



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

---

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ESTIRPES DE *SALMONELLA* SPP. E  
*LISTERIA MONOCYTOGENES* DE BIOFILMES EM AMBIENTE DE ABATEDOUROS  
FRIGORÍFICOS BOVINOS E DE AVES LOCALIZADOS NO DISTRITO FEDERAL E  
ESTADO DE GOIÁS**

**EMILIA FERNANDA AGOSTINHO DAVANZO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
EM SAÚDE ANIMAL**

**BRASÍLIA / DF  
MAIO / 2020**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ESTIRPES DE *SALMONELLA* SPP. E  
*LISTERIA MONOCYTOGENES* DE BIOFILMES EM AMBIENTE DE ABATEDOUROS  
FRIGORÍFICOS BOVINOS E DE AVES LOCALIZADOS NO DISTRITO FEDERAL E  
ESTADO DE GOIÁS**

**EMILIA FERNANDA AGOSTINHO DAVANZO**

**ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> ANGELA PATRÍCIA SANTANA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
EM SAÚDE ANIMAL**

**PUBLICAÇÃO: 171 / 2020**

**BRASÍLIA / DF  
MAIO / 2020**

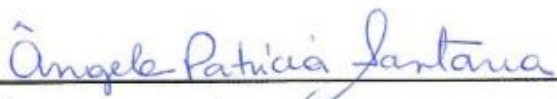
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ESTIRPES DE *SALMONELLA* SPP. E *LISTERIA MONOCYTOGENES* DE BIOFILMES EM AMBIENTE DE ABATEDOUROS FRIGORÍFICOS BOVINOS E DE AVES LOCALIZADOS NO DISTRITO FEDERAL E ESTADO DE GOIÁS

EMILIA FERNANDA AGOSTINHO DAVANZO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM SAÚDE ANIMAL


APROVADA POR:



ÂNGELA PATRÍCIA SANTANA, Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. (Universidade de Brasília - UnB)  
(ORIENTADOR)



CRISTIANO SALES PRADO, Prof. Dr. (Universidade Federal de Goiás - UFG)  
(EXAMINADOR EXTERNO)



MARCOS BRYAN HEINEMANN, Prof. Dr. (Universidade de São Paulo - USP)  
(EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA/DF, 29 DE MAIO DE 2020

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

DAVANZO, E. F. A. **Caracterização molecular de estirpes de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* de biofilmes em ambiente de abatedouros frigoríficos bovinos e de aves localizados no Distrito Federal e estado de Goiás.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2020, 94 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e achase arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Davanzo, Emilia Fernanda Agostinho

Caracterização molecular de estirpes de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* de biofilmes em ambiente de abatedouros frigoríficos bovinos e de aves localizados no Distrito Federal e estado de Goiás. / Emilia Fernanda Agostinho Davanzo; orientação de Angela Patrícia Santana, 2020. 94p.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2020.

1. Biofilme. 2. Internalina A. 3. Resistência antimicrobiana. 4. PFGE. I. Santana, A. P. II. Título.

CDD ou CDU  
Agris / FAO

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais e familiares, agradeço por me proporcionarem as condições para chegar onde cheguei, e por moldarem o meu caráter. À minha irmã, agradeço por ser sempre minha maior apoiadora, não importando o caminho que escolho trilhar. Também agradeço aos meus animais, que fazem a minha vida melhor pelo simples fato de existirem.

Agradeço a todos os membros do LAMAL, técnicos e alunos, por todo o apoio durante o desenvolvimento deste trabalho, e por fazerem meu dia-a-dia muito mais divertido. Em especial, agradeço o apoio do Virgílio, uma vez que, sem ele, tudo seria muito mais complicado.

Às queridas pós graduandas, Joana e Rebecca, que iluminam meus dias com sua presença e foram da mais importante ajuda nos últimos anos, muito obrigada! Obrigada aos meus primos, à Vivi, e a todos que me deram apoio fora do laboratório. Vocês foram e continuam sendo fundamentais.

Agradeço também a todos os que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desse trabalho, como os integrantes do LABENT, da FIOCRUZ/RJ, do Laboratório de Microbiologia Médica Veterinária e do Laboratório de Terapia Gênica da FAV/UnB, dentre outros.

Agradeço à professora Angela Patrícia por toda a paciência e cuidado na orientação, e por confiar no meu trabalho como aluna e como técnica.

Por fim, agradeço ao apoio financeiro que viabilizou esse projeto, incluindo a FAPDF (edital demanda espontânea n.3/2016), a CAPES e ao DPG e PPSA da Universidade de Brasília.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Resultado da PCR para confirmação de *Listeria monocytogenes* de 10 estirpes isoladas de abatedouros frigoríficos localizados na região do Distrito Federal e Estado de Goiás, pela utilização dos *primers* LIP1 e LIP2A, com amplificação de fragmentos com 274 bp. De 1, 9, 17 e 25: DNA ladder 100bp (Invitrogen®); número 2: controle negativo; número 3: estirpe controle positivo; números 4, 6, 8, 11, 12, 13, 15, 19, 23 e 28: estirpes com resultado positivo para a PCR ..... 25
- Figura 2.** Resultado da sorotipificação por PCR multiplex das estirpes de *Listeria monocytogenes*. Números 1,9 e 17: DNA ladder 100 bp (Invitrogen®); Números 4,7,8,11,12,13,14,15,16,18,20 e 22: estirpes que amplificaram o gene-alvo *lmo0737*. Todos os isolados amplificaram apenas o gene-alvo *lmo0737* (691 pb), classificando-as como sorotipo 1/2a ou 3a (linhagem II) ..... 32
- Figura 3.** Dendograma (método UPGMA baseado no coeficiente de correlação de Dice a 1,5% de tolerância) e padrões de PFGE dos 14 isolados de *L. monocytogenes* submetidos a restrição com a enzima *AscI*. Os dados foram analisados pelo software BioNumerics®. Pulsotipos, *clusters*, origem dos isolados (Distrito Federal ou Goiás), estabelecimento de origem (A, B ou C) e identificação do isolado ..... 35
- Figura 4.** Resultados dos testes de invasão e adesão em células Caco-2 dos 14 isolados de *Listeria monocytogenes*. Todos os testes foram realizados em triplicata. Os valores apresentados são a média simples dos resultados, e as barras representam o desvio padrão ..... 39
- Figura 5.** Resultados do teste de capacidade de formação de biofilme in vitro em microplacas de poliestireno (DJORDJEVIC et al., 2002) dos 12 isolados de *L. monocytogenes* que apresentaram capacidade de formação de biofilme a 37°C e/ou a 12°C. As barras representam a média de leitura da densidade óptica de cada ensaio para cada isolado (DOi), todos realizados em triplicata, subtraídos da média da densidade óptica do controle negativo para cada repetição (DON) ..... 58

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em *swabs* de instalações, equipamentos e utensílios de abatedouros frigoríficos de aves localizados no Distrito Federal e Estado de Goiás ..... 24
- Tabela 2.** Antibiograma dos 14 isolados de *Listeria monocytogenes*, oriundos de abatedouros frigoríficos de aves localizados na região do Distrito Federal e Goiás, realizados por meio dos testes de difusão em disco para resistência antimicrobiana (CLSI, 2020) ..... 40
- Tabela 3.** Padrões de resistência antimicrobiana apresentados pelos 14 isolados de *L. monocytogenes* oriundos de abatedouros frigoríficos localizados na região do Distrito Federal e Goiás ..... 41
- Tabela 4.** Detecção por PCR de genes de resistência antimicrobiana nos 14 isolados de *Listeria monocytogenes* oriundos de abatedouro frigorífico, localizados na região do Distrito Federal e Goiás ..... 44
- Tabela 5.** Antibiograma e detecção de genes de resistência antimicrobiana dos quatro isolados de *Listeria monocytogenes* multirresistentes oriundos de abatedouro frigorífico localizado no estado de Goiás (estabelecimento C)..... 49
- Tabela 6.** Antibiograma e detecção de genes de resistência antimicrobiana do isolado de *Salmonella enterica* sorovar Ruiru oriundo de abatedouro frigorífico de aves localizado no Distrito Federal, realizado por meio do teste de difusão em disco (CLSI, 2020) e por WGS, respectivamente ..... 53
- Tabela 7.** Resultados do teste de capacidade de formação de biofilmes *in vitro*, em microplaca de poliestireno, dos 14 isolados de *L. monocytogenes* de acordo com a classificação proposta por STEPANOVIĆ *et al.*, 2000. DOi: densidade óptica do isolado. Os valores de densidade óptica do controle negativo (DOn) são: DOn a 37°C: 0.0513 e DOn a 12°C: 0.060 ..... 56

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIEC	Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes
BHI	Brain Heart Infusion
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BPLS	Ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol
BS	Ágar bismuto sulfito
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DF	Distrito Federal
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DTA	Doença transmissível por alimentos
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
INLA	Internalina A
INLB	Internalina B
ISO	International Organization for Standardization
LABENT	Laboratório de Enterobactérias
LAMAL	Laboratório de Microbiologia de Alimentos
LLO	Listerioliosina O
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MH	Ágar Müller-Hinton
MOI	Multiplicidade de infecção
MOX	Ágar Modified Oxford
MR	Multirresistência
PBS	Tampão fosfato-salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	Eletroforese de Gel em Campo Pulsado
PMSCs	<i>Premature Stop Codons (Stop Codons Prematuros)</i>
RAM	Resistência antimicrobiana
TSA	Triple Soy Ágar
TSB	Caldo Triple Soy
TSI	Ágar tríplice açúcar ferro
UFC	Unidades formadoras de colônia
UPGMA	Unweighted pair group method using arithmetic average
UVM	Caldo University Vermont modified
VM	Prova de Vermelho de Metila
VP	Prova de Vorges-Proskauer
WGS	Sequenciamento completo do genoma
XLD	Ágar xilose-lisina-desoxicolato



## SUMÁRIO

RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVOS .....	6
2.1. Objetivo geral .....	6
2.2. Objetivos específicos .....	6
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	7
3.1. Origem das amostras .....	7
3.2. Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	9
3.3. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp. ....	10
3.4. Confirmação de detecção de <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Salmonella</i> spp. por PCR .....	11
3.5. Sorotipagem dos isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> por PCR .....	11
3.6. Determinação do sorotipo de <i>Salmonella</i> spp. ....	13
3.7. Identificação dos pulsotipos de <i>Listeria monocytogenes</i> por PFGE.....	13
3.8. Análise da sequência do gene <i>inlA</i> dos isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	14
3.9. Teste de invasão e adesão celular em células Caco-2 dos isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	15
3.9.1. Ensaio de adesão celular dos isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	16
3.9.2. Ensaio de invasão celular dos isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	17
3.10. Resistência Antimicrobiana dos isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	17
3.11. Pesquisa de genes de resistência antimicrobiana dos isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	18
3.12. Resistência Antimicrobiana de <i>Salmonella</i> spp. ....	20
3.13. Pesquisa de genes de resistência antimicrobiana de <i>Salmonella</i> spp. ....	20
3.14. Capacidade de formação de biofilme <i>in vitro</i> de isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Salmonella</i> spp. ....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1. Pesquisa e isolamento de <i>Listeria monocytogenes</i> em abatedouros de aves e bovinos. 23	
4.2. Pesquisa e isolamento de <i>Salmonella</i> spp. em abatedouros de aves e bovinos.....	29
4.3. Sorotipificação dos isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Salmonella</i> spp. ....	31
4.3.1. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	31
4.3.2. <i>Salmonella</i> spp. ....	33
4.4. Identificação de pulsotipos de <i>Listeria monocytogenes</i> por PFGE .....	34
4.5. Análise da sequência dos fragmentos do gene <i>inlA</i> .....	37
4.6. Ensaio de adesão e invasão de células Caco-2 dos isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	38
4.7. Antibiograma e detecção de genes de resistência antimicrobiana de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	40
4.8. Antibiograma e detecção de genes de resistência antimicrobiana de <i>Salmonella</i> spp. ..	51
4.9. Capacidade de formação de biofilme de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	56
4.10. Capacidade de formação de biofilme de <i>Salmonella</i> spp. ....	59
5. CONCLUSÕES .....	60
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	61
ANEXOS .....	74

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi realizar a caracterização molecular de estirpes de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. isoladas de biofilmes de ambientes de abatedouros frigoríficos de aves e bovinos localizados no Distrito Federal e estado de Goiás. Objetivou-se caracterizar os isolados de *L. monocytogenes* através da sorotipificação e através da análise de variabilidade genética pela técnica da PFGE. Para *Salmonella* spp., objetivou-se realizar caracterização pela análise do WGS. Realizou-se a análise da sequência de fragmentos do gene *inlA* nos isolados de *L. monocytogenes* para detecção de PMSCs. Para avaliação do potencial patogênico desses isolados, realizou-se o teste de adesão e invasão em cultivo de células Caco-2, além da detecção de resistência antimicrobiana em todos os isolados através de antibiograma pela técnica de difusão em disco e pesquisa de genes de resistência antimicrobiana por PCR, no caso dos isolados de *L. monocytogenes*, e WGS, para o isolado de *Salmonella* spp.. Avaliou-se a capacidade de formação de biofilme dos isolados a 37°C e 12°C, com 24 e 168 horas de incubação respectivamente, pelo teste em microplaca de poliestireno. Foram detectados 14 isolados de *L. monocytogenes* e um (01) isolado de *Salmonella* spp. em dois dos três abatedouros frigoríficos de aves estudados. Nenhum isolado foi detectado nos dois abatedouros frigoríficos de bovinos. Todos os isolados de *L. monocytogenes* perteceram à linhagem II (sorotipo 1/2a), e foram observados 11 pulsotipos diferentes. O isolado de *Salmonella* foi identificado como *Salmonella enterica* sorovar Ruiru. Não foram detectados PMSCs no sequenciamento do gene da *inlA* dos isolados de *L. monocytogenes*, e todos estes isolados foram capazes de aderir em células Caco-2, enquanto 50% deles foram também capazes de invasão das células. Foi detectada resistência antimicrobiana em 57,1% dos isolados de *L. monocytogenes*, sendo a resistência às sulfonamidas a mais observada. Foram detectados os genes *tetC*, *ermB* e *tetM*, e quatro dos isolados detectados foram classificados com multirresistentes. O isolado de *Salmonella* spp. apresentou resistência a 9 antimicrobianos e foi classificada como multirresistente, e foram detectados os genes de resistência *qnrB19*, *blaCMY-2*, *aac(6')-1aa*, *sul2* e *tetA*, além de mutação no gene *parC* p. T57S. 78,5% dos isolados de *L. monocytogenes* foram capazes de formação de biofilme a 37°C/ 24h de incubação e 64,3% foram capazes de formação de biofilme a 12°C/168h de incubação. Não houve diferença estatística na capacidade de formação de biofilme nas diferentes temperaturas avaliadas. O isolado de *Salmonella* spp. foi capaz de formar biofilme em ambas as

temperaturas testadas. A caracterização dos biofilmes, bem como a sua presença nos estabelecimentos abatedouros frigoríficos de aves deste estudo foi confirmada pelas coletas repetidas dos mesmos pontos, e pelo teste de capacidade de formação de biofilme *in vitro*. Desta forma, estes resultados ressaltam o risco potencial de contaminação cruzada nos ambientes de abatedouros frigoríficos de aves. Os testes de adesão e invasão, aliados à ausência de PMSCs nos isolados de *L. monocytogenes*, à resistência antimicrobiana e à observação de isolados multirresistentes para os dois microrganismos detectados demonstram o risco potencial para a saúde pública, e destacam a importância da vigilância e manutenção de programas de controle de patógenos dentro da indústria de produção de carnes.

## ABSTRACT

The aim of this study was to perform the molecular characterization of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. strains isolated from biofilms in poultry and bovine slaughter plants located in Distrito Federal and Goiás state. Strain serotyping was performed via PCR for *L. monocytogenes* and WGS for *Salmonella*. Genetic polymorphism of *L. monocytogenes* strains was evaluated via PGFE. Sequence analysis of *inlA* gene fragments was performed aiming PMSCs detection. For assessment of pathogenic potential, adhesion and invasion essays using Caco-2 cells were performed with all *L. monocytogenes* strains. Antibiotic resistance profile was also assessed by disk-diffusion test, in addition to detection of resistance genes via PCR, regarding *L. monocytogenes* strains, and WGS for *Salmonella* spp. strain. Assessment of biofilm formation ability was performed by polystyrene microplate test at 12°C and 37°C in 24 and 168 hours of incubation respectively. It was detected 14 *L. monocytogenes* isolates and one *Salmonella* spp. isolate in two out of the three evaluated poultry slaughter plants. No isolate was detected in bovine slaughter plants. All *L. monocytogenes* isolates belonged to lineage II (serotype 1/2a), and 11 pulsotypes were detected. The *Salmonella* strain was identified as *Salmonella enterica* serovar Ruiru. No PMSCs were detected in the *inlA* gene sequence fragments analysed in this study, and the *L. monocytogenes* isolates were capable of Caco-2 cell adhesion, while 50% of them were also capable of Caco-2 cell invasion. Antimicrobial resistance was detected in 57.1% of the *L. monocytogenes* strains, and sulphonamides resistance was the most detected resistance. It was detected the resistance genes *tetC*, *ermB* and *tetM*, and four of the isolates were classified as multiresistant strains. *Salmonella* spp. strain presented resistance to nine antimicrobials and was classified as multiresistant, and it was detected the resistance genes *qnrB19*, *blaCMY-2*, *aac(6')-1aa*, *sul2* and *tetA*, besides the *parC* gene mutation p.T57S. 78.5% and 64.3% of *L. monocytogenes* strains showed biofilm formation ability at 37°C/ 24h incubation and 12°C/ 168h incubation respectively. There was no significant difference in biofilm formation ability between the two evaluated temperatures. Biofilm characterization, along with bacterial presence in poultry slaughter plants analysed in this study, was confirmed by repeated and serial sampling at the same sampling points associated with biofilm formation ability *in vitro* essays. The results presented highlight the potential risk of cross-contamination in poultry slaughter plants. Adhesion and invasion essays, along with PMSCs absence in *L. monocytogenes* strains,

and detection of antimicrobial resistance and multiresistant isolates in both evaluated microorganisms, highlight the potential risk regarding public health, and therefore show the importance of surveillance and maintenance of pathogen control programs in the meat production industry.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, totalizando 214 milhões de cabeças e representando 13% do total mundial, segundo dados de 2018 apresentados pela Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes (ABIEC, 2019). Houve produção de 10,96 milhões de toneladas de carne bovina em 2018 no país, dos quais 20,1% foram destinados à exportação e o restante para o consumo interno, que fez em 2018 um consumo de 42,12 quilos de carne per capita (ABIEC, 2019). Ainda segundo a ABIEC (2019), essa produção garantiu ao Brasil a posição de segundo maior produtor mundial de carne bovina. O Brasil é também o maior exportador de carne bovina do mundo, com um volume de 2205,2 toneladas de carne exportadas em 2018 (ABIEC, 2019). A indústria possui uma capacidade de abate de quase 200 mil bovinos/dia e está continuamente evoluindo e aprimorando o bem-estar animal e a segurança higienicossanitária dos produtos para garantir a competitividade e a abrangência de mercado (EMBRAPA, 2017). Assim como a bovinocultura, a avicultura brasileira é altamente produtiva devido a investimentos nas áreas de genética, nutrição, manejo, biossegurança e à implementação de programas de qualidade que incluem o bem-estar animal e a preservação do meio ambiente (ABPA, 2016). O Sindicato das Indústrias de Produtos Avícolas do Estado do Paraná (SINDIAVIPAR) forneceu dados sobre a exportação brasileira no ano de 2018. Segundo esses dados, 4,3 milhões de toneladas de carne de frango foram exportadas, fazendo com que o Brasil ficasse à frente da China e dos Estados Unidos, tornando-se o maior exportador de carne de frango em 2016 (SINDIAVIPAR, 2018) e mantendo-se como o maior exportador em 2018 (ABPA, 2019).

A globalização e o aumento da conscientização dos consumidores fizeram com que a procura por alimentos de alta qualidade microbiológica crescesse (BEZZERA & MARTINS, 2008). A condição higienicossanitária do ambiente industrial é um fator essencial para produção e comercialização de alimentos que sejam seguros e de qualidade, já que as carnes e os produtos cárneos estão diretamente envolvidos na ocorrência das Doenças Transmissíveis por Alimentos (DTA's) por advirem de animais que possuem diversos microrganismos em sua microbiota natural, podendo assim contaminar as carcaças durante o processo de abate ou serem contaminadas por microrganismos carreados pelos manipuladores, utensílios e água (MATSUBARA, 2005; LUNDGREN *et al.*, 2009).

O gênero *Listeria* compreende vinte diferentes espécies, das quais seis são classificadas como *Listeria sensu stricto*: *Listeria marthii*, *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri* e *Listeria welshimeri* (LUQUE-SASTRE *et al.*, 2018; LECLERCQ *et al.*, 2019). Destas espécies, *Listeria monocytogenes* é descrita como o principal agente etiológico de listeriose em humanos (LUQUE-SASTRE *et al.*, 2018). A associação da *Listeria monocytogenes* com doenças graves de origem alimentar sugere que a contaminação do alimento seja a principal forma de transmissão da listeriose humana (SCHLECH *et al.*, 1983; SCALLAN *et al.*, 2011; CAMARGO *et al.*, 2017; JACKSON *et al.*, 2018). A maior parte dos casos em humanos ocorre em pacientes imunossuprimidos, sendo que outros grupos de risco são idosos, diabéticos, portadores de HIV, pacientes de diálise renal, portadores de transplantes e alcoólatras (BARBUDDHE *et al.*, 2015; CAMARGO *et al.*, 2017). Sendo uma bactéria psicrófila, encontra condições favoráveis ao seu desenvolvimento dentro da indústria, em superfícies como ralos, equipamentos e chão (CARPENTIER & CERF, 2011).

O gênero *Salmonella*, responsável pela salmonelose, consiste em duas espécies: a *Salmonella enterica* e a *Salmonella bongori*. A espécie *Salmonella enterica* é subdividida em mais de 2600 sorotipos em relação à base somática (O), flagelar (H), e antígenos de polissacarídeos capsulares (Vi) (GUIBOURDENCHE *et al.*, 2010). Frequentemente identificada como o agente etiológico de surtos alimentares, seu estudo e pesquisa tem grande importância para a saúde pública, pois causa uma enfermidade de difícil controle, já que apresenta uma extensa gama de reservatórios, ampla distribuição no ambiente e portadores assintomáticos, favorecendo sua disseminação (GOUVÊA, 2009).

Atualmente o desafio no abate e processamento das carnes é evitar não apenas a contaminação direta por essas bactérias, mas também a contaminação cruzada dos produtos cárneos durante sua industrialização (LEMOS, 2002; RODRIGUES, 2010). O monitoramento microbiológico, que inclui pesquisa de microrganismos indicadores e de microrganismos patogênicos como *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*, possui grande importância na busca pela garantia da segurança do alimento, sendo, portanto, um dos critérios a serem avaliados dentro do controle do processo de produção da carne (CAC, 2007). A contaminação cruzada pode ocorrer através de biofilmes bacterianos que se formam por erros na higienização e sanitização do sistema de abate, e são responsáveis pela diminuição da qualidade dos alimentos por veicular patógenos ao homem, além de serem fontes recorrentes de contaminação dos alimentos produzidos (KASNOWSKI *et al.*, 2010; MARTINS, 2013).

Muito se tem discutido a respeito da capacidade que estes dois microrganismos apresentam na formação de biofilmes na indústria frigorífica (LERICHE & CARPENTIER, 2000; SINDE & CARBALLO, 2000; JOSEPH *et al.*, 2001). Um biofilme é uma população de células microbianas que cresce sobre uma superfície (DONLAN, 2002). Numerosos



estudos têm mostrado que essas bactérias são capazes de aderir e de formar biofilme em superfícies de metal, vidro ou borracha (LERICHE & CARPENTIER, 2000; SINDE & CARBALLO, 2000; JOSEPH *et al.*, 2001), sendo estes materiais comuns em indústrias frigoríficas. A formação de biofilme pode permitir a esses microrganismos sobreviver em superfícies e persistir em ambientes de processamento de alimentos por longos períodos (CORCORAN *et al.*, 2014; SIMÕES *et al.*, 2010; VESTBY *et al.*, 2009).

Há grande variação no grau de patogenicidade da espécie *L. monocytogenes*, que abrange clones de hipovirulência e de hipervirulência (MAURY *et al.*, 2016). Dentre os mecanismos associados à patogênese da listeriose, há a capacidade de indução de sua captação pelas células hospedeiras através da interação de internalinas com receptores do tipo E-caderina de células hospedeiras (MENGAUD *et al.*, 1996; ORSI *et al.*, 2007). Internalinas são proteínas de membrana de 80 kDa codificadas por mais de 25 genes identificados em *L. monocytogenes*, dentre os quais destaca-se a internalina A, codificada pelo gene *inlA*, que possui um papel central na patogenicidade do microrganismo, sendo a funcionalidade dessa proteína necessária para a invasão celular (POYART *et al.*, 1996; LECUIT *et al.*, 2001; ORSI *et al.*, 2007). Estudos indicam que a presença de *stop codons* prematuros (PMSCs) no gene *inlA* relacionam-se com clones que produzem internalina A secretada e truncada, apresentando fenótipo de invasão atenuado (NIGHTINGALE *et al.*, 2005). A linhagem de células Caco-2 de câncer de cólon humano para testes *in vitro* de invasão e adesão celulares tem sido amplamente utilizada e é estabelecida na literatura para realização desse tipo de teste *in vitro* de isolados de *L. monocytogenes* (OLIER *et al.*, 2002; CENCIČ & LANGERHOLC, 2010; ZILELIDOU *et al.*, 2015; CASTELLANO *et al.*, 2018). Não existe um estudo de caracterização do gene *InlA* de isolados de *L. monocytogenes* obtidos especificamente a partir de ambientes de abatedouros frigoríficos de aves e bovinos na região do Distrito Federal e Goiás.

A Resistência Antimicrobiana (RAM) é atualmente uma preocupação crescente em escala mundial, mostrando-se uma ameaça séria à saúde humana (WHO, 2018; MCEWEN & COLLIGNON, 2018). Na busca da mitigação dos riscos que o cenário atual da RAM traz, a Organização Mundial da Saúde criou o Plano de Ação Global para padronizar ações que objetivem conter o avanço da RAM (WHO, 2015). Um dos pilares dessa ação é o monitoramento da disseminação da RAM em escala global, cujos parâmetros para coleta, análise e compartilhamento de dados foram padronizados pelo Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (WHO, 2018). Considerando o frequente isolamento de patógenos como *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. em ambientes de processamento de alimentos como abatedouros frigoríficos (HAUBERT *et al.*, 2015; CAMARGO *et al.*, 2015a; DANTAS *et al.*, 2020), faz-se necessário o monitoramento da ocorrência de RAM em isolados obtidos a partir dessas fontes ambientais.

Diante da importância destes microrganismos para a saúde pública, dos poucos trabalhos realizados no país, e ausência de estudos na região do Distrito Federal e Goiás em relação à presença de biofilmes em indústrias de alimentos de origem animal, objetivou-se promover a caracterização molecular de estirpes de *Salmonella* spp. e de *L. monocytogenes* isoladas de biofilmes em abatedouros de bovinos e de aves, bem como realizar o antibiograma, a detecção de genes de resistência a antimicrobianos, realizar a sorotipificação e Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) dos isolados, e assim promover o estudo da variabilidade genética destes microrganismos, além de realizar nos isolados de *L. monocytogenes* o sequenciamento de fragmento do gene de codificação da proteína de invasão celular Internalina A, bem como realizar os ensaios de adesão e invasão em células Caco-2 e avaliar a capacidade de formação de biofilmes *in vitro* desses isolados.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Realizar o isolamento e caracterização molecular de estirpes de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em biofilmes de ambientes de abatedouros frigoríficos de aves e bovinos localizados no Distrito Federal e Estado de Goiás, junto ao fluxograma de processamento na indústria.

### 2.2. Objetivos específicos

- Detectar os pontos de contaminação por biofilmes em plantas de processamento de abatedouros frigoríficos de bovinos e de aves;
- Realizar a sorotipificação molecular dos isolados de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*;
- Realizar a PFGE para as estirpes de *L. monocytogenes* isoladas de biofilmes em abatedouros frigoríficos de aves e bovinos na Região do Distrito Federal e Goiás;
- Comparar as variações genéticas entre os isolados de *L. monocytogenes* pelo método PFGE;
- Realizar o sequenciamento do genoma completo (WGS) do isolado de *Salmonella* spp.
- Realizar antibiograma e pesquisa de genes de resistência antimicrobianos nos isolados de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp.;
- Analisar a sequência do fragmento do gene da internalina A dos isolados de *L. monocytogenes*;

- Realizar testes de adesão e invasão em células Caco-2 dos isolados de *L. monocytogenes*;
- Verificar e comparar a capacidade de formação de biofilme *in vitro* dos isolados de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. em diferentes temperaturas.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Origem das amostras

As amostras compunham-se de *swabs* estéreis (Absorve®), utilizados para realizar esfregaços nas superfícies das instalações e equipamentos/utensílios dos abatedouros frigoríficos de bovinos e aves, localizados na região do Distrito Federal e Goiás, sendo que todos os abatedouros frigoríficos visitados continham Serviço de Inspeção Oficial (SIF, SISBI ou DIPOVA). Cada amostra foi composta por um *swab*, com o qual se realizou coleta de um único ponto. Os pontos escolhidos para a realização da coleta dos *swabs* das superfícies seguiram o protocolo descrito por BARROS *et al.* (2007) e NICOLAU & BOLOCAN (2014), baseados em pontos onde há maior probabilidade desse microrganismo se estabelecer dentro da indústria (NICOLAU & BOLOCAN, 2014). Os pontos de coleta foram separados em dois grupos: instalações e equipamentos/utensílios, sendo as coletas das instalações realizadas nos pisos, paredes e ralos de câmaras frias e linhas de abate; e dos equipamentos/utensílios nas esteiras, mesas de evisceração, tubulações de aço inox (chutes e direcionadores), maquinários diversos e utensílios como ganchos e serras, segundo as especificidades dos abatedouros. A técnica utilizada para realização do esfregaço de superfície consistia em

arraste dos *swabs* umidificados na solução de transporte (água peptonada 0,1% (Himedia®)) estéril em uma área delimitada por moldes estéreis de 25 cm<sup>2</sup>, segundo protocolo preconizado por NICOLAU & BOLOCAN (2014). As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LAMAL) da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, onde foram processadas dentro de 24 horas após a coleta para o cultivo e isolamento microbiológico.

Foram coletadas amostras em três (03) abatedouros frigoríficos de aves, sendo dois (02) localizados na região do Distrito Federal (Frigoríficos A e B) e um (01) localizado no estado de Goiás (Frigorífico C); e em dois (02) abatedouros frigoríficos de bovinos, sendo um (01) localizado na região do Distrito Federal (Frigorífico D) e um (01) localizado na região do Entorno, no estado de Goiás (Frigorífico E). O número de empresas participantes deste projeto foi em decorrência do aceite das mesmas em participarem espontaneamente da pesquisa. Ao todo, foram realizadas 16 visitas nas indústrias, sendo oito (08) visitas em abatedouros de aves e oito (08) em abatedouros de bovinos, obtendo-se, no período de março de 2017 a setembro de 2018, um total de 287 amostras, sendo 118 amostras de *swabs* obtidos de abatedouros frigoríficos de bovinos e 169 *swabs* obtidos de abatedouros frigoríficos de aves.

A caracterização do biofilme dentro da planta de processamento da indústria foi realizada a partir da repetição de coleta de amostras de esfregaços de *swabs* estéreis obtidas do ambiente industrial e equipamentos/utensílios por mais de uma vez nos mesmos pontos de coleta (BERRANG *et al.*, 2005). Estudos correlacionam a permanência de microrganismos em superfícies após procedimentos de higienização e sanitização com a presença de biofilme nas mesmas (PAN *et al.*, 2006; VESTBY *et al.*, 2009). Por isso, as coletas foram realizadas sempre no período entre duas higienizações

das instalações e equipamentos/utensílios, ou seja, foram realizadas algumas horas após a última higienização pós abate e imediatamente anterior à higienização pré abate. Realizou-se a repetição consistente de coleta nos mesmos pontos dentro de cada planta com o intuito de observar a reincidência de isolamento dos microrganismos pesquisados em diferentes tempos.

### **3.2. Pesquisa de *Listeria monocytogenes***

A metodologia de pesquisa e isolamento utilizada foi a preconizada por RYSER & DONNELLY (2015) para pesquisa e isolamento microbiológico de *Listeria monocytogenes*. Após o transporte dos swabs em água peptonada (Himedia®) a 0,1%, foi realizada homogeneização dos tubos de ensaio contendo os swabs em agitador de tubos (AP56, Phoenix®), e posteriormente foi transferido 1 mL da solução de transporte para 9 mL de caldo UVM (Acumedia®) para incubação a 35°C por 24 horas. Em seguida, transferiu-se 0,1mL do caldo UVM para 10mL de caldo Fraser (Acumedia®), incubados a 35°C por 24h. Em seguida, os tubos de caldo Fraser que apresentaram hidrólise da esculina foram plaqueados com auxílio de uma alça de níquel-cromo por esgotamento em placas de ágar MOX (Difco®), que foram incubadas a 35°C por 24h. Os tubos de caldo Fraser que não apresentaram hidrólise da esculina foram mantidos incubados a 35°C por mais 24 horas antes de serem descartados. As colônias pequenas e com halo de hidrólise de esculina foram colhidas e transferidas para caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) (Difco®) e incubadas à 37°C por 18-24 horas. Realizou-se o teste de turbilhonamento com gotícula retirada do caldo BHI, coloração Gram e teste da catalase. Para a identificação e confirmação da *L. monocytogenes*, foi utilizada a técnica de análise de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os controles positivos para a padronização

do procedimento foram estirpes cedidas gentilmente pelo Dr. Ernesto Hofer da Fundação Oswaldo Cruz / Rio de Janeiro.

### **3.3. Pesquisa de *Salmonella* spp.**

A metodologia para a análise das amostras foi a preconizada pelo Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da *Salmonella* spp. (BRASIL, 2011), pela ISO 6579/2002 (ISO, 2002) e por RYSER & DONNELLY (2015), em que os *swabs* de superfície que se encontravam em água peptonada (Himedia®) a 0,1% foram transferidos para tubos contendo 9 mL de água peptonada tamponada (Acumedia®) a 1% e incubados em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas, sendo posteriormente transferidos alíquotas de 1 mL dessa solução para 10 mL de caldo Tetrionato (Merck®), 1 mL para 10 mL de caldo Selenito Cistina (Merck®) e 0,1 mL para 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis (Fluka®). Posteriormente, as amostras foram incubadas em estufa bacteriológica (Fanem®) à 42°C por 24 horas. Em seguida, com auxílio de uma alça de níquel-cromo, os caldos supracitados foram plaqueados por esgotamento em estrias em meio seletivo Ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol (BPLS) (Acumedia®), ágar XLD (Merck®) e ágar Bismuto Sulfito (BS) (Acumedia®) e novamente incubados à 37°C (ágares BPLS e XLD) ou 35°C (ágar BS) por 24 a 48 horas. Aproximadamente três colônias com características morfológicas de *Salmonella* spp. foram plaqueadas em Ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) (Acumedia®) e incubados à 37° por 18-24 horas. Os tubos de TSI com crescimento sugestivo de *Salmonella* foram submetidos aos testes bioquímicos indicados no Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da *Salmonella* spp. (BRASIL, 2011), sendo eles a hidrólise da uréia, fenilalanina desaminase, pesquisa da produção de indol, prova de Voges-Proskauer (VP), prova do Vermelho de Metila (VM), lisina descarboxilase e prova

de utilização do citrato. Foi realizada a técnica de Reação em Cadeia da polimerase (PCR) para identificação e confirmação do gênero *Salmonella* spp.. Os controles positivos para a padronização dos procedimentos foram cedidos gentilmente pela Fundação Oswaldo Cruz - Rio de Janeiro.

#### **3.4. Confirmação de detecção de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

Para a confirmação de gênero e espécie dos isolados de *Listeria monocytogenes*, utilizou-se o protocolo descrito por KÉROUANTON *et al.* (2010). As colônias sugestivas que apresentavam características fenotípicas, morfológicas e bioquímicas compatíveis com a espécie *Listeria monocytogenes* foram submetidas à PCR, utilizando-se os *primers* LIP1 (D'AGOSTINO *et al.*, 2004) e LIP2A (KÉROUANTON *et al.*, 2010).

Para a confirmação do diagnóstico molecular do gênero *Salmonella*, utilizou-se o protocolo descrito por FREITAS *et al.* (2010). Colônias sugestivas em suas características morfológicas e bioquímicas foram submetidas à PCR com o gene alvo *ompC*, utilizando-se *primers* OMPCF e OMPCR (ALVAREZ *et al.*, 2004).

#### **3.5. Sorotipagem dos isolados de *Listeria monocytogenes* por PCR**

Após confirmação da espécie por PCR, realizou-se a sorotipagem dos isolados de *Listeria monocytogenes* de acordo com o protocolo descrito por DOUMITH e colaboradores (2004), utilizando-se PCR multiplex com os *primers* lmo0737, lmo1118, ORF2819 e ORF2110. Foi realizada PCR de colônia nos isolados de *L. monocytogenes*. As reações de amplificação foram feitas em volume final de 25 µL, contendo 2U de taq DNA polimerase (Invitrogen®), 2mM de desoxirribonucleotídeos fosfatados



(Invitrogen®), tampão 1X (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl - Invitrogen®), 1.5mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen®) e *primers* nas concentrações de 1 µM para Imo0737, ORF2819 e ORF2110; e 1.5 µM para Imo1118. A reação ocorreu em termociclador MyCycler (BioRad®) nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos; 35 ciclos a 94°C por 0.40 minutos, 53°C por 1.15 minutos, e 72°C por 1.15 minutos; e um ciclo final a 72°C por 7 minutos. Os fragmentos esperados para os *primers* Imo0737, Imo1118, ORF2819 e ORF2110 eram de 691bp, 906bp, 471bp e 597bp respectivamente. As informações sobre os *primers* utilizados encontram-se no Quadro 1. Os produtos da amplificação foram visualizados em gel de agarose (Invitrogen®) a 2%, corados com brometo de etídio a 5 mg/mL e visualizados em transiluminador (Major Science®).

Gene-alvo	Primer	Sequência (5'- 3')	Tamanho (bp)	Especificidade do sorotipo
Imo0737	Imo0737-F	AGGGCTTCAAGGACTTACCC	691	1/2a, 1/2c, 3a e 3c
	Imo0737-R	ACGATTTCTGCTTGCCATTC		
Imo1118	Imo1118-F	AGGGGTCTTAAATCCTGGAA	906	1/2c e 3c
	Imo1118-R	CGGCTTGTTCCGCATACTTA		
ORF2819	ORF2819-F	AGCAAAATGCCAAACTCGT	471	1/2b, 3b, 4b, 4d e 4e
	ORF2819-R	CATCACTAAAGCCTCCCATTG		
ORF2110	ORF2110-F	AGTGGACAATTGATTGGTGAA	597	4b, 4d e 4e
	ORF2110-R	CATCCATCCCTTACTTTGGAC		

**Quadro 1.** Descrição dos *primers* utilizados para sorotipagem dos isolados de *L. monocytogenes* (DOUMITH *et al.*, 2004).

Após a sorotipificação por PCR para determinação da linhagem (DOUMITH *et al.*, 2004), foi realizado BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) do resultado do sequenciamento dos fragmentos (1157bp e 760bp) de gene da Internalina A de todos os isolados para comparação de homologia das sequências de DNA e posterior identificação do sorotipo de cada isolado.

### **3.6. Determinação do sorotipo de *Salmonella* spp.**

A identificação do sorotipo de *Salmonella* spp. foi realizada pela análise do genoma completo (WGS), no Laboratório de Resistência Bacteriana e Alternativas Terapêuticas sob responsabilidade do Prof. Dr. Nilton Lincopan, no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP – São Paulo/SP). Foi feita a extração do DNA seguindo protocolo do kit PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Life Technologies®, CA). A quantificação do material foi feita utilizando-se Nanodrop, seguido de quantificação por Qubit (BR). O sequenciamento foi realizado na Plataforma NextSeq (Illumina®). Para preparação da biblioteca, seguiu-se o protocolo do Nextera DNA Flex Library Prep Kit (Illumina®), que foi quantificada por Qubit (HS). O tamanho dos fragmentos foi verificado via Bioanalyzer. Os dados foram então analisados via SeqSero2 (ZHANG *et al.*, 2019) para determinação do sorovar.

### **3.7. Identificação dos pulsotipos de *Listeria monocytogenes* por PFGE**

Analisou-se o perfil dos isolados de *L. monocytogenes* pela técnica Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) preconizada pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 2015). Os isolados foram cultivados em ágar nutriente (Acumedia®) e incubados por 18 a 24 horas a 37°C em estufa bacteriológica (Quimis®). As suspensões bacterianas foram feitas em tampão TE (Tris 10mM: EDTA 1mM, ph 8,0). Para o preparo dos *plugs*, utilizou-se solução de lisozima (Sigma®) a 20 mg/mL, proteinase K (Invitrogen®) a 20mg/mL e agarose SeaKem Gold (Lonza®) a 1%. A enzima de restrição utilizada foi *Ascl* (Invitrogen® ANZA® 21 Sgsl) a 10U/μL, adicionada de albumina de soro bovino (Promega®) a 20mg/mL. O padrão utilizado foi *plug* de *Salmonella* ser.

Braenderup H9812, restrito pela enzima *Xba*I (Roche®) a 10U/μL, cedido pelo Laboratório de Enterobactérias (LABENT) da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Os *plugs* foram carregados nos moldes, intercalando-se no máximo três poços de amostras com um poço do padrão, utilizando-se agarose SeaKem Gold a 1% (Lonza®) para preparo do gel de corrida. A eletroforese foi realizada em aparelho CHEF Mapper/DRIII (BioRad®) nas seguintes condições: 2,2 L de tampão de corrida 0.5X (Tris-borato EDTA – TBE (Roche®)) bombeados a 1 litro/minuto a 14°C; tempo inicial de troca 4.0 segundos; tempo final de troca 40.0 segundos; voltagem 6V; angulação 120°; tempo de corrida 19 horas. O gel foi corado em solução de brometo de etídio (10 μg/mL) e descorado em água destilada, e a imagem dos fragmentos foi capturada em fotodocumentador (Major Science®). A análise dos fragmentos foi realizada através do software BioNumerics versão 7.6. (AppliedMaths®), utilizando-se o coeficiente de similaridade de Dice a 1,5% de tolerância (DICE, 1945). Para construção do dendograma, realizou-se análise de *clusters* UPGMA (*Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average*).

### **3.8. Análise da sequência do gene *inlA* dos isolados de *Listeria monocytogenes***

A análise da sequência do gene *inlA* (2400pb) foi realizada a partir da metodologia proposta por POYART *et al.* (1996), que consiste na amplificação por PCR de dois fragmentos do gene da internalina A: unidades de repetição A (1157pb) e B (760pb). Para a repetição A, utilizou-se os *primers* O1 (5'-GAATGTAACAGACACG-3') e O2 (5'-ATCGCTAATAGTAGC-3') (POYART *et al.*, 1996). Para a repetição B, utilizou-se os *primers* O3 (5'-AGCCACTTAAGGCAAT-3') e O4 (5'-AGTTGATGTGTTAGA-3') (POYART *et al.*, 1996). As reações de PCR uniplex, em volume final de 100μL, compunham-se de 5U de taq DNA polimerase (Invitrogen®), 2mM de

desoxirribonucleotídeos fosfatados (Invitrogen®), tampão 1X (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl - Invitrogen®), 1,5mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen®), *primers* nas concentrações de 0,5 µM cada e adição de 10µL de DNA mantido a 95°C por 10 minutos. A reação foi realizada em termociclador MyCycler (BioRad®) nas seguintes condições: desnaturação a 95°C por 5 minutos; 40 ciclos de amplifica o consistindo de 1 minuto de anelamento a 55°C, 90 segundos de extensão a 72°C e 1 minuto de desnatura o a 94°C. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 1,5% (Invitrogen®), corados por brometo de etídio e visualizados em transiluminador (Major Science®). Realizou-se a purifica o dos produtos da PCR utilizando-se kit PureLink (Invitrogen®). A quantifica o do material foi realizada pelo uso de marcador High Mass (Invitrogen®) e então procedeu-se com o sequenciamento dos fragmentos em sequenciador ABI3500 (Applied Biosystem®).

### **3.9. Teste de invasão e adesão celular em células Caco-2 dos isolados de *L. monocytogenes***

As células de adenocarcinoma de cólon humano da linhagem Caco-2 utilizadas neste estudo foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Elaine Cristina Pereira De Martinis, oriundas da cole o de células da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (USP). O protocolo de cultivo celular foi o descrito por GAILLARD e colaboradores (1987), com a utiliza o do meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose* (DMEM) (Sigma-Aldrich®) suplementado por soro fetal bovino a 10% (Gibco®) e penicilina (100U/mL) - estreptomicina (10mg/mL) (Sigma-Adrich®) – denominado meio DMEM completo. As células foram mantidas em frascos de cultivo de 250mL (Kasvi®) em estufa de câmara de CO<sub>2</sub> 5% e temperatura de 37°C (Quimis® - Estufa Microprocessada de CO<sub>2</sub> – Q316C). Após 24 horas incubadas,

observou-se o crescimento semi-confluente das células, que foram tripsinizadas (0,25% Tripsina-EDTA (1X) – Sigma-Aldrich®) e ajustadas para a concentração final de  $0,5 \times 10^5$  células/mL em meio de cultivo DMEM. Foi aliquoteado 1 mL dessa suspensão celular em cada poço das placas de polipropileno para cultivo celular (Kasvi®), e as mesmas foram incubadas em estufa de câmara de CO<sub>2</sub> 5% a 37°C por 24 horas. Posteriormente, observou-se a confluência das células nos poços ( $1,0 \times 10^5$  células/poço) para realização dos ensaios de adesão e invasão de *L. monocytogenes*.

### **3.9.1. Ensaio de adesão celular dos isolados de *L. monocytogenes***

Procedeu-se aos ensaios de adesão celular conforme descrito por MORONI *et al.* (2006). Após confluência das células nos poços das placas de polipropileno, o poço foi inoculado com volume da suspensão bacteriana ajustada para se obter uma multiplicidade de infecção (MOI) de 100 bactérias por célula. Adicionou-se meio DMEM (Gibco®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco®) e as placas foram incubadas em estufa de câmara de CO<sub>2</sub> 5% a 37°C por 2 horas. Posteriormente, realizou-se três lavagens com tampão fosfato-salino 1X (PBS - Laborclin®), tratamento das células com solução de lise (Triton 100X 0,1% - Sigma Aldrich®) por 10 minutos em estufa de CO<sub>2</sub> nas mesmas condições anteriores, e por fim realizou-se a quantificação de células bacterianas viáveis por semeadura de diluições seriadas em ágar BHI (caldo BHI (Difco®) adicionado de 1,5% de ágar bacteriológico (Acumedia®)). O resultado obtido foi expresso em unidades formadoras de colônia (UFC)/mL. Todos os testes foram feitos em triplicata. A porcentagem de adesão bacteriana nas células Caco-2 foi determinada pela fórmula: % adesão = número de células aderidas x 100/número de células aderidas ao poço.

### **3.9.2. Ensaio de invasão celular dos isolados de *Listeria monocytogenes***

Os ensaios de invasão celular seguiram a metodologia descrita por GAILLARD e colaboradores (1987) e MORONI e colaboradores (2006). Após inoculação dos poços com suspensão bacteriana ajustada para MOI de 100 bactérias por célula, as placas foram incubadas em estufa de câmara de CO<sub>2</sub> 5% a 37°C por 2 horas. Posteriormente, os poços foram lavados com PBS 1X (Laborclin®) e tratados com 250 µL de solução de gentamicina 1mg/mL (Sigma-Aldrich®). Após uma hora de incubação em estufa de câmara de CO<sub>2</sub> a 37°C, os poços foram tratados com solução de lise (Triton 100X 0,1% - Sigma-Aldrich®) por 10 minutos em estufa de câmara de CO<sub>2</sub> e as células bacterianas viáveis foram quantificadas por semeadura de diluições seriadas em ágar BHI (caldo BHI (Difco®) adicionado de 1,5% de ágar bacteriológico (Acumedia®)). O resultado obtido foi expresso em unidades formadoras de colônia (UFC)/mL. Todos os testes foram feitos em triplicata. A porcentagem de invasão bacteriana nas células Caco-2 foi determinada pela fórmula: % adesão = número de células internalizadas recuperadas x 100 / número de células aderidas ao poço.

### **3.10. Resistência antimicrobiana dos isolados de *Listeria monocytogenes***

Avaliou-se a resistência antimicrobiana dos isolados de *L. monocytogenes* pelo método de difusão em disco, de acordo com o protocolo preconizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020). Utilizou-se ágar Müeller-Hinton (Acumedia®) (MH), e os antibióticos testados foram: ampicilina (10µg), ciprofloxacino (5µg), cloranfenicol (30µg), doxiciclina (30 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg),

sulfonamidas (300 µg) e tetraciclina (30 µg). Três a cinco colônias foram coletadas do ágar nutriente (Acumedia®) e inoculadas em 5 mL de caldo *Broth Heart Infusion* (BHI) (Difco®), posteriormente foram incubadas a 37°C até atingirem turbidez equivalente ao padrão 0,5 na escala McFarland (Nefelobac - Probac®). Em seguida, os isolados foram cultivados em ágar Müller-Hinton (MH) com o auxílio de *swab* estéril (Absorve®), o qual foi embebido no caldo BHI e aplicado homogeneamente na placa de ágar MH. No máximo cinco discos de antibiótico (DME®) foram dispostos em cada placa, seguindo recomendação do CLSI (2020). Após incubação em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas, realizou-se a medição dos diâmetros dos halos de inibição observados em cada disco. Para interpretação dos resultados, utilizou-se os padrões para *Staphylococcus* spp. (CHEN *et al.*, 2010) definidos pelo CLSI M100 (CLSI, 2020), com exceção dos padrões para eritromicina e ampicilina, em que se utilizou os padrões definidos pelo European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2019) para *Listeria monocytogenes*.

### **3.11. Pesquisa de genes de resistência antimicrobiana dos isolados de *Listeria monocytogenes***

Realizou-se PCR de colônia nos isolados para pesquisa de genes de resistência antimicrobiana relacionados às tetraciclinas (*tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetM*), macrolídeos (*ermA*, *ermB*, *ermC*, *ereA*), anfenícois (*cat1*, *cmlA*), sulfonamidas (*sulI*), beta-lactâmicos (*ampC*, *blaSHV*) e aminoglicosídeos (*aac(3)-I*) (Quadro 1). As reações foram feitas em volume final de 25µL, em termociclador (MyCycler®), de acordo com as condições descritas nos trabalhos discriminados no Quadro 2 para cada par de *primer*.

Gene	Primer	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Tamanho (pb)	Referência
<i>aac(3)-I</i>	aac(3)-I-F	ACCTACTCCCAACATCAGCC	157	VAN <i>et al.</i> , 2008
	aac(3)-I-R	ATATAGATCTCACTACGCGC		
<i>ampC</i>	AmpC-For	TTCTATCAAMACTGGCARCC	550	SCHWARTZ <i>et al.</i> , 2003
	AmpC-Rev	CCYTTTTATGTACCCAYGA		
SHV	blaSHV-F	TCGCCTGTGTATTATCTCCC	768	VAN <i>et al.</i> , 2008
	blaSHV-R	CGCAGATAAATCACCACAATG		
<i>ermA</i>	ermA-F	TCTAAAAGCATGTAAAAGAA	645	SUTCLIFFE <i>et al.</i> , 1996
	ermA-R	CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT		
<i>ermB</i>	ermB-F	GAAAAGGTACTIONCAACCAATA	639	SUTCLIFFE <i>et al.</i> , 1996
	ermB-R	AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC		
<i>ermC</i>	ermC-F	TCAAAACATAATATAGATAAA	642	SUTCLIFFE <i>et al.</i> , 1996
	ermC-R	GCTAATATTGTTTAAATCGTCAAT		
<i>ereA</i>	ere(A)-F	GCCGGTGCTCATGAACTTGAG	419	VAN <i>et al.</i> , 2008
	ere(A)-R	CGACTCTATTGATCAGAGGC		
<i>cat1</i>	CATIF	AGTTGCTCAATGTACCTATAACC	547	VAN <i>et al.</i> , 2008
	CATIR	TTGTAATTCATTAAGCATTCTGCC		
<i>cmlA</i>	cmlA-F	CCGCCACGGTGTGTTGTTATC	698	VAN <i>et al.</i> , 2008
	cmlA-R	CACCTTGCCTGCCCATCATTAG		
<i>sull</i>	sull-F	TTCGGCATTCTGAATCTCAC	822	VAN <i>et al.</i> , 2008
	sull-R	ATGATCTAACCCCTCGGTCTC		
<i>tetA</i>	tet(A)-F	GTGAAACCCAACATACCCC	887	VAN <i>et al.</i> , 2008
	tet(A)-R	GAAGGCAAGCAGGATGTAG		
<i>tetB</i>	tet(B)-F	CCTTATCATGCCAGTCTTGC	773	VAN <i>et al.</i> , 2008
	tet(B)-R	ACTGCCGTTTTTTTCGCC		
<i>tetC</i>	tet(C)-F	ACTTGGAGCCACTATCGAC	880	VAN <i>et al.</i> , 2008
	tet(C)-R	CTACAATCCATGCCAACCC		
<i>tetM</i>	tet(M)-1	GTTAAATAGTGTCTTGAG	700	AARESTRUP <i>et al.</i> , 2000
	tet(M)-2	CTAAGATATGGCTCTAACAA		

**Quadro 2.** Primers utilizados na pesquisa de genes de resistência antimicrobiana dos isolados de *L. monocytogenes*.



### **3.12. Resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp.**

Avaliou-se a resistência antimicrobiana dos isolados de *Salmonella* spp. pelo método de difusão em disco, de acordo com o protocolo preconizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020). Os antibióticos testados foram ácido nalidíxico (30µg), amoxicilina (10 µg), ampicilina (10 µg), cefalotina (30 µg), cefazolina (30 µg), ceftazidima (30 µg), ciprofloxacino (5 µg), cloranfenicol (30 µg), colistina (10µg), doxiciclina (30 µg), gentamicina (10 µg), sulfonamidas (300 µg) e tetraciclina (30 µg). Três a cinco colônias foram coletadas do ágar nutriente (Acumedia®), inoculadas em 5 mL de caldo BHI (Difco®) e posteriormente foram incubadas a 37°C até atingirem turbidez equivalente ao padrão 0,5 na escala McFarland (Nefelobac - Probac®). Em seguida, os isolados foram cultivados em ágar Müeller-Hinton (MH) com o auxílio de *swab* estéril (Absorve®), que foi embebido no caldo BHI e aplicado homogeneamente na placa de ágar MH. No máximo cinco discos de antibiótico (DME®) foram dispostos em cada placa, obedecendo os critérios estabelecidos pelo CLSI (2020). Após incubação em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas, realizou-se a medição dos diâmetros dos halos de inibição observados em cada disco. Para interpretação dos resultados, utilizou-se os padrões para *Enterobacteriaceae* definidos pelo CLSI M100 (CLSI,2020).

### **3.13. Pesquisa de genes de resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp.**

A análise da presença de genes de resistência antimicrobiana foi realizada pela leitura do sequenciamento completo do genoma (WGS), no Laboratório de Resistência Bacteriana e Alternativas Terapêuticas da Universidade de São Paulo, no Instituto de Ciências Biomédicas, sob a responsabilidade do professor doutor Nilton Lincopan. Realizou-se a extração do DNA seguindo protocolo do kit PureLink™ Genomic DNA Mini

Kit (Life Technologies®, CA), seguida da quantificação do material utilizando-se Nanodrop, e posterior quantificação por Qubit (BR). O sequenciamento foi realizado na Plataforma NextSeq (Illumina®). Para preparação da biblioteca, utilizou-se o protocolo do Nextera DNA Flex Library Prep Kit (Illumina®), que foi quantificada por Qubit (HS). O tamanho dos fragmentos foi verificado via Bioanalyzer. Para análise dos dados do WGS, avaliou-se a qualidade das *reads* pelo FASTQC v.0.11.3 e foi feita a trimagem das mesmas via TrimGalore v.0.6.5. A montagem *de novo* das sequências foi realizada com o uso do Unicycler v.0.4.8 e a análise dos dados para pesquisa de características moleculares relacionadas à resistência antimicrobiana foi realizada pelo ResFinder v.3.2 (ZANKARI *et al.*, 2012), através da pesquisa de presença de genes relacionados a resistência aos seguintes antimicrobianos: quinolonas, tetraciclina, nitroimidazol, sulfonamidas, macrolídeos, rifampicina, glicopeptídeos, colistina, trimetoprim, ácido fusídico, aminoglicosídeos, beta-lactâmicos, oxazolidinona e fosfomicina. Realizou-se também via ResFinder a pesquisa de pontos de mutação cromossômica relacionados à resistência antimicrobiana nos genes *gyrA*, *gyrB*, *pmrA*, *pmrB*, *parC*, *parE* e *16s\_rrsD*.

### **3.14. Capacidade de formação de biofilme *in vitro* de isolados de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp.**

A capacidade de formação de biofilme dos isolados identificados neste estudo foi avaliada a partir do ensaio em microplaca de titulação de poliestireno descrito por DJORDJEVIC *et al.* (2002) e adaptado por BORGES *et al.* (2018). Os isolados foram cultivados individualmente em placa de petri contendo ágar Triple Soy (TSA - Acumedia®) em temperatura de 37°C por 24 horas em estufa bacteriológica (Quimis®). Em seguida, uma colônia da placa contendo TSA foi transferida para 10 mL de caldo Triple Soy sem glicose (TSB - Acumedia®), que foi incubado a 37°C por 24 horas em

estufa bacteriológica (Quimis®). Posteriormente, alíquotas dessa suspensão foram adicionadas a caldo TSB até a concentração de  $3 \times 10^8$  UFC/mL (escala 1 de MacFarland - Probac do Brasil®). Então, 200  $\mu$ L dessa suspensão foram adicionados em um poço de uma microplaca de poliestireno de 96 poços estéril (Kartell®). Para o controle negativo, três poços foram preenchidos com 200  $\mu$ L de caldo TSB sem glicose. Todos os isolados foram testados em triplicata. As placas assim preparadas foram então cobertas com papel filme e incubadas aerobicamente nas seguintes condições a serem avaliadas: uma placa foi incubada por 24 horas sob temperatura de 37 °C e a outra foi incubada em refrigerador (Electrolux® 262L) a 12°C por 168 horas (7 dias). Após incubação, as suspensões bacterianas foram retiradas dos poços pelo processo de lavagem. O procedimento foi realizado por três vezes com solução estéril de cloreto de sódio a 0,9%. Após secagem da placa, as células bacterianas foram fixadas com 200  $\mu$ L de metanol em cada poço por 15 minutos. O metanol foi removido e as placas foram deixadas para secar em temperatura ambiente. Posteriormente, corou-se as células com 200  $\mu$ L de cristal violeta de Hucker a 1% por 10 minutos. As placas foram então lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente. Adicionou-se então 200  $\mu$ L de ácido acético (J.T.Baker®) a 33% e procedeu-se com a leitura da absorbância em leitor de ELISA (Biotek® ELx800) com comprimento de onda de 490 nm. O valor da densidade óptica para cada isolado foi determinado pela média aritmética das leituras das absorbâncias obtidas dos três poços, e foi comparado com o valor do controle negativo (DON). Para determinação da capacidade e intensidade de formação de biofilme dos isolados, utilizou-se quatro categorias: isolado não formador de biofilme (NF) quando a densidade óptica do isolado (DOI) foi menor ou igual à DON ( $DOI \leq DON$ ); fracamente formador de biofilme se  $DON < DOI \leq 2 \times DON$ ; formador de biofilme moderado se  $2 \times DON < DOI \leq 4 \times DON$  ou forte formador de biofilme se  $4 \times DON < DOI$  (STEPANOVIĆ *et al.*,

2000). A análise estatística dos dados para comparação da capacidade de formação de biofilme a 12°C e a 37°C dos isolados de *L. monocytogenes* foi realizada com o programa SAS (University Edition, Cary, North Carolina). Foi calculada a média das triplicatas e os resultados foram submetidos à análise de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, os dados foram submetidos ao teste T pareado para comparação de médias entre os dois grupos: as amostras incubadas sob temperatura de 37°C e as amostras incubadas sob a temperatura de 12°C.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

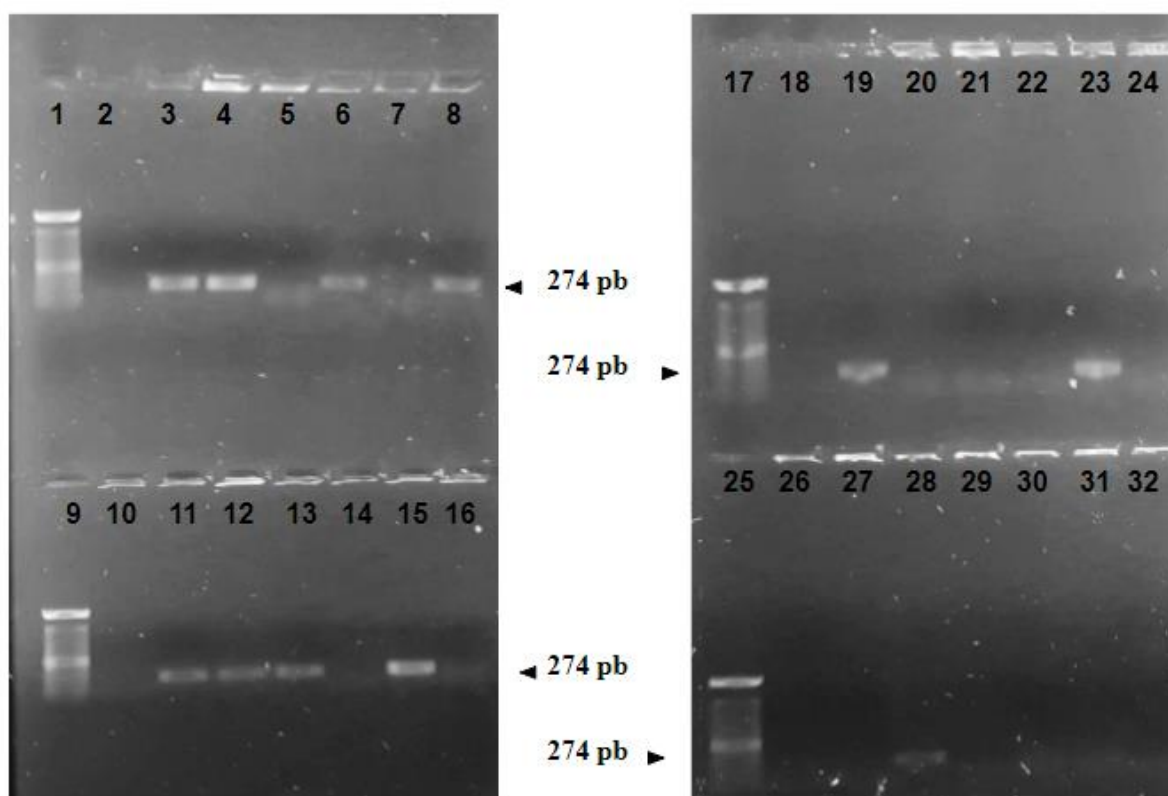
### **4.1. Pesquisa e isolamento de *Listeria monocytogenes* em abatedouros de aves e bovinos**

Foram detectados 14 (4,87%) isolados de *Listeria monocytogenes* do total de 287 *swabs* das instalações e equipamentos de abatedouros frigoríficos de aves e bovinos, dos quais 169 *swabs* foram obtidos de abatedouro de aves e 118 foram obtidos de abatedouros de bovinos. Todos os isolados deste microrganismo foram detectados em abatedouros de aves. Não foi detectado nenhum isolado de *L. monocytogenes* em abatedouros de bovinos. Os pontos de detecção destes microrganismos em abatedouros de aves foram: 05 isolados (35,7%) detectados em tubulações de aço inox (chutes); 03 isolados (21,4%) detectados em ralos localizados na sala de abate e área de cortes; 02 isolados (14,4%) em mesas de evisceração; 03 isolados (21,4%) em esteiras localizadas na área de cortes e 01 isolado (7,1%) na parede da sala de cortes. Os resultados de pesquisa de *L. monocytogenes* nas instalações, equipamentos e utensílios, obtidos nas visitas aos abatedouros frigoríficos de aves, encontram-se dispostos na Tabela 1. Todas

Região e identificação do Estabelecimento	DF	DF	DF	DF	DF	GO	GO	DF				
	A	A	A	A	A	C	C	B				
Pontos de coleta de swabs	Coleta 1 n° de swabs=16	Coleta 2 n° de swabs=16	Coleta 3 n° de swabs=16	Coleta 4 n° de swabs=15	Coleta 5 n° de swabs=25	Coleta 6 n° de swabs=25	Coleta 7 n° de swabs=25	Coleta 8 n° de swabs=31	Total de estirpes de <i>Listeria monocytogenes</i>	Total de swabs obtidos em cada ponto de coleta	Porcentagem de amostras positivas em cada ponto de coleta (%)	Identificação dos isolados detectados em cada ponto de coleta
<b>Instalações</b>									<b>4</b>	<b>56</b>	<b>7.14</b>	
Piso de área limpa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0.0	
Ralos de área limpa	0	0	1	0	0	0	1	1	3	38	7.89	63A-1;69A-3; 117A-2
Ralos de área suja	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.0	
Paredes de área limpa	0	0	0	0	0	0	1	0	1	13	0.0	76A-3
Paredes de área suja	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0.0	
<b>Equipamentos e Utensílios</b>									<b>10</b>	<b>113</b>	<b>8.84</b>	
Mesas de evisceração	0	0	0	0	0	0	2	0	2	35	5.71	72A-3; 77A-3
Esteiras de área limpa	0	0	0	0	0	3	0	0	3	33	9.09	45A-3; 52A-3; 59A-3
Chutes de miúdos	0	0	0	0	0	2	3	0	5	13	38.46	42A-3; 54A-3; 72A-3; 78A-3; 88A-3
Chutes de carcaças	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0.0	
Chutes de ossos e vísceras	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	0.0	
Ganchos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0.0	
Maquinários	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	0.0	
<b>Total de isolados de <i>L. monocytogenes</i> obtidos em cada coleta</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>1</b>	<b>14</b>			
<b>Total de swabs obtidos em cada coleta</b>	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>15</b>	<b>25</b>	<b>25</b>	<b>25</b>	<b>31</b>		<b>169</b>		

**Tabela 1.** Pesquisa de *Listeria monocytogenes* em swabs de instalações, equipamentos e utensílios de abatedouros frigoríficos de aves localizados no Distrito Federal e Estado de Goiás.

as 14 estirpes isoladas foram confirmadas por PCR (Figura 1). A distribuição das coletas das amostras de *swabs*, bem como as identificações dos abatedouros frigoríficos por regiões, encontram-se no anexo A.



**Figura 1.** Resultado da PCR para confirmação de *Listeria monocytogenes* de 10 estirpes isoladas de abatedouros frigoríficos localizados na região do Distrito Federal e Estado de Goiás, pela utilização dos *primers* LIP1 e LIP2A, com amplificação de fragmentos com 274 bp. De **1, 9, 17 e 25**: DNA ladder 100bp (Invitrogen®); número **2**: controle negativo; número **3**: estirpe controle positivo; números **4, 6, 8, 11, 12, 13, 15, 19, 23 e 28**: estirpes com resultado positivo para a PCR.

Na região do Distrito Federal, não há nenhum relato de pesquisa de biofilmes de *Listeria monocytogenes* em ambiente, utensílios e equipamentos de abatedouros frigoríficos de aves e bovinos, sendo este o primeiro relato. No entanto, há relatos da ocorrência de *L. monocytogenes* em alimentos de origem animal, prontos para consumo, como salsicha tipo 'hot dog' e carne moída bovina, disponibilizados no comércio desta região (ROCHA *et al.*, 2014). Já na região Centro-Oeste, CESAR *et al.* (2011) relataram a presença de *L. monocytogenes* em amostras de *swabs* ambientais de duas indústrias

de produção de salsichas tipo 'hot dog'. PALMA *et al.* (2016) verificaram a presença de *L. monocytogenes* em cortes cárneos de bovinos e ambientes de abatedouros-frigoríficos de bovinos localizados no Distrito Federal. Os relatos de CESAR *et al.* (2011), ROCHA *et al.* (2014) e PALMA *et al.* (2016) corroboram com os resultados da presença de *L. monocytogenes* nas regiões deste estudo. Os resultados de não detecção de *L. monocytogenes* nos abatedouros frigoríficos de bovinos neste estudo foram contrários aos observados por PALMA *et al.* (2016), em que os autores verificaram a presença deste microrganismo em amostras de *swabs* ambientais oriundas deste tipo de estabelecimento. Essa divergência pode ser decorrente de condições adequadas de higienização e sanitização desses estabelecimentos. Além disso, as datas de realização das visitas eram previamente combinadas com as indústrias, o que pode ter influenciado o comportamento dos responsáveis pela higienização dos estabelecimentos. A ausência do microrganismo pode ser explicada também pelo número reduzido de visitas, que por sua vez culminaram com um número menor de *swabs* pesquisados, o que decorreu da resistência das indústrias em participarem da pesquisa. Levando-se em consideração a característica da *L. monocytogenes* de estar presente em biofilmes em ambientes de processamento de produtos de origem animal (PERNI *et al.*, 2007; RIEU *et al.*, 2008; CARPENTIER & CERF, 2011) e o relato existente da presença do microrganismo em ambiente de abatedouro frigorífico de bovinos previamente descrito por PALMA *et al.* (2016), mais estudos são necessários, com maior número de amostras de *swabs*, para se avaliar a real presença deste microrganismo nos abatedouros de bovinos na região do Distrito Federal.

Os resultados da presença de *L. monocytogenes* nos abatedouros frigoríficos de aves deste estudo foram similares aos verificados por RODRIGUES *et al.* (2010) e SCHÄFER *et al.* (2017) na região sul do país; por LOURA *et al.* (2005) no estado da

Bahia e por CHIARINI *et al.* (2009) na região sudeste, em que todos detectaram a presença deste microrganismo em amostras de *swabs* coletadas de ambientes, equipamentos e utensílios obtidas nesse tipo de indústria. Os resultados de presença de *L. monocytogenes* nas amostras de *swabs* de ralos neste estudo foram também similares aos observados por BERRANG *et al.* (2005) em abatedouro frigorífico de aves nos Estados Unidos. A detecção do microrganismo nos seguintes pontos: paredes (1/14 isolados), ralos (3/14 isolados), tubos direcionadores (5/14 isolados) e esteiras (3/14 isolados) foram similares aos observados por BERRANG *et al.* (2002), que detectaram a presença deste microrganismo nestes mesmos pontos. No Brasil, RODRIGUES *et al.* (2010) detectaram *L. monocytogenes* em amostras de *swabs* coletados de mesas de aço inox e esteiras pertencentes a este tipo de estabelecimento na região Sul, corroborando com os pontos de contaminação observados nesta pesquisa. A detecção do microrganismo em tubos direcionadores de aço inox (chutes) e esteiras neste estudo foram similares aos observados por SCHÄFER *et al.* (2017), que relataram a presença desse microrganismo nestes mesmos locais, em abatedouro frigorífico de aves localizado em Santa Catarina, na região sul do Brasil. LOURA *et al.* (2005), em estudo realizado em abatedouro frigorífico de aves, localizado no estado da Bahia, também relataram a detecção de *L. monocytogenes* em mesas de aço inox, porém, diferentemente do que foi observado no presente estudo, os autores relataram a presença do microrganismo em utensílios como serras, o que não foi observado nos três abatedouros frigoríficos onde foram realizadas as coletas de *swabs*. Essa divergência pode ser explicada pelo reduzido número de *swabs* coletados neste tipo de utensílio (13/ 169 *swabs*).

Os biofilmes detectados neste estudo, baseados nos critérios de detecção por *swabs*, com repetição de coletas nos mesmos pontos em diferentes visitas para verificar



persistência do microrganismo nos pontos coletados, conforme proposto por BERRANG *et al.* (2005), foram: paredes, ralos, mesas de evisceração, esteiras, e tubulações de aço inox. Todas as coletas foram realizadas após ao menos uma higienização do ambiente, sugerindo persistência do microrganismo, possivelmente pela sua capacidade de aderência em superfícies pela formação de biofilmes (LUNDÉN *et al.*, 2000; BORUCKI *et al.*, 2003; MØRETRØ & LANGSRUD, 2004; BALOGU *et al.*, 2013). Em um dos pontos de coleta, o de tubulações de aço inox (chutes) no abatedouro C, foi detectada a presença de *L. monocytogenes* em duas coletas realizadas em diferentes dias, comprovando a presença de biofilme no local.

Em dois estudos diferentes, nos Estados Unidos, BERRANG *et al.* (2005; 2010) utilizaram a coleta seriada dos mesmos pontos dentro da planta de abate, com intervalos entre as coletas, para caracterizar a presença de isolados persistentes de *L. monocytogenes* em ambientes de abatedouros frigoríficos de aves. Diferentemente do presente estudo, que realizou coletas de diversos pontos das instalações e equipamentos/ utensílios do ambiente dos estabelecimentos, os autores selecionaram apenas ralos como pontos de coleta. No estudo publicado em 2010, os autores concluem que a persistência desse microrganismo nos ralos esteja relacionada com a ocorrência de biofilmes nesse tipo de instalação. No Brasil, também de modo semelhante ao presente estudo, SERENO *et al.* (2019) realizaram coletas seriadas de *swabs* de paredes, ralos, mesas, esteiras e chão em um abatedouro frigorífico de suínos na região Sul, detectando a persistência de estirpes de *L. monocytogenes* no mesmo ponto de coleta ao longo do tempo, o que relaciona-se com a presença de biofilme nesse local. Nos três trabalhos citados, os pontos de persistência do microrganismo, que foram ralos nos relatos de BERRANG *et al.* (2005; 2010) e esteira no relato de SERENO *et al.* (2019), foram pontos onde o presente estudo também detectou a presença desse

microrganismo, apesar de não ter ocorrido detecção no mesmo ponto em mais de uma coleta nesses pontos específicos, mas sim no ponto do tubo de aço inox discutido anteriormente. Em abatedouros frigoríficos de aves localizados no país, este é o primeiro relato de caracterização de biofilme a partir de coletas repetidas de *swabs* em pontos específicos das instalações e equipamentos/utensílios deste tipo de estabelecimento, e realizadas em diferentes visitas por um período de tempo.

#### **4.2. Pesquisa e isolamento de *Salmonella* spp. em abatedouros de aves e bovinos**

Foi detectado um (01) isolado de *Salmonella* spp. nos 287 (0,34%) *swabs* totais coletados de instalações e equipamentos/utensílios de abatedouros-frigoríficos de aves e bovinos na região do Distrito Federal e Goiás. O único isolado de *Salmonella* spp. foi detectado em um dos 169 (0,6%) *swabs* coletados de abatedouros-frigoríficos de aves, sendo oriunda de coleta de amostra de um ralo de área suja do abatedouro frigorífico B, localizado no Distrito Federal. Nenhum isolado de *Salmonella* spp. foi encontrado nas instalações de abatedouros-frigoríficos de bovinos e nem dos outros dois abatedouros-frigoríficos de aves (estabelecimentos A e C) deste estudo. Este é o primeiro relato de pesquisa de *Salmonella* spp. em planta de processamento de abatedouro frigorífico de aves localizado no Distrito Federal, apesar de haver relatos da ocorrência deste microrganismo em carcaças/vísceras de aves produzidas e/ou comercializadas nesta região (FREITAS *et al.*, 2010). Neste estudo não foi detectada a presença de *Salmonella* spp. em nenhuma amostra de *swab* oriunda do abatedouro frigorífico situado no estado de Goiás. No entanto, contrariamente a este resultado, há relatos da presença deste microrganismo em carcaças de frangos produzidas e comercializadas no estado, conforme relatado por MOREIRA *et al.* (2008), que detectaram a presença do

microrganismo. Portanto, não se pode afirmar que não ocorra a presença de *Salmonella* spp. nesta indústria, porém, os resultados de não detecção desse microrganismo podem ser decorrentes da eficiência de programas de autocontrole, higienização e sanitização dentro dessas indústrias.

O resultado de detecção de um único isolado de *Salmonella* spp. pode ser explicado pela combinação prévia com as indústrias dos dias de coletas, que pode ter influenciado o comportamento dos responsáveis pela higienização pré e pós abate. Pode ser justificado também pelo reduzido número de *swabs* coletados, que foi decorrente da resistência das indústrias em permitirem o acesso interno para realização das coletas dos *swabs*. A baixa ocorrência de *Salmonella* spp. em abatedouros frigoríficos de aves também pode ser explicada pela implantação de programas de controle deste microrganismo, que por sua vez objetivam reduzir a incidência desse microrganismo e proteger o consumidor, tais como o Programa de Redução de Patógenos (PRP), criado pela Instrução Normativa nº 70/2003 (BRASIL, 2003b), que foi substituído pelo Programa de Controle e Monitoramento de *Salmonella* spp. em frangos, galinhas e perus de corte e reprodução instituído pela Instrução Normativa nº 20/2016, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2016a); e o Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em frangos (PREBAF) da ANVISA, instituído em 2004 (BRASIL, 2004). No entanto, apesar dos esforços para controle e redução da ocorrência deste patógeno, o isolamento deste microrganismo em carnes, carcaças tanto de aves como de bovinos, e em ambientes de abatedouros-frigoríficos tem sido relatado no país, como demonstrado por REITER *et al.* (2007), MOREIRA *et al.* (2008), PANZENHAGEN *et al.* (2016) e ALMEIDA *et al.* (2018). Apesar disso, é possível que os resultados de baixa detecção desse microrganismo sejam decorrentes de controles internos eficientes de higienização e sanitização de ambientes desses abatedouros

frigoríficos, associados à implantação de programas governamentais que visem o controle de *Salmonella* spp. na indústria de produção de alimentos.

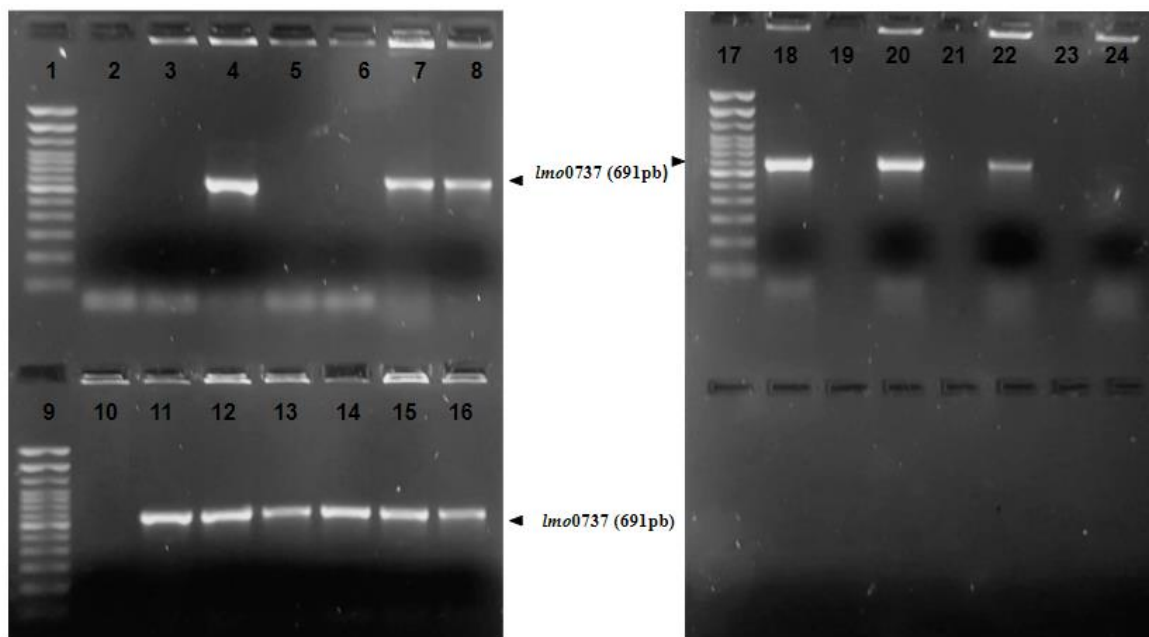
### **4.3. Sorotipificação dos isolados de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp.**

#### **4.3.1. *Listeria monocytogenes***

Todos os 14 isolados de *L. monocytogenes* foram classificados por PCR, segundo a metodologia utilizada, como sorotipos 1/2a ou 3a, pertencentes à linhagem II (PIFFARETTI *et al.*, 1989; WARD *et al.*, 2008; ORSI *et al.*, 2011), com amplificação do gene *lmo0737* (691pb), cujos resultados encontram-se na Figura 2. Para a diferenciação entre os sorotipos 1/2a e 3a, utilizou-se a análise do sequenciamento dos fragmentos do gene da Internalina A, que por sua vez permitiu identificar todos os 14 isolados como pertencentes ao sorotipo 1/2a. Atualmente a sorotipificação tem sido realizada através do sequenciamento completo do genoma (Whole genome sequencing – WGS). No entanto, na ausência da disponibilidade desta tecnologia, a sorotipificação por PCR tem sido ferramenta útil e auxiliado na diferenciação das principais linhagens deste microrganismo (DOUMITH *et al.*, 2004; KÉROUANTON *et al.*, 2010).

Os resultados encontrados neste estudo são similares aos descritos por CHIARINI *et al.* (2009) que, ao compararem a ocorrência de *L. monocytogenes* em dois abatedouros frigoríficos de aves localizados no estado de São Paulo, observaram que a maioria dos isolados pertenciam à linhagem II (1/2a, 3a). Porém, os autores não realizaram a diferenciação entre esses sorotipos. Estudos também relatam a ocorrência desse sorotipo em alimentos coletados em diversas regiões do Brasil (ROSSI *et al.*, 2011; MENDONÇA *et al.*, 2012; RISTORI *et al.*, 2014), além de sua ocorrência em

ambientes de produção de alimentos de origem animal (PALMA *et al.*, 2016; MELONI *et al.*, 2013). Os resultados também estão de acordo com os achados de PALMA *et al.*, 2016, que relataram que os isolados oriundos de amostras ambientais de abatedouro frigorífico de bovinos no Distrito Federal pertenciam ao sorotipo 1/2a. Apesar de se tratar de amostras oriundas de ambientes de abatedouro frigorífico de bovinos, o relato de PALMA *et al.* (2016) evidencia a presença deste sorotipo na região do Distrito Federal.



**Figura 2.** Resultado da sorotipificação por PCR multiplex das estirpes de *Listeria monocytogenes*. Números **1,9 e 17**: DNA ladder 100 bp (Invitrogen®); Números **4,7,8,11,12,13,14,15,16,18,20 e 22**: cepas que amplificaram o gene-alvo *lmo0737*. Todos os isolados amplificaram apenas o gene-alvo *lmo0737* (691 pb), classificando-as como sorotipo 1/2a ou 3a (linhagem II).

Os resultados de detecção do sorotipo 1/2a deste trabalho corroboram com os resultados da literatura, que apontam este sorotipo, junto com os sorotipos 1/2b e 1/2c, como um dos mais comumente detectados a partir de amostras de alimentos e ambientes de produção de alimentos de origem animal (SWAMINATHAN & GERNER-SMIDT, 2007). Adicionalmente, mais de 95% das infecções humanas são causadas pelos sorotipos 1/2a, 1/2c e 4b (SWAMINATHAN & GERNER-SMIDT, 2007). No Brasil, REIS *et al.* (2009) relatam a ocorrência do sorotipo 1/2a oriundo de amostras clínicas de

humanos, onde o sorotipo 1/2a foi o segundo mais detectado. Desta forma, o sorotipo 1/2a detectado neste estudo pode ser considerado como um potencial perigo para a saúde pública.

#### **4.3.2. *Salmonella* spp.**

A análise do genoma (WGS na plataforma Next Seq da Illumina) do único isolado de *Salmonella* permitiu identificá-lo como *Salmonella enterica* sorovar Ruiru. Este resultado diverge com os encontrados por FREITAS *et al.* (2010), que relatam a ocorrência do sorovar Enteritidis em vísceras e carcaças de aves comercializadas na região do Distrito Federal, e por MOREIRA *et al.* (2008), que pesquisaram a ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frango abatidas e comercializadas na região de Goiás e detectaram com maior frequência os sorovares Albany e Enteritidis. Também no estado de Goiás, MORAES *et al.* (2014) relatam a detecção mais frequente dos sorovares Schwarzengrund e Enteritidis isoladas de amostras coletadas ao longo do fluxo de produção de frangos de corte neste estado. Na região sudeste, DANTAS *et al.* (2020) relatam a ocorrência de *Salmonella* Heidelberg e Enteritidis como os dois sorovares mais frequentes em amostras de *swabs* coletados de ambiente de um abatedouro frigorífico de aves no estado de São Paulo. A detecção do sorovar Ruiru no presente estudo também diverge dos dados apresentados no relatório do monitoramento da prevalência e do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas, comercializadas no Brasil entre 2004 e 2006, do PREBAF (BRASIL, 2008), que relata os sorovares Enteritidis, Infantis, Typhimurium, Heidelberg e Mbandaka como os mais frequentemente detectados.

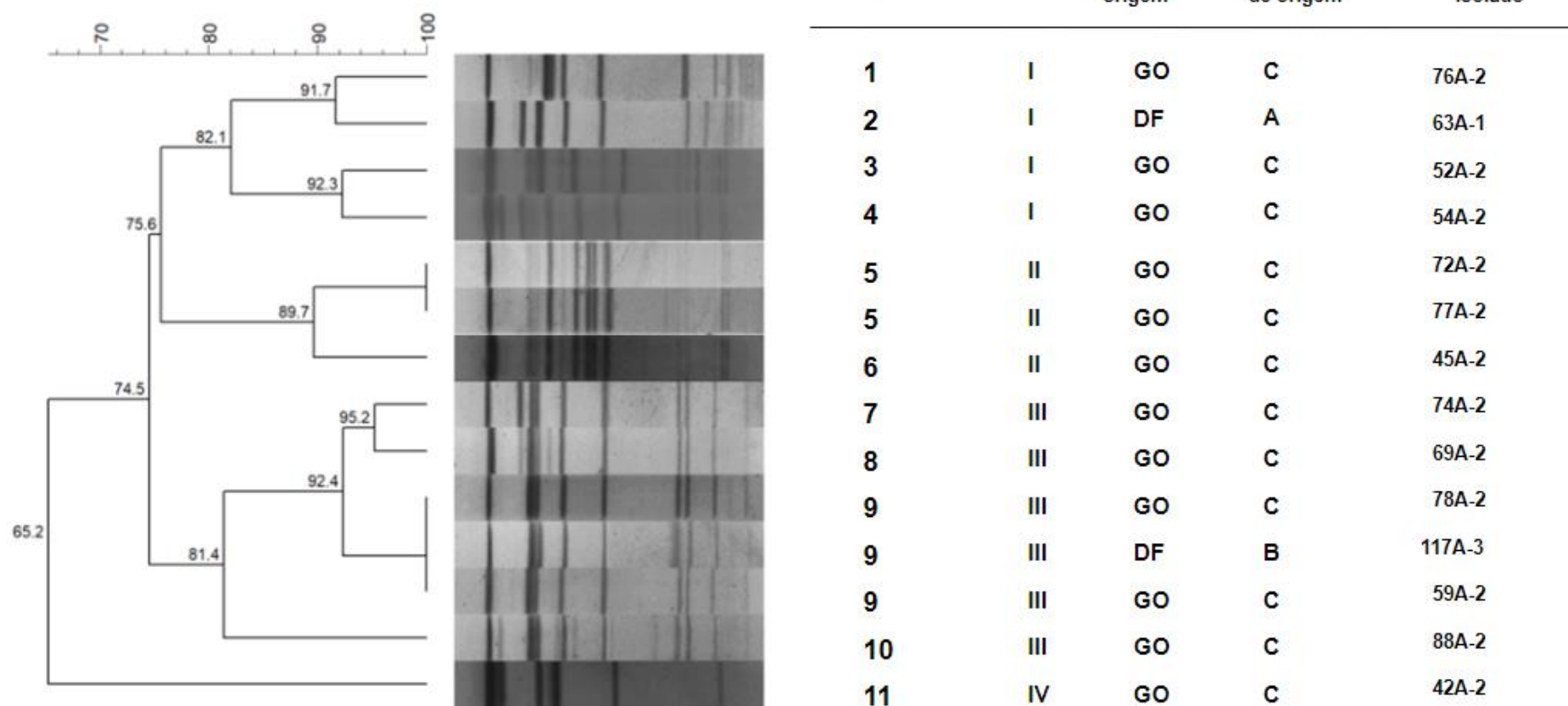
Não há relato de detecção do sorovar Ruiru em estabelecimentos de abatedouros frigoríficos de aves e bovinos no país, nem há relatos de isolamento deste sorovar de

nenhum outro tipo de amostra ou material, sendo este o primeiro a relatar a presença do mesmo em um abatedouro frigorífico de aves (estabelecimento B), localizado na região do Distrito Federal. Esse sorovar foi isolado pela primeira vez em 1955, e foi detectado de fontes animais e humanas entre 1955 e 1963 (LAPAGE & TAYLOR, 1964), além de ter sido descrito por GITTER & SOJKA (1964) como causador de um surto de aborto em ovelhas na Inglaterra. Também foi descrito em 1996 em amostras oriundas de casos de diarreia esporádica em humanos nas Filipinas (MATSUSHITA *et al.*, 1995). Em 2016, esse sorovar foi descrito no relatório anual do programa de monitoramento de doenças entéricas para *Salmonella* do Centers for Disease Control and Prevention, dos EUA, em casos de salmonelose humana (CDC, 2016). Portanto, a presença deste sorovar em ambiente de abatedouro frigorífico de aves pode representar um risco para a saúde pública.

#### **4.4. Identificação de pulsotipos de *Listeria monocytogenes* por PFGE**

Os resultados de polimorfismo obtidos pela técnica de PFGE dos 14 isolados de *L. monocytogenes* após tratamento pela enzima *Ascl* resultaram em 11 pulsotipos distintos, sendo estes agrupados em quatro *clusters* (I, II, III, IV) (Figura 3). O pulsotipo 9 (Figura 3) foi o mais comumente encontrado (3/14 isolados), seguido pelo pulsotipo 5 (2/14 isolados). Os demais isolados apresentaram pulsotipos distintos entre si. O abatedouro frigorífico C, localizado no estado de Goiás, em que se detectou 12 dos 14 isolados de *L. monocytogenes*, apresentou 10 pulsotipos. O pulsotipo 5, pertencente ao *cluster* II, foi identificado em dois pontos de coleta diferentes, sendo uma amostra oriunda de tubo de aço inox e uma de mesa de evisceração, sugerindo a disseminação dessa cepa dentro da planta do abatedouro frigorífico C. O pulsotipo 9, pertencente ao *cluster*

## PFGE - *AscI*



**Figura 3.** Dendrograma (método UPGMA baseado no coeficiente de correlação de Dice a 1,5% de tolerância) e padrões de PFGE dos 14 isolados de *L. monocytogenes* submetidos a restrição com a enzima *AscI*. Os dados foram analisados pelo software BioNumerics®. Pulsotipos, *clusters*, origem dos isolados (Distrito Federal ou Goiás), estabelecimento de origem (A, B ou C) e identificação do isolado.



III, foi identificado em dois pontos de coleta diferentes dentro dessa mesma indústria (na esteira e tubo de aço inox), também sugerindo a disseminação dessa cepa dentro do abatedouro frigorífico C (Tabela 1). Vale ressaltar que o pulsotipo 9 foi isolado em pontos diferentes dentro da mesma planta, e em coletas distintas, realizadas em diferentes momentos. Desse modo, apesar de haver higienizações entre as coletas, o fato deste estudo ter identificado a mesma cepa em coletas diferentes, dentro do mesmo estabelecimento, indica a presença de biofilmes na indústria, corroborando desta forma com os relatos de BERRANG *et al.* (2005), BERRANG *et al.* (2010), CAMARGO *et al.* (2015a) e SERENO *et al.* (2019). O pulsotipo 9 também foi detectado em uma amostra de ralo obtida no abatedouro frigorífico B, localizado no Distrito Federal. Esse resultado sugere disseminação desse pulsotipo nas regiões estudadas, uma vez que a mesma cepa foi isolada em dois abatedouros-frigoríficos diferentes (B e C), localizados em regiões diferentes, sendo respectivamente as regiões do Distrito Federal e Goiás. Para análise de disseminação de cepas dentro das indústrias e nas regiões estudadas, foram consideradas variações clonais apenas os isolados que apresentaram 100% de identidade entre si.

Os resultados deste estudo confirmam a importância do emprego de métodos de tipificação molecular com elevado poder discriminatório como o PFGE para pesquisa de disseminação e persistência de cepas dentro de plantas processamento de alimentos (WIEDMANN, 2002; BERRANG *et al.*, 2002; MAGALHÃES, *et al.*, 2005; CAMARGO *et al.*, 2015a). De modo semelhante aos resultados do presente estudo em relação ao uso a ferramenta PFGE, CAMARGO *et al.* (2015a) realizaram coletas seriadas de pontos do ambiente, cortes cárneos e mãos de empregados de um abatedouro frigorífico de bovinos no estado de Minas Gerais, em diferentes visitas, que permitiram, por PFGE, a identificação de contaminação cruzada entre esses pontos e a ocorrência da persistência de certos pulsotipos na indústria. Os resultados do presente estudo confirmam a

persistência de dois pulsotipos (5 e 9) dentro do abatedouro frigorífico C. Porém, em função do baixo número de isolados identificados nos outros abatedouros frigoríficos (A e B) avaliados neste estudo, não foi possível confirmar a persistência dos isolados dentro destes estabelecimentos. No entanto, a detecção dos isolados antes do início do funcionamento dos abatedouros frigoríficos (pré higienização) e após o término do abate (pós higienização) sugerem a presença contínua deste microrganismo em biofilmes pré formados nessas instalações.

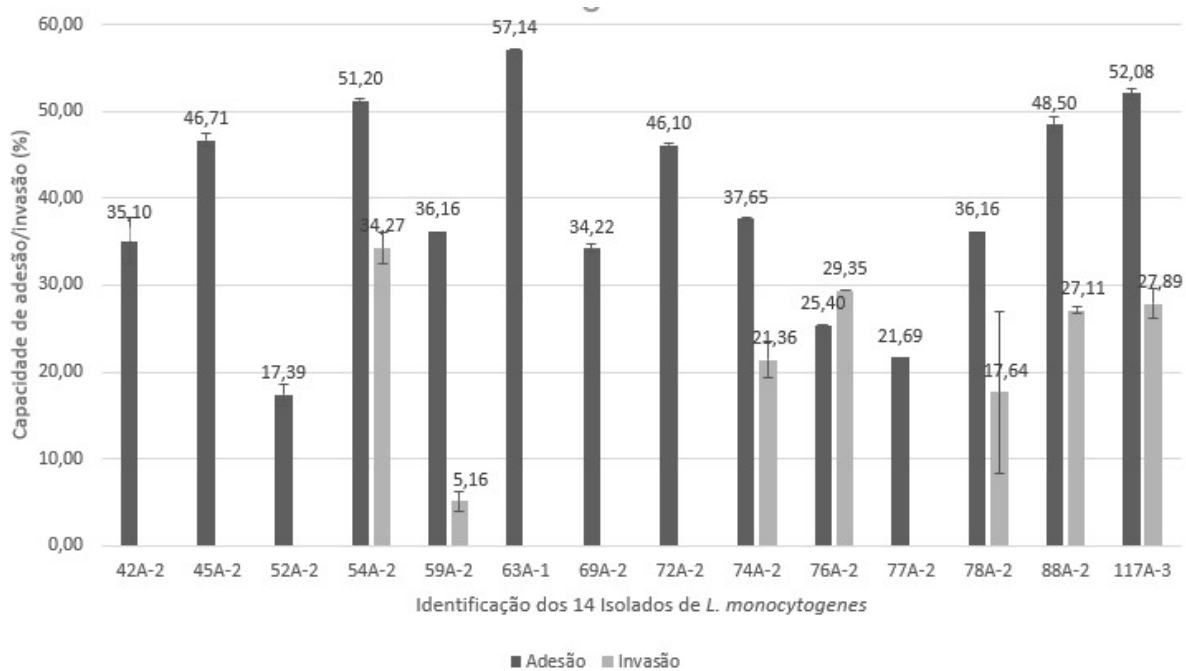
#### **4.5. Análise da sequência dos fragmentos do gene *inlA***

A análise do sequenciamento dos fragmentos do gene da Internalina A (2400bp), em todos os 14 isolados de *Listeria monocytogenes*, não evidenciou a presença de *stop codons* prematuros (PMSCs) em nenhum dos isolados deste estudo (Anexo B). Esses resultados estão de acordo com os relatados por MEDEIROS (2019), que relata ausência de PMSCs em isolados de *L. monocytogenes* oriundos de amostras de ralos de abatedouro frigorífico de aves na região do Distrito Federal. Também estão de acordo com os resultados apresentados por SMITH *et al.* (2019), que relatam ausência de PMSCs em isolados advindos de amostras de ambientes de processamento de alimentos e produtos prontos para consumo no Reino Unido. O presente estudo também está de acordo com os achados de WANG *et al.* (2015), que relatam que é rara a ocorrência de PMSCs em isolados advindos de superfícies de mercados de embutidos nos Estados Unidos. Porém, os resultados do presente estudo divergem dos resultados apresentados por MANUEL *et al.* (2015), nos Estados Unidos, e CAMARGO *et al.* (2019), no Brasil, que relatam maior ocorrência de PMCSs em cepas isoladas a partir de amostras de alimentos e ambientes de produção de alimentos.

A ocorrência de PMSCs em isolados de *L. monocytogenes* está associada com fenótipos de invasão atenuada (NIGHTINGALE *et al.*, 2005; NIGHTINGALE *et al.*, 2008). Estudos mostram que isolados oriundos de casos de listeriose humana possuem PMSCs no gene *inlA* com menor frequência do que isolados oriundos de alimentos (MANUEL *et al.*, 2015; DA SILVA *et al.*, 2017; CAMARGO *et al.*, 2019). Os resultados de ausência de PMSCs relatados no presente estudo são de importância para a saúde pública uma vez que a integridade do gene *inlA* é necessária para a promoção da internalização deste patógeno nas células hospedeiras (LECUIT *et al.*, 1997; NIGHTINGALE *et al.*, 2005).

#### **4.6. Ensaio de adesão e invasão de células Caco-2 dos isolados de *Listeria monocytogenes***

Os resultados do teste de invasão celular em células Caco-2 dos 14 isolados de *L. monocytogenes* demonstraram que todos os isolados foram capazes de aderir à superfície celular, com capacidade de aderência que variou entre 17,38% e 57,14%. Com relação à capacidade de invasão celular, 7 dos 14 isolados (50%) foram capazes de invadir as células Caco-2, com capacidade de invasão variando entre 5,16% e 34,27%. Os resultados dos testes de invasão e adesão em células Caco-2 dos 14 isolados de *L. monocytogenes* encontram-se na Figura 4. Observou-se que os isolados que apresentaram capacidade de invasão pertenciam aos *clusters* I e III, e aos pulsotipos 1 (76A-2), 4 (54A-2), 7 (74A-2), 9 (59A-2, 78A-2 e 117A-3) e 10 (88A-2) (Figura 3). Os três isolados pertencentes ao pulsotipo 9 foram capazes de invadir as células Caco-2, porém em capacidades distintas (5,16%, 17,64% e 27,89% para 59A-2, 78A-2 e 117A-3, respectivamente).



**Figura 4.** Resultados dos testes de invasão e adesão em células Caco-2 dos 14 isolados de *Listeria monocytogenes*. Todos os testes foram realizados em triplicata. Os valores apresentados são a média simples dos resultados, e as barras representam o desvio padrão.

A capacidade de invasão foi observada em sete (07) dos 14 isolados analisados no presente estudo, nos quais não foi detectada a presença de *stop codons* prematuros (PMSCs) no sequenciamento dos fragmentos de PCR do gene *InIA*, segundo o protocolo descrito por POYART *et al.* (1996). Os resultados dos sete (07) isolados de *L. monocytogenes* que foram capazes de adesão e invasão corroboram com os achados de NIGHTINGALE *et al.* (2005), que relatam que isolados sem a presença de PMSCs possuem capacidade de invasão de células Caco-2 significativamente maior do que isolados que possuem PMSCs no gene *inIA*. Entretanto, os resultados divergem em relação aos outros sete (07) isolados que, apesar de não apresentarem PMSCs, não foram capazes de invadir as células Caco-2. Diversos estudos comprovam o papel central da *inIA* para invasão celular (NIGHTINGALE *et al.*, 2005; OLIER *et al.*, 2005; DA SILVA *et al.*, 2017), porém, sugere-se que outros elementos também possuam importância para a internalização de *L. monocytogenes* em diferentes tipos celulares, tais como a internalina B (*inIB*) (QUEREDA *et al.*, 2019) e a listeriolisina O (LLO)

(PHELPS *et al.*, 2018). Ademais, estudos mostram diferenças em capacidade de invasão entre isolados com o gene *inlA* completo, indicando que outros fatores, e não apenas a presença de PMSCs, podem estar relacionados com eficiência de invasão de *L. monocytogenes* (WARD *et al.*, 2010).

#### 4.7. Antibiograma e detecção de genes de resistência antimicrobiana de *Listeria monocytogenes*

Os isolados de *L. monocytogenes* apresentaram resistência ou sensibilidade intermediária para 7 dos 8 antimicrobianos testados. Os resultados estão descritos na Tabela 2. Seis (06) dos 14 isolados (42,9%) apresentaram sensibilidade para todos os antimicrobianos testados. Oito (08) isolados apresentaram resistência ou sensibilidade intermediária (57,1%) e, dentre estes, foram observados seis (06) perfis de resistência antimicrobiana distintos (Tabela 3).

Antimicrobiano e classe	nº de isolados resistentes (%)	nº de isolados com sensibilidade intermediária (%)	nº de isolados sensíveis (%)	Total de isolados resistentes ou intermediários (%)
Sulfonamidas (sulfonamida)	8 (57.1)	0 (0.0)	6 (42.9)	8 (57.1)
Eritromicina (macrolídeo)	4 (28.6)	1 (7.1)	9 (64.3)	5 (35.7)
Ciprofloxacino (quinolona)	3 (21.4)	3 (21.4)	8 (57.2)	6 (42.9)
Gentamicina (aminoglicosídeo)	4 (28.6)	1 (7.1)	9 (64.3)	5 (35.7)
Cloranfenicol (cloranfenicol)	0 (0.0)	4 (28.6)	10 (71.4)	4 (28.6)
Tetraciclina (tetraciclina)	1 (7.1)	1 (7.1)	12 (85.8)	2 (14.3)
Doxiciclina (tetraciclina)	1 (7.1)	0 (0.0)	13 (92.9)	1 (7.1)
Ampicilina (beta-lactâmico)	0 (0.0)	0 (0.0)	14 (100)	0 (0.0)

**Tabela 2.** Antibiograma dos 14 isolados de *Listeria monocytogenes*, oriundos de abatedouros frigoríficos de aves localizados na região do Distrito Federal e Goiás, realizados por meio dos testes de difusão em disco para resistência antimicrobiana (CLSI, 2020).

Perfil de resistência	nº de isolados resistentes ou intermediários	nº de isolados resistentes ou intermediários / nº de isolados total (%)
CIP, CLO, DOX, ERI, GEN, SUL, TET	1	7.1
CIP, CLO, ERI, GEN, SUL, TET	1	7.1
CIP, CLO, ERI, GEN, SUL	2	14.3
CIP, ERI, GEN, SUL	1	7.1
CIP, SUL	1	7.1
SUL	2	14.3
Não apresentou resistência	6	42.9

CIP: ciprofloxacino; CLO: cloranfenicol; DOX: doxiciclina; ERI: eritromicina; SUL: sulfonamidas; TET: tetraciclina.

**Tabela 3.** Padrões de resistência antimicrobiana apresentados pelos 14 isolados de *L. monocytogenes* oriundos de abatedouros frigoríficos localizados na região do Distrito Federal e Goiás.

A ausência de resistência à ampicilina e cloranfenicol detectadas neste estudo corroboram com os resultados observados por outros autores. PALMA *et al.* (2016) relatam sensibilidade a esses antimicrobianos em isolados de *L. monocytogenes* oriundos de cortes cárneos de bovinos e ambientes de abatedouro frigorífico localizado no Distrito Federal. CAMARGO *et al.* (2014) relatam a ausência de resistência antimicrobiana a esses antimicrobianos em isolados de *L. monocytogenes* obtidos a partir de couro de bovinos no estado de Minas Gerais. Em outro estudo, CAMARGO *et al.* (2015b) também relatam a ausência de resistência antimicrobiana de *L. monocytogenes* a essas drogas, sendo os microrganismos oriundos de amostras de carne bovina, de ambientes de processamento de carne bovina e de casos clínicos de humanos, de diversas regiões do Brasil. Os resultados deste estudo também corroboram com os relatos de HAUBERT *et al.* (2015), que não detectaram resistência à ampicilina e cloranfenicol em isolados oriundos de amostras de alimentos e ambientes de produção de alimentos na região sul do Brasil. O resultado de ausência de resistência à ampicilina

e cloranfenicol também corrobora com os resultados apresentados por TEIXEIRA *et al.* (2020), que relatam sensibilidade à ampicilina e cloranfenicol em todos os isolados de *L. monocytogenes* oriundos de cortes de carne bovina no estado do Mato Grosso. Esse resultado também corrobora com estudos de outros países, como resultados de GÓMEZ *et al.* (2014), que relatam ausência de resistência a estes antibióticos em isolados de ambientes de processamento de alimentos de origem animal e produtos prontos para consumo na Espanha, e MAUNG *et al.* (2019), que relatam ausência de resistência à ampicilina em amostras oriundas de carne de frango no Japão. A vigilância sobre ocorrência de resistência à ampicilina é de grande importância para a saúde pública, visto que esse medicamento é um dos tratamentos de escolha para listeriose humana (CHARPENTIER & COURVALIN, 1999). Já a sensibilidade ao cloranfenicol pode ser explicada pelo banimento do uso deste antimicrobiano na produção de alimentos de origem animal no Brasil desde 2003 (BRASIL, 2003a).

Os resultados de resistência e sensibilidade intermediária para ciprofloxacino, eritromicina e gentamicina observados neste estudo, de 42,8%, 35,7% e 35,7% dos isolados de *L. monocytogenes* respectivamente, foram contrários aos observados por outros autores, tais como TEIXEIRA *et al.* (2020), que relatam ausência de resistência para estes três antimicrobianos nos isolados deste microrganismo oriundos de cortes de carne bovina no estado do Mato Grosso. CONTER *et al.* (2009) relatam ausência de resistência a eritromicina e gentamicina de isolados oriundos de alimentos e ambientes de produção de alimentos na Itália, e ocorrência de resistência a ciprofloxacino em 1,6% dos isolados, ocorrência menor do que a de 21,4% observada no presente estudo. O resultado de resistência à gentamicina e à eritromicina traz preocupações à saúde pública, uma vez que são medicamentos de escolha para tratamento de listeriose em casos específicos, como o uso de gentamicina associada à penicilina como alternativa à

ampicilina, e o uso de eritromicina para tratamento em grávidas (CHARPENTIER & COURVALIN, 1999; CRAIG *et al.*, 2019).

A baixa ocorrência de resistência à doxiciclina detectada neste estudo corrobora com os achados de VITAS *et al.* (2007), que relatam a baixa ocorrência de resistência a este antimicrobiano em isolados de *L. monocytogenes* obtidos em alimentos e casos clínicos humanos na Espanha. Porém, os resultados observados neste estudo para resistência à doxiciclina divergem dos detectados por MIRANDA *et al.* (2008), que relatam maior frequência de isolados resistentes a esta droga oriundos de carcaças de frango na Espanha. Os resultados de baixa detecção de resistência antimicrobiana à tetraciclina no presente estudo (7,1% dos isolados) corroboram com os achados de HAUBERT *et al.* (2015) em isolados oriundos de alimentos e ambientes de produção de alimentos na região sul do Brasil, e também com os relatos de GÓMEZ *et al.* (2014) na Espanha e de CONTER *et al.* (2009) na Itália, em isolados oriundos de alimentos e de ambientes de processamento de alimentos. No entanto, os resultados detectados no presente estudo divergem dos descritos por PALMA *et al.* (2016) no Distrito Federal, em que não houve detecção de resistência à tetraciclina em isolados oriundos de cortes de carne bovina e ambiente de abatedouro frigorífico de bovinos. Os resultados deste estudo também divergem dos resultados apresentados por CAMARGO *et al.* (2015b), que relatam ausência de resistência à tetraciclina em isolados oriundos de carne bovina, ambientes de processamento de carne bovina e casos clínicos de humanos de diversas regiões do Brasil.

A maior ocorrência de resistência antimicrobiana detectada neste estudo foi em relação às sulfonamidas, detectada em 8 dos 14 isolados (57,1%). Esses resultados corroboram com os resultados detectados por PALMA *et al.* (2016), que também relatam altas ocorrências de resistência a esta classe de antimicrobiano, em isolados oriundos de cortes cárneos bovinos e ambientes de abatedouro frigorífico de bovinos no Distrito



Federal. Esses resultados também corroboram os os achados de TEIXEIRA *et al.* (2020), que relatam a ocorrência de resistência às sulfonamidas em isolados de *L. monocytogenes* oriundos de cortes cárneos no estado do Mato Grosso. Também se assemelham com os resultados de ZHANG *et al.* (2007), que detectou alta ocorrência de resistência a sulfonamidas em isolados oriundos de alimentos na China. Sulfonamidas, associadas ao trimetropim, são consideradas como tratamento de segunda escolha para listeriose humana (CHARPENTIER & COURVALIN, 1999), portanto a detecção de resistência a esta classe de antimicrobianos pode oferecer riscos à saúde pública.

Os resultados de detecção dos genes de resistência encontram-se na Tabela 4. Verificou-se a presença de 4 dos 14 genes pesquisados nos isolados de *L. monocytogenes*. O gene mais detectado foi o gene *tetC*, em 11 dos 14 isolados de *L. monocytogenes* (78,6%). O segundo gene mais detectado foi o *tetB*, presente em 5 dos 14 isolados (35,71%). Em seguida, o gene *ermB* em 2 dos 14 isolados (14,28%), sendo a mesma frequência observada para o gene *tetM* (14,28%). Um dos isolados apresentou os genes *ermB*, *tetC* e *tetM*. Não foram detectados os genes *ermA*, *ermC*, *cat1*, *sull*, *aaC(3)-1*, *cmlA*, *ereA*, *SHV* e *ampC* em nenhum dos 14 isolados de *L. monocytogenes* deste estudo.

Gene de resistência antimicrobiana	n° de isolados positivos	n° de isolados positivos / n° de isolados total (%)
<i>ermA</i>	0	0.0
<i>ermB</i>	2	14.28
<i>ermC</i>	0	0.0
<i>cat1</i>	0	0.0
<i>tetM</i>	2	14.28
<i>tetA</i>	0	0.0
<i>tetB</i>	5	35.71
<i>tetC</i>	11	78.6
<i>sull</i>	0	0.0
<i>aac(3)-1</i>	0	0.0

<i>cmlA</i>	0	0.0
<i>ereA</i>	0	0.0
<i>SHV</i>	0	0.0
<i>ampC</i>	0	0.0

*ermA*, *ermB*, *ermC*, *ereA*: resistência a eritromicina (macrolídeo); *cat1*, *cmlA*: resistência a cloranfenicol; *tetM*, *tetA*, *tetB*, *tetC*: resistência a tetraciclina; *sulI*: resistência a sulfonamidas; *aac(3)-I*: resistência a gentamicina (aminoglicosídeo); *SHV*: resistência a beta-lactâmicos; *ampC*: resistência a beta-lactâmicos.

**Tabela 4.** Detecção por PCR de genes de resistência antimicrobiana nos 14 isolados de *Listeria monocytogenes* oriundos de abatedouro frigorífico, localizados na região do Distrito Federal e Goiás.

Os resultados de detecção do gene *ermB* dentre os genes relacionados à resistência a eritromicina corroboram os achados de HAUBERT *et al.* (2015), que relatam a detecção deste gene em um isolado de *L. monocytogenes* oriundo de ambiente de abatedouro de aves na região sul do Brasil. Estes resultados também corroboram com os achados de MORVAN *et al.* (2010), que detectaram o gene *ermB* em isolados de *L. monocytogenes* oriundos de amostras clínicas na França. O resultado de ausência do gene *ereA* em todos os isolados deste estudo corrobora com os resultados de SRINIVASAN *et al.* (2005), que relatam ausência desse gene em isolados de *L. monocytogenes* oriundos de fazendas de produção leiteira nos Estados Unidos. A ausência do gene *ermA* corrobora com os achados de MAUNG *et al.* (2019), que relatam ausência deste gene em isolados oriundos de carne de frango no Japão. Também corrobora com os achados de ESCOLAR *et al.* (2017), que relatam ausência deste gene em isolados oriundos de alimentos prontos para consumo de origem animal na Espanha. No presente estudo, apenas dois dos quatro isolados de *Listeria monocytogenes*, que apresentaram fenótipo de resistência à eritromicina no teste de difusão em disco (Tabela 2), apresentaram um dos genes de resistência relacionados à eritromicina pesquisados neste estudo. É possível que os isolados que não apresentaram os genes *ermA*, *ermB* ou *ermC* apresentem genes relacionados a outros mecanismos de resistência a este

antimicrobiano, como os genes *msr(A)* ou *mef(A)*, relacionados à resistência via bombas de efluxo (LUQUE-SASTRE *et al.*, 2018), ou que a resistência destes isolados relacione-se com uma mutação cromossômica (MORVAN *et al.*, 2010).

Os resultados de presença do gene *tetM* em dois isolados (14,28%) corroboram com os resultados apresentados por BERTRAND *et al.* (2005), que relatam a presença deste gene em isolados com fenótipo de resistência à tetraciclina em estirpes oriundas de amostras clínicas de humanos e de ambientes de abatedouros frigoríficos de suínos e aves na Bélgica e França. Também corroboram com os resultados de HAUBERT *et al.* (2015), que relatam a detecção deste gene em um isolado de *L. monocytogenes* obtido de amostra de linguiça na região sul do Brasil. Diversos estudos relatam o gene *tetM* como o genótipo mais comumente relacionado à resistência a tetraciclina em isolados de *Listeria* (BERTRAND *et al.*, 2005; ESCOLAR *et al.*, 2017), o que difere dos resultados obtidos no presente estudo, onde o gene relacionado à resistência à tetraciclina mais detectado foi *tetC*. Esses resultados diferem dos observados por SRINIVASAN *et al.* (2005), que relatam ausência do gene *tetC* em isolados de *L. monocytogenes* obtidos de amostras de fazendas de produção leiteira nos Estados Unidos. Os resultados de presença do gene *tetB* em 5 isolados no presente estudo também divergem dos resultados observados pelos mesmos autores neste mesmo estudo, onde não houve detecção do gene *tetB* em nenhum dos isolados (SRINIVASAN *et al.*, 2005). Apesar da detecção do gene *tetC* em 11 dos 14 isolados (78.6%), apenas dois apresentaram fenótipo de resistência ou sensibilidade intermediária à tetraciclina no teste e difusão em disco (Tabela 2). Um destes dois isolados apresentou dois dos quatro genes pesquisados relacionados à resistência contra essa droga (*tetC* e *tetM*) (Tabela 5). O outro isolado apresentou apenas o gene *tetC*. O isolado que apresentou apenas o gene *tetC* apresentou sensibilidade intermediária a este antimicrobiano, enquanto que o isolado que continha os dois genes, *tetC* e *tetM*, apresentou resistência à droga. Todos

os outros nove isolados que portavam o gene *tetC* não apresentaram resistência à tetraciclina no teste de difusão em disco. Portanto, a presença única do gene *tetC* nos isolados deste estudo não conferiu fenótipo de resistência à tetraciclina aos mesmos, significando que a presença dos genes não necessariamente desencadeia o fenótipo de resistência, o que pode estar relacionado com a presença de mutações que levem à disfunção do gene (DAVIS *et al.*, 2011).

Apesar da ocorrência de resistência antimicrobiana à gentamicina em cinco (05) dos 14 isolados no teste de difusão em disco (Tabela 2), não se detectou a presença do gene *aac(3)-1* em nenhum dos isolados. É possível que a resistência à gentamicina destes isolados relacione-se com a presença de outros genes não pesquisados neste estudo, uma vez que mais de 170 genes relacionados à resistência a aminoglicosídeos foram descritos em bactérias (LUQUE-SASTRE *et al.*, 2018), o que poderia ocorrer através do sequenciamento completo do genoma, em havendo disponibilidade desta tecnologia.

Os resultados de ausência do gene *sull* em todos os isolados de *L. monocytogenes* divergiram dos resultados detectados por SRINIVASAN *et al.* (2005), que relatam a presença desse gene em isolados oriundos de ambientes de fazendas de produção de leite nos Estados Unidos. No presente estudo, observou-se resistência às sulfonamidas em 8 dos 14 isolados no teste de difusão em disco, mas nenhum dos isolados apresentou o gene *sull*. É possível que essa resistência esteja associada a outros mecanismos, como a presença de outros genes relacionados à resistência a sulfonamidas, como o gene *sul2*, *folP* ou *thyA*, sendo os últimos dois genes previamente descritos em *L. monocytogenes* (WANG *et al.*, 2019).

Os resultados de ausência do gene *cmIA* corroboram com os achados de SRINIVASAN *et al.* (2005), que também relatam ausência do mesmo em isolados de *L. monocytogenes* oriundos de ambientes de fazendas de produção leiteira nos Estados

Unidos. Com relação ao gene *cat1*, o resultado de ausência corrobora com os resultados de BOHÁČOVÁ *et al.* (2018), que relatam ausência desse gene em isolados de *L. monocytogenes* oriundos de amostras clínicas e de alimentos de origem animal, obtidos na República Tcheca. No presente estudo, apenas sensibilidade intermediária a cloranfenicol foi observada em 4 dos 14 isolados no teste de difusão em disco, e nenhum apresentou os genes *cmIA* ou *cat1*. O resultado de sensibilidade intermediária observada neste estudo pode relacionar-se com resistência cruzada pela presença de outros genes não pesquisados, como o gene *floR* (SRINIVASAN *et al.*, 2005). Portanto, os resultados de ausência dos genes relacionados à resistência a cloranfenicol estão de acordo com os resultados esperados nos testes de difusão em disco dos isolados deste estudo. Vale ressaltar que, no Brasil, este antimicrobiano foi banido do uso na produção animal no ano de 2003 (BRASIL, 2003a), eliminando desta forma o fator de pressão de seleção.

Os resultados de ausência do gene *ampC* corroboram com os resultados de SRINIVASAN *et al.* (2005), que constataram a ausência desse gene em isolados oriundos de ambientes de fazendas de produção leiteira nos Estados Unidos. A ausência desse gene e do gene *SHV* são consistentes com os resultados de ausência de fenótipo de resistência à ampicilina no teste de difusão em disco.

O presente estudo detectou quatro isolados (28,5%) de *L. monocytogenes* caracterizados como multirresistentes (MR), ou seja, apresentando resistência a três ou mais classes de antimicrobianos (EFSA/ECDC, 2013). A identificação dos isolados e o perfil de resistência dos mesmos estão relacionados na Tabela 5. Todos os isolados que apresentaram MR foram oriundos do mesmo estabelecimento (abatedouro C), localizado no estado de Goiás. Os isolados 54A-2 e 52A-2, que apresentaram respectivamente resistência a cinco (05) e a três (03) classes de antimicrobianos, foram classificados nos pulsotipos 4 e 3, respectivamente, pertencentes ao *cluster* I da análise dos padrões de PFGE (Figura 3), apresentando 92,3% de similaridade entre si. Dois desses isolados

(54A-2 e 88A-2) apresentaram capacidade de adesão e invasão no teste de adesão e invasão celular em células Caco-2.

Identificação do isolado	Fenótipo de resistência segundo teste de difusão em disco (CLSI, 2020)	Gene de resistência detectado por PCR	Pulsotipo	Cluster
54A-2	CIP DOX ERI GEN SUL TET	<i>ermB - tetC - tetM</i>	4	I
52A-2	ERI GEN SUL	<i>ermB - tetC</i>	3	I
72A-2	CIP GEN SUL	<i>tetC</i>	5	II
88A-2	ERI GEN SUL	<i>tetB - tetC</i>	10	III

CIP: ciprofloxacino; DOX: doxiciclina; ERI: eritromicina; GEN: gentamicina; SUL: sulfonamidas; TET: tetraciclina.

**Tabela 5.** Antibiograma e detecção de genes de resistência antimicrobiana dos quatro isolados de *Listeria monocytogenes* multirresistentes oriundos de abatedouro frigorífico localizado no estado de Goiás (estabelecimento C).

A descrição de isolados de *L. monocytogenes* apresentando multirresistência tem aumentado na literatura. MAUNG *et al.* (2019) relatam um aumento na ocorrência de MR em *L. monocytogenes* oriundas de carne de frango no Japão em 2017, quando comparada com isolados de 2012. ESCOLAR *et al.* (2017) relatam a detecção de isolados deste microrganismo multirresistentes em amostras oriundas de alimentos prontos para consumo na Espanha. No Brasil, HAUBERT *et al.* (2015) relatam a detecção de MR em 5 isolados oriundos de alimentos de origem animal, e ambientes de abatedouros frigoríficos de aves no sul do Brasil. Porém, diferentemente dos resultados do presente estudo de ocorrência de multirresistência em 28,5% dos isolados, HAUBERT *et al.* (2015) relatam a ocorrência em 10% dos isolados analisados. HAUBERT *et al.* (2015) também relatam a presença de genes de resistência *ermB* e *tetM* em dois dos isolados multirresistentes detectados. De modo semelhante, o presente estudo detectou a presença destes dois genes em isolados multirresistentes, porém, também houve detecção dos genes *tetB* e *tetC* nestes isolados (Tabela 5). Diversos mecanismos estão

relacionados com o desenvolvimento e resistência a antimicrobianos em *L. monocytogenes*, como mutações e aquisição de elementos móveis a partir de outras espécies de *Listeria* ou outros gêneros de bactérias (LUQUE-SASTRE *et al.*, 2018; POYART-SALMERON *et al.*, 1992). Ademais, isolados de *L. monocytogenes* multirresistentes podem ser fontes de genes de resistência para outras bactérias através de elementos genéticos móveis (HAUBERT *et al.*, 2015), os quais podem ser detectados pelo sequenciamento completo do genoma, que não foi possível realizar nestes isolados. Todos os isolados multirresistentes detectados nesse estudo apresentaram resistência a antimicrobianos utilizados no tratamento da listeriose humana (gentamicina e eritromicina). Os resultados de multirresistência detectados neste estudo são de grande importância para a saúde pública, considerando a importância desses antimicrobianos como tratamentos de escolha para listeriose humana (CHARPENTIER & COURVALIN, 1999), e a possibilidade de transferência de genes de isolados multirresistentes para outros. Desse modo, mais estudos são necessários para elucidação de todos os mecanismos de resistência observados nestes isolados e seu real potencial como fonte de transferência de resistência a outros microrganismos. Ademais, a comprovada capacidade de invasão detectada em dois destes isolados multirresistentes reafirmam seu potencial risco para a saúde pública e sublinham a necessidade de vigilância para detecção de isolados potencialmente patogênicos na cadeia de produção de alimentos de origem animal.

#### **4.8. Antibiograma e detecção de genes de resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp.**

Na análise do antibiograma, foi detectada resistência ou sensibilidade intermediária do isolado de *Salmonella* spp. em nove (09) dos 13 antimicrobianos testados. Observou-se resistência aos antimicrobianos ácido nalidíxico, amoxicilina,

ampicilina, cefalotina, cefazolina, ceftazidima, sulfonamidas e tetraciclina. Observou-se sensibilidade intermediária para o antibiótico doxiciclina, e sensibilidade para as bases ciprofloxacino, cloranfenicol, gentamicina e colistina (Tabela 6).

Os resultados de detecção de resistência aos antimicrobianos tetraciclina e ampicilina, e os resultados de sensibilidade aos antimicrobianos ciprofloxacino e gentamicina foram semelhantes aos resultados obtidos por DANTAS *et al.* (2020), que relatam este mesmo padrão de resistência em isolados de *Salmonella* spp., oriundos de ambiente de abatedouro frigorífico de aves no estado de São Paulo. Porém, diferentemente do resultado de sensibilidade ao cloranfenicol detectado no presente estudo, esses autores relatam a ocorrência de resistência a esse antimicrobiano em 2.5% das amostras pesquisadas. A detecção de resistência às bases ampicilina, cefalotina e sulfonamidas, além da sensibilidade ao ciprofloxacino corroboram com os achados de CUNHA-NETO *et al.* (2018), que detectaram estes resultados em isolados de *Salmonella* spp. oriundos de carcaças de frango de um abatedouro frigorífico no estado do Mato Grosso. Porém, esses autores relatam a detecção de resistência à gentamicina e cloranfenicol e sensibilidade ao ácido nalidíxico, o que diverge dos resultados observados no presente estudo. A detecção de resistência aos antimicrobianos sulfonamidas, tetraciclina, amoxicilina e ceftazidima estão de acordo com os resultados detectados por MENDONÇA *et al.* (2019), que relatam a ocorrência de resistência em isolados oriundos de carne de frango e ambientes de granja e de abatedouros frigoríficos nos estados de São Paulo e Mato Grosso do Sul. Diferentemente dos resultados encontrados neste estudo, em que não houve detecção de resistência à gentamicina e cloranfenicol, esses autores detectaram resistência a esses antimicrobianos em 1,2% e 0,4% dos isolados, respectivamente. O resultado de resistência a ampicilina, tetraciclina, ácido nalidíxico e ciprofloxacino corroboram com os resultados detectados por ZHU *et al.* (2017), que relatam altas taxas de resistência a



esses antimicrobianos em isolados de *Salmonella* spp. oriundos de carne de frango na China. Porém, esses autores também relatam ocorrência de resistência a gentamicina em menor taxa (10,3%), o que difere do presente estudo, onde não houve detecção de resistência a esse antimicrobiano.

A detecção de resistência a ácido nalidíxico em isolados de *Salmonella* spp. é amplamente relatada (YAMATOOGI *et al.*, 2015; ZHU *et al.*, 2017; VINUEZA-BURGOS *et al.*, 2019). VOSS-RECH *et al.* (2017), ao realizarem meta-análise de publicações por um período de 20 anos no Brasil, relatam o aumento na ocorrência de resistência a essa quinolona em isolados oriundos de amostras de humanos e de carne de frango. A resistência ao ácido nalidíxico pode ser devida à ampla utilização desse antimicrobiano na medicina humana e veterinária ao longo dos anos, uma vez que esta foi a primeira droga da classe das quinolonas a ter utilização clínica (ROBICSEK *et al.*, 2006). Apesar de estudos sugerirem correlação entre resistência a ácido nalidíxico e ciprofloxacino em alguns sorogrupos de *Salmonella* spp. (HAKANEN *et al.*, 1999; GUZMÁN-MARTÍN *et al.*, 2018), o presente estudo não detectou essa correlação, uma vez que não houve detecção de resistência ou sensibilidade intermediária ao ciprofloxacino. A resistência à tetraciclina, sulfonamidas e beta-lactâmicos podem estar relacionados com o uso excessivo destes antimicrobianos nas diferentes fases da cadeia de produção de carne de frango no Brasil (PARANÁ, 2005).

O presente estudo detectou resistência às três bases da classe das cefalosporinas testadas. Essa classe de antimicrobianos, em especial os de terceira geração, são considerados como antimicrobianos de importância crítica para a saúde humana e animal (WHO, 2019). Estudos tem relatado detecção de resistência a cefalosporinas, inclusive de terceira e quarta geração, nos últimos anos (MA *et al.*, 2018; JEON *et al.*, 2019). Portanto, o resultado de detecção de resistência a antimicrobianos da classe das cefalosporinas, em especial a ceftazidima, representa uma preocupação à saúde pública

e indica a necessidade da vigilância e parcimônia no uso de antimicrobianos na medicina veterinária. Nesse sentido, nos últimos anos, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) tem promovido restrições ao uso de antimicrobianos na produção de alimentos de origem animal, como a proibição do uso de cloranfenicol e nitrofuranos em 2003 (BRASIL, 2003a), de sulfato de colistina em 2016 (BRASIL, 2016b) e, mais recentemente, a proibição do uso de tilosina, lincomicina e tiamulina em território nacional (BRASIL, 2020).

Em relação à detecção de genes de resistência antimicrobiana, a análise completa do sequenciamento do genoma (número de acesso no GenBank: JABBE000000000.1) demonstrou a presença dos genes *tetA*, *sul2*, *aac(6')-Iaa*, *blaCMY-2*, *qnrB19* e da mutação no gene *parC* p. T57S (ACC →AGC, causando desta forma a mutação T→S, que por sua vez confere resistência ao ácido nalidíxico e diminuição da sensibilidade a fluoroquinolonas, como o ciprofloxacino). Os resultados do antibiograma e da detecção de genes de resistência encontram-se na Tabela 6.

Antibiograma (drogas testadas)	Resultado do antibiograma (S= sensível; I= sensibilidade intermediária; R= resistente)	Genes de resistência antimicrobiana
Ác. Nalidixico	R	<i>qnrB19</i>
Amoxicilina	R	<i>blaCMY-2</i>
Ampicilina	R	<i>blaCMY-2</i>
Cefalotina	R	<i>blaCMY-2</i>
Cefazolina	R	<i>blaCMY-2</i>
Ceftazidima	R	<i>blaCMY-2</i>
Ciprofloxacino	S	-
Cloranfenicol	S	-
Colistina	S	-
Doxiciclina	I	-
Gentamicina	S	<i>aac(6')-Iaa</i>
Sulfonamidas	R	<i>sul2</i>
Tetraciclina	R	<i>tetA</i>

**Tabela 6.** Antibiograma e detecção de genes de resistência antimicrobiana do isolado de *Salmonella enterica* sorovar Ruiru oriundo de abatedouro frigorífico de aves localizado no Distrito

Federal, realizado por meio do teste de difusão em disco (CLSI, 2020) e por WGS, respectivamente.

Todos os genes de resistência detectados no presente estudo foram descritos em isolados de *Salmonella* spp. no Brasil (VILELA *et al.*, 2018; MONTE *et al.*, 2019). Observou-se a presença concomitante de resistência a quinolonas mediada por plasmídeo (PMQR), através do gene *qnrB19*, e de mutação na região determinante de resistência a quinolonas (QRDR), no gene *parC* da Topoisomerase IV. Essas características genéticas se confirmaram com a expressão de resistência ao ácido nalidíxico, mas não houve detecção de resistência ao ciprofloxacino no teste de difusão em disco. Apesar disso, a presença do gene *qnrB19*, assim como de outros genes relacionados a PMQR, pode ser responsável pela redução da susceptibilidade às quinolonas, o que pode facilitar a seleção de isolados menos susceptíveis e consequente falha no tratamento com essa classe de drogas (JACOBY *et al.*, 2015). Portanto, a detecção de PMQR neste estudo evidencia a necessidade de vigilância sobre a persistