fetal listeriosis from cook-chill and refrigerated food. Lancet ii:1133.

Khakhria, R., Woodward, D., Johnson, W.M., Poppe, C. 1997. *Salmonella* isolated from humans, animals and other sources in Canada, 1983-92. Epidemiol. Infect. 119:15-23.

Kotula, K.L., Pandya, Y. 1995. Bacterial contamination of broiler chickens before scalding. J. Food Prot. 58: 1326-1329.

Kotula, K.L., Davis, M.E. 1999. Broiler skin sampling for optimum recovery of *Salmonella* spp.. J. Food Prot. 62:284-286.

Lammerding, A.M., Garcia, M.M., Mann, E.D., Robinson, Y., Dorward, W.J., Truscott, R.B., Tittiger, F. 1988. Prevalence of *Salmonella* and thermophilic *Campylobacter* in fresh pork, beef, veal and poultry in Canada. J. Food Prot. 51:47-52.

Larsson, S., Walder, M.H., Cronberg, S.N., Forsgren, A.B., Moestrup, T. 1985. Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* strains isolated from 1958 to 1982 in Sweden. Antimicrob. Agents Chemother. 28:12-14.

Lawrence, L.M., Gilmour, A. 1994. Incidence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing environment and in poultry products and their rapid confirmation by multiplex PCR. Appl. Environ. Microbiol. 60:4600-4604.

Lee, L.A., Threatt, V.L., Puhr, N.D., Levine, P., Ferris, K., Tauxe, R.V. 1993. Antimicrobial-resistant *Salmonella* spp isolated from healthy broiler chickens after slaughter. J. Am. Vet. Med. Assoc. 202:752-755.

Lee, L.A., Puhr, N.D., Maloney, E.K., Bean, N.H., Tauxe, R.V. 1994. Increase in antimicrobial-resistant *Salmonella* infections in the United States, 1989-1990. J. Infect. Dis. 170:128-134.

Lee, W.C., Sakai, T., Lee, M.J., Hamakawa, M., Lee, S.M., Lee, I.M. 1996. An epidemiological study of food poisoning in Korea and Japan. Int. J. Food Microbiol. 29: 141-148.

Levy, S.B. 1998. Multidrug resistance – a sign of the times. N. Eng. J. Med. 338:1376-1378.

Lewis, S.J., Corry, J.E.L. 1991. Survey of the incidence of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* spp. in experimentally irradiated and in matched unirradiated raw chickens. Int. J. Food Microbiol. 12:257-262.

Llanes, C., Kirchgesner, V., Plesiat, P. 1999. Propagation of TEM- and PSE-type β-lactamases among amoxicillin-resistant *Salmonella* spp. isolated in France. Antimicrob. Agents Chemother. 43:2430-2436.

MacGowan, A.P., Reeves, D.S., McLauchlin, J. 1990. Antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes*. Lancet 336:513-514.

MacGowan, A.P., Bowker, K., McLauchlin, J., Bennett, P.M., Reeves, D.S. 1994. The occurrence and seasonal changes in the isolation of *Listeria* spp. in shop bought food stuffs, human faeces, sewage and soil from urban sources. Int. J. Food Microbiol. 21:325-334.

Machado, J. Bernardo, F. 1990. Prevalence of *Salmonella* in chicken carcasses in Portugal. J. Appl. Bacteriol. 69:477-480.

Malorny, B., Schroeter, A., Helmuth, R. 1999. Incidence of quinolone resistance over the period 1986 to 1998 in veterinary *Salmonella* isolates form Germany. Antimicrob. Agents Chemother. 43:2278-2282.

Manie, T., Khan, S., Brozel, V.S., Veith, W.J., Gouws, P.A. 1998. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from slaughtered and retail chickens in South Africa. Lett. Appl. Microbiol. 26:253-258.

Marano, N., Stamey, K., Barret, T., Angulo, F. 1999. High prevalence of gentamicin resistance among selected *Salmonella* serotypes in the US: associated with heavy use of gentamicin in poultry? Infectious Disease Society of America 37th Annual Meeting. Philadelphia PA, November 1999.

Martínez-Martínez, L., Pascual, A., Suárez, A.I., Perea, E.J. 1998. In vitro activities of ketolide HMR 3647, macrolides, and clindamycin against Coryneform bacteria. Antimicrob. Agents Chemother. 42:3290-3292.

Mata, M.T., Baquero, F., Pérez-Diaz, J.C. 2000. A multidrug efflux transporter in *Listeria monocytogenes*. FEMS Microbiol. Lett. 187:185-188.

Matthew, M., Harris, A.M., Marshal, M.J., Ross, G.W. 1975. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of β-lactamases. J. Gen. Microbiol. 88:169-178.

McLauchlin, J. 1996a. The relationship between *Listeria* and listeriosis. Food Control 7:187-193.

McLauchlin, J. 1996b. The role of the Public Health Laboratory Service in England and Wales in the investigation of human listeriosis during the 1980s and 1990s. Food Control 7:235-239.

Mead, P.S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L.F., Bresee, J.S., Shapiro, C., Griffin, P.M., Tauxe, R.V. 1999. Food-related illness and death in the United States. Emerg. Infect. Dis. 5:607-625.

MHR Viandes. 2001. Le site de référence de la filière des viandes françaises. http://www.mhr-viandes.com

Michelet, C., Avril, J.L., Arvieux, C., Jacquelinet, C., Vu, N., Cartier, F. 1997. Comparative activities of new fluoroquinolones, alone or in combination with amoxicillin, trimethoprim-sulfamethoxazole, or rifampin, against intracellular *Listeria monocytogenes*. Antimicrob. Agents Chemother. 41:60-65.

Miettinen, M.K., Siitonen, A., Heiskanen, P., Haajanen, H., Bjorkroth, K.J., Korkeala, H.J. 1999. Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout. 37:2358-2360.

Mishu, B., Koehler, J., Lee, L.A., Rodrigue, D., Brenner, F.H., Blake, P., Tauxe, R.V. 1994. Outbreaks of *Salmonella* enteritidis infections in the United States, 1985-1991. J. Infect. Dis. 169:547-552.

Mlot, C. 2000. Foodborne pathogens increasingly antibiotic resistant. ASM News 66:268-269.

Molbak, K., Baggesen, D.L., Aarestrup, F.M., Ebbesen, J.M., Engberg, J., Frydendahl, K., Gerner-Smidt, P., Petersen, A.M., Wegener, H.C. 1999. An outbreak of multidrug-resistant,

quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium Dt104. N. Engl. J. Med. 341:1420-1425.

Moreno, B., García, M.C. 1993. En carne y productos cárnicos: posibles normas microbiológicas - *Listeria monocytogenes*. Cárnica 2000 – Junio: 41-54.

Mossel, D.A.A., Corry, J.E.L., Struijk, C.B., Baird, R.M. 1995. Diseases of Microbial Origin Transmitted by Foods, p. 111-173. *In*: Essentials of the Microbiology of Foods. Wiley.

Nair. U.S., Saeed, A.M., Muriana, P.M., Kreisle, R.A., Barrett, B., Sinclair, C.L., Fleissner, M.L. 1995. Plasmid profiles and resistance to antimicrobial agents among *Salmonella enteritidis* isolates from human beings and poultry in the midwestern United States. J. Am. Vet. Med. Assoc. 206:1339-1344.

NARMS (National Antimicrobial Resistance Monitoring System). Veterinary Isolates. Final Report 1998. FDA/USDA/CDC. http://www.fda.gov/cvm/index/narms/1998

NARMS (National Antimicrobial Resistance Monitoring System). 1999 Annual Report. National Antimicrobial Resistance Monitoring System for Enteric Bacteria.

Nastasi, A., Mammina, C., Cannova, L. 2000. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis, Southern Italy, 1990-1998. Emerg. Infect. Dis. 6:401-403.

NCCLS (National Commitee for Clinical Laboratory Standards). 1990. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved standard M2-A4. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved standard M7-A2.

NCCLS (National Commitee for Clinical Laboratory Standards). 1997. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved standard M2-A6.

NCCLS (National Commitee for Clinical Laboratory Standards). 1999. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing – ninth informational supplement M100-S9.

Norrung, B. 2000. Microbiological criteria for *Listeria monocytogenes* in foods under special consideration of risk assessment approaches. Int. J. Food Microbiol. 62:217-221.

Notermans, S., Hoogenboom-Verdegaal, A. 1992. Existing and emerging foodborne diseases. Int. J. Food Microbiol. 15:197-205.

Novais, M.R. 1993. Estudo laboratorial e epidemiológico das toxinfecções alimentares (1987-1991). Rev. Port. Nut. vol. IV Nº 2:47-52.

O'Brien S. 2000. Upsurge in *Salmonella typhimurium* DT104 in England and Wales. Eurosurveillance Weekly 36(4): 7 September 2000.

Ojeniyi, B., Wegener, H.C., Jensen, N.E., Bisgaard, M. 1996. *Listeria monocytogenes* in poultry and poultry products: epidemiological investigations in seven Danish abattoirs. J. Appl. Bacteriol. 80:395-401.

Oosterom, J. 1991. Epidemiological studies and proposed preventive measures in the fight against human salmonellosis. Int. J. Food Microbiol. 12:41-52.

Osterholm, M.T. 2000.Emerging infections – another warning. N. Engl. J. Med. 342:1280-1281.

Parecer 98/C407/02, do Comité Económico e Social, de 9 de Setembro de 1998. "A resistência aos antibióticos: Uma ameaça para a saúde pública".

Paziak-Domanska, B., Boguslawska, E., Wieckowska-Szakiel, M., Kotlowski, R., Rózalska, B., Chmiela, M., Kur, J., Dabrowski, W., Rudnicka, W. 1999. Evaluation of the API test, phosphatidylinositol-specific phospholipase C activity and PCR method in identification of *Listeria monocytogenes* in meat foods. FEMS Microbiol. Lett. 171:209-214.

Payne, D.J.H., Scudamore, J.M. 1977. Outbreaks of *Salmonella* food-poisoning over a period of eight years from a common source. Lancet June 11:1249-1251.

Pedersen, K.B., Aarestrup, F.M., Jensen, N.E., Bager, F., Jensen, L.B., Jorsal, S.E., Nielsen, T.K., Hansen, H.C., Meyling, A., Wegener, H.C. 1999. The need for a veterinary antibiotic policy. Vet. Rec. July 10:50-53.

Petersen, L. Madsen, M. 2000. *Listeria* spp. in broiler flocks: recovery rates ans species distribution investigated by conventional culture and the EIAFoss method. Int. J. Food Microbiol. 58:113-116.

Petran, R.L., Swanson, K.M.J. 1993. Simultaneous growth of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*. J. Food Prot. 56:616-618.

Piddock, L.J.V., Wray, C., McLaren, I., Wise, R. 1990. Quinolone resistance in *Salmonella* spp: veterinary pointers. Lancet 336:125.

Piddock, L. 1996. Does the use of antimicrobial agents in veterinary medicine and animal husbandry select antibiotic-resistant bacteria that infect man and compromise antimicrobial chemotherapy?. J. Antimicrob. Chemother. 38:1-3.

Piddock, L.J.V. 1998. Fluoroquinolone resistance. Brit. Med. J. 317:1029-1030.

Pini, P.N., Gilbert, R.J. 1988. The occurrence in the U.K. of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses. Int. J. Food Microbiol. 6:317-326.

Pinner, R.W., Schuchat, A., Swaminathan, B., Hayes, P.S., Deaver, K.A., Weaver, R.E., Plikaytis, B.D., Reeves, M., Broome, C.V., Wenger, J.D. 1992. Role of foods in sporadic listeriosis II. Microbiological and epidemiologic investigation. J. Am. Med. Assoc. 267:2046-2050.

Plummer, R.A.S., Blissett, S.J., Dodd, C.E.R. 1995. *Salmonella* contamination of retail chicken products sold in the UK. J. Food Prot. 58:843-846.

Poppe, C., Irwin, R.J., Messier, S., Finley, G.G., Oggel, J. 1991a. The prevalence of *Salmonella enteritidis* and other *Salmonella* spp. among Canadian registered commercial chicken broiler flocks. Epidemiol. Infect. 107:201-211.

Poppe, C., Irwin, R.J., Forsberg, C.M., Clarke, R.C., Oggel, J. 1991b. The prevalence of *Salmonella enteritidis* and other *Salmonella* spp. among Canadian registered commercial layer flocks. Epidemiol. Infect. 106:259-270.

Poppe, C. 1994. *Salmonella enteritidis* in Canada. Int. J. Food Microbiol. 21:1-5.

Poppe, C. Kolar, J.J., Demczuk, W.H.B, Harris, J.E. 1995. Drug resistance and biochemical characteristics of *Salmonella* from turkeys. Can. J. Vet. Res. 59:241-248.

Poppe, C. McFadden, K.A., Demczuk, W.H.B. 1996. Drug resistance, plasmids, biotypes and susceptibility to bacteriophages of *Salmonella* isolated from poultry in Canada. Int. J. Food Microbiol. 30:325-344.

Poyart-Salmeron, C., Carlier, C., Trieu-Cuot, P., Courtieu, A.-L., Courvalin, P. 1990. Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*. Lancet 335:1422-1426.

Poyart-Salmeron, C., Trieu-Cuot, P., Carlier, C., MacGowan, A., McLauchlin, J., Courvalin, P. 1992. Genetic basis of tetracycline resistance in clinical isolates of *Listeria monocytogenes*. Antimicrob. Agents Chemother. 36:463-466.

Quentin, C., Thibaut, M.C., Horovitz, J., Bebear, C. 1990. Multiresistant strain of *Listeria monocytogenes* in septic abortion. Lancet 336:375.

Qvist, S. 1996. The Danish government position on the control of *Listeria monocytogenes* in foods. Food Control 7:249-252.

Rabsch, W., Hargis, B.N., Tsolis, R.M., Kingsley, R.A., Hinz, K-H., Tschape, H., Baumler, A.J. 2000. Competitive exclusion of *Salmonella Enteritidis* by *Salmonella Gallinarum* in poultry. Emerg. Infect. Dis. 6:443-448.

Ramos, J.M., Alés, J.M., Cuenca-Estrella, M., Férnandez-Roblas, R., Soriano, F. 1996. Changes in susceptibility of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, and *Salmonella virchow* to six antimicrobial agents in a Spanish hospital, 1980-1994. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 15:85-88.

Regulamento nº 508/1999/CE, da Comissão, de 4 de Março. Relativo ao estabelecimento de limites máximos de resíduos de medicamentos veterinários nos alimentos de origem animal.

Regulamento nº 2821/1998/CE, do Conselho, de 17 de Dezembro. Relativo à retirada de autorização de certos antibióticos como aditivos na alimentação para animais.

Riedo, F.X., Pinner, R.W., Tosca, M.L., Cartter, M.L., Graves, L.M., Reeves, M.W., Weaver, R.E., Plikaytis, B.D., Broome, C.V. 1994. A point-source foodborne listeriosis outbreak: documented incubation period and possible mild illness. J. Infect. Dis. 170:693-696.

Rijpens, N.P., Jannes, G., Hernam, L.M.F. 1997. Incidence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat chicken and turkey products determined by polymerase chain reaction and line probe assay hybridization. J. Food Prot. 60:548-550.

Rivera, M.J., Rivera, N., Castillo, J., Rubio, M.C., Gómez-Lus, R. 1991. Molecular and epidemiological study of *Salmonella* clinical isolates. J. Clin. Microbiol. 29:927-932.

Roberts, D. 1991. *Salmonella* in chilled and frozen chicken. Lancet 337:984-985.

Roberts, D. 1993. Food Poisoning – classification, p. 2012-2016. R.Macrae, R.K. Robinson, M.J. Sadler (ed.). *In*: Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition. Academic Press.

Roberts, M.C., Facinelli, B., Giovanetti, E., Varaldo, P.E. 1996. Transferable erythromycin resistance in *Listeria* spp. isolated from food. Appl. Environ. Microbiol. 62:269-270.

Roberts, M.C., Sutcliffe, J., Courvalin, P., Jensen, L.B., Rood, J., Seppala, H. 1999. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance determinants. Antimicrob. Agents Chemother. 43:2823-2830.

Rocourt, J. 1996. Risk factors for listeriosis. Food Control 7:195-202.

Rocourt, J., Cossart, P. 1997. *Listeria monocytogenes*, p. 337-352. M.P. Doyle, L.R. Beuchat, and T.J. Montville (ed.), Food microbiology fundamentals and frontiers. ASM Press, Washington, D.C.

Rocourt, J., Jacquet, Ch., Reilly, A. 2000. Epidemiology of human listeriosis and seafoods. Int. J. Food Microbiol. 62:197-209.

Rodrigue, D.C., Cameron, D.N., Puhr, N.D., Brenner, F.W., St.Louis M.E., Wachsmuth, K., Tauxe, R.V. 1992. Comparison of plasmid profiles, phage types, and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* enteritidis isolates in the United States. J. Clin. Microbiol. 30:854-857.

Rorvik, L.M., Yndestad, M. 1991. *Listeria monocytogenes* in foods in Norway. Int. J. Food Microbiol. 13:97-104.

Rota. C., Yanguela, J., Blanco, D., Carramiñana, J.J., Ariño, A., Herrera, A. 1996. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in 144 *Listeria* isolates from Spanish dairy and meat products. J. Food Prot. 59:938-943.

Rusul, G., Khair, J., Radu, S., Cheah, C.T., Yassin, R.Md. 1996. Prevalence of *Salmonella* in broilers at retail outlets, processing plants and farms in Malaysia. Int. J. Food Microbiol. 33:183-194.

Sakai, T., Chalermchaikit, T. 1996. The major sources of *Salmonella enteritidis* in Thailand. Int. J. Food Microbiol. 31:173-180.

Salamina, G., Dalle Donne, E., Niccolini, A., Poda, G., Cesaroni, D., Bucci, M., Fini, R., Maldini, M., Schuchat, A., Swaminathan, B., Bibb, W., Rocourt, J., Binkin, N., Salmaso, S. 1996. A foodborne outbreak of gastroenteritis involving *Listeria monocytogenes*. Epidemiol. Infect. 117:429-436.

Schlosser, W., Hogue, A., Ebel, E., Rose, B., Umholtz, R., Ferries, K., James, W. 2000. Analysis of *Salmonella* serotypes from selected carcasses and raw ground products sampled prior to implementation of the pathogen reduction; Hazard analysis and critical control point final rule in the US. Int. J. Food Microbiol. 58:107-111.

Schlech, W.F. 1996. Overview of listeriosis. Food Control 7:183-186.

Schmidt, K. 1998. Situation of foodborne diseases in Europe, 1992-1996. Proceedings 4th World Congress Foodborne Infections and Intoxications, Berlin, 7-12 June 1998, vol. 1, 262-266. Berlin: Federal Institute for Health Protection of Consumers and Veterinary Medicine.

Schneitz, C., Nuotio, L., Mead, G., Nurmi, E. 1992. Competitive exclusion in the young bird: challenge models, administration and reciprocal protection. Int. J. Food Microbiol. 15:241-244.

Schonberg, A., Teufel, P., Weise, E. 1989. Serovars of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from food. Acta Microbiol. Hung. 36:249-253.

Schuchat, A., Swaminathan, B., Broome, C.V., 1991. Epidemiology of human listeriosis. Clin. Microbiol. Rev. 4:169-183.

Schuchat, A., Deaver, K.A., Wenger, J.D., Plikaytis, B.D., Mascola, L., Pinner, R.W., M., Reingold, A.L., Broome, C.V., 1992. Role of foods in sporadic listeriosis I. Case-control study of dietary risk factors. J. Am. Med. Assoc. 267:2041-2045.

Schwartz, B., Ciesielski, C.A., Broome, C.V., Gaventa, S., Brown, G.E., Gellin, B.G., Hightower, A.W., Mascola, L. 1988. Association os sporadic listeriosis with consumption of uncooked hot dogs and undercooked chicken. Lancet ii:779-782.

Scuderi, G., Fantasia, M., Filetici, E., Anastasio, M.P. 1996. Foodborne outbreaks caused by *Salmonella* in Italy, 1991-4. Epidemiol. Infect. 116:257-265.

Sergelidis, D., Abrahim, A., Sarimvei, A., Panoulis, C., Karaioannoglou, P., Genigeorgis, C. 1997. Temperature distribution and prevalence of *Listeria* spp. in domestic, retail and industrial refrigerators in Greece. Int. J. Food Microbiol. 34:171-177.

Seyfarth, A.M., Wegener, H.C., Frimodt-Moller, N. 1997. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *typhimurium* from humans and production animals. J. Antimicrob. Chemother. 40:67-75.

Shank, F.R., Elliot, E.L., Wachsmuth, I.K., Losikoff, M.E. 1996. US position on *Listeria monocytogenes* in foods. Food Control 7:229-234.

Shannon, K., French, G. 1998. Multiple-antibiotic-resistant salmonella. Lancet 352:490.

Sheridan, J.J., Duffy, G., McDowell, D.A., Blair, I.S. 1994. The occurrence and initial numbers of *Listeria* in Irish meat and fish products and the recovery of injured cells from frozen products. Int. J. Food Microbiol. 22:105-113.

Shryock, T.R. 1999. Relationship between usage of antibiotics in food-producing animals and the appearance of antibiotic resistant bacteria. Int. J. Antimicrob. Agents 12:275-278.

Sinell, H-J. 1995. Control of food-borne infections and intoxications. Int. J. Food Microbiol. 25:209-217.

Skovgaard, N., Morgen C.-A. 1988. Detection of *Listeria* spp. in faeces from animals, in feeds, and in raw foods of animal origin. Int. J. Food Microbiol. 6:229-242.

Slade, P.J., Collins-Thompson, D.L. 1990. *Listeria*, plasmids, antibiotic resistance, and food. Lancet 336:1004.

Slutsker, L., Altekruse, S.F., Swerdlow, D.L. 1998. Foodborne diseases emerging pathogens and trends. Infect. Dis. Clin. North. Am. 12:199-216.

Sockett, P.N. 1993. Food Poisoning – statistics, p. 2023-2031. R.Macrae, R.K. Robinson, M.J. Sadler (ed.). *In*: Encyclopaedia of Food Science, Food Technology and Nutrition. Academic Press.

Soriano, F., Zapardiel, J., Nieto, E. 1995. Antimicrobial susceptibilities of *Corynebacterium* species and other non-spore-forming Gram-positive bacilli to 18 antimicrobial agents. Antimicrob. Agents Chemother. 39:208-214.

Soriano, F., Fernández-Roblas, R., Calvo, R., García-Calvo, G. 1998. In vitro susceptibilities of aerobic and facultative non-spore-forming Gram-positive bacilli to HMR 3647 (RU 66647) and 14 other antimicrobials. Antimicrob. Agents Chemother. 42:1028-1033.

Sousa, J.C., Peixe, L.V., Ferreira, H., Pinto, M.E., Nascimento, M.J., Sousa, M.I., Cabral, M. 1998. Antimicrobianos, p.239-269. Canas Ferreira, W., Sousa, J.C. *In*: Microbiologia vol.1. Lidel.

Stephenson. J. 1998. Fighting flora with flora: FDA approves an Anti-*Salmonella* spray for chickens. J. Am. Med. Ass. 279:1152.

Tappero, J.W., Schuchat, A., Deaver, K.A., Mascola, L., Wenger, J.D. 1995. Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States – Effectiveness of prevention efforts?. J. Am. Med. Assoc. 273:1118-1122.

Tassios, P.T., Markogiannakis, A., Vatopoulos, A.C., Katsanikou, E., Velonakis, E.N., Kourea-Kremastinou, J., Legakis N.J. 1997. Molecular epidemiology of antibiotic resistance of *Salmonella enteritidis* during a 7-year period in Greece. J. Clin. Microbiol. 35:1316-1321.

Tauxe R.V. 1997. Emerging foodborne diseases: an evolving public health challenge. Emerg. Infect. Dis. 3:425-434.

Telo, A., Beli, E., Dibra, A., Panariti, E. 1998. Incidence of *Salmonella* strains in imported poultry meat and eggs into Albania. Fleischwirtschaft 78:231-232.

Temple, M.E., Nahata, M.C. 1999. Treatment of listeriosis. Ann. Pharmacother. 34:656-661.

Threlfall, E.J., Rowe, B., Ward, L.R. 1993. A comparison of multiple drug resistance in Salmonellas from humans and food animals in England and Wales, 1981 and 1990. Epidemiol. Infect. 111:189-197.

Threlfall, E.J., Frost, J.A., Ward, L.R., Rowe, B. 1996. Increasing spectrum of resistance in multiresistant *Salmonella typhimurium*. Lancet 347:1053-1054.

Threlfall, E.J., Ward, L.R., Rowe, B. 1997a. Increasing incidence of resistance to trimethoprim and ciprofloxacin in epidemic *Salmonella typhimurium* DT104 in England ans Wales. Eurosurveillance 2:81-83.

Threlfall, E.J., Ward, L.R., Skinner, J.A., Rowe, B. 1997b. Increase in multiple antibiotic resistance in nontyphoidal Salmonellas from humans in England and Wales: a comparison of data for 1994 and 1996. Microb. Drug Resist. 3:263-266.

Threlfall, E.J., Ward, L.R., Rowe, B. 1998. Multiresistant *Salmonella typhimurium* DT 104 and Salmonella bacteraemia. Lancet 352:287-288.

Tollefson, L. 1996. FDA reveals plans for antimicrobial susceptibility monitoring. J. Am. Vet. Med. Assoc. 4:459-460.

Tollefson, L., Angulo, F.J., Fedorka-Cray, P.J. 1998. National surveillance for antibiotic resistance in zoonotic enteric pathogens. Vet. Clin. North Amer. 14: 141-150.

Tollefson, L., Miller, M.A. 2000. Antibiotic use in food animals: controlling the human health impact. J. AOAC Int. 83:245-254.

Tsakris, A., Papa, A., Douboyas, J., Antoniadis, A. 1997. Neonatal meningitis due to multi-resistant *Listeria monocytogenes*. J. Antimicrob. Chemother. 39:553-554.

Uyttendaele, M.R., Neyts, K.D., Lips, R.M., Debevere, J.M. 1997. Incidence of *Listeria monocytogenes* in poultry and poultry products obtained from Belgium and French abbatoires. Food Microbiol. 14:339-345.

Uyttendaele, M.R., Debevere, J.M., Lips, R.M., Neyts, K.D. 1998. Prevalence of *Salmonella* in poultry carcasses and their products in Belgium. Int. J. Food Microbiol. 40:1-8.

Uyttendaele, M., De Troy, P. Debevere, J. 1999. Incidence of *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, and *Listeria monocytogenes* in poultry carcasses and different types of poultry products for sale on the Belgian retail market. J. Food Prot. 62:735-740.

Van den Bogaard, A.E., Stobberingh, E.E. 1999. Antibiotic usage in animals Impact on bacterial resistance and public health. Drugs 58:589-607.

Varabioff, Y. 1990. Incidence and recovery of *Listeria* from chicken with a pre-enrichment technique. J. Food Prot. 53:555-557.

Vatopoulos, A.C., Mainas, E., Balis, E., Threlfall, E.J., Kanelopoulou, M., Kalapothaki, V., Malamou-Lada, H., Legakis N.J. 1994. Molecular epidemiology of ampicillin-resistant clinical isolates of *Salmonella enteritidis*. J. Clin. Microbiol. 32:1322-1325.

Wang, G.-H., Yan, K.-T. Feng, X.-M., Chen, S.-M., Lui, A.-P., Kokubo, Y. 1992. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* from retail meats in Beijing. J. Food Prot. 55:56-58.

Ward, L.RI, Threlfall, J., Smith, H.R., O'Brien, S.J. 2000. *Salmonella enteritidis* epidemic. Science 287:1753-1754.

Wegener, H.C. 1999. The consequences for food safety of the use of fluoroquinolones in food animals. N. Engl. J. Med. 340:1581-1582.

WHO Working Group. 1988. Foodborne listeriosis. Bull. WHO 66:421-428.

WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe. 1992. Fifth report, 1985-1989. Institute of Veterinary Medicine, Berlin.

WHO. 1997. The medical impact of antimicrobial use in food animals. Report of a WHO Meeting. Berlin, Germany, 13-17 October 1997. WHO/EMC/ZOO/97.4.

WHO. 1998. Major gaps in research on antibiotic resistance need filling. Press Release WHO/46. 9 June 1998.

WHO Surveillance Programme for Control of Foodborne Infections and Intoxications in Europe. 2000a. Seventh report, 1993-1998. Institute of Veterinary Medicine, Berlin.

WHO. 2000b. WHO Global Principles for the Containment of Antimicrobial Resistance in Animals Intended for Food.

Wierup, M., Engstrom, B., Engvall, A., Wahlstrom H. 1995. Control of *Salmonella enteritidis* in Sweden. Int. J. Food Microbiol. 25:219-226.

Wilson, I.G. 1995. Occurrence of *Listeria* species in ready to eat foods. Epidemiol. Infect. 115:519-526.

Wong, H.-C., Chao, W.-L., Lee, S.-J. 1990. Incidence and characterization of *Listeria monocytogenes* in foods available in Taiwan. Appl. Environ. Microbiol. 56:3101-3104.

Wray, C., McLaren, I.M., Beedell, Y.E. 1993. Bacterial resistance monitoring of Salmonellas isolated from animals, national experience of surveillance schemes in the United Kingdom. Vet. Microbiol. 35:313-319.

FACULDADE DE FARMÁCIA DO PORTO BIBLIOTECA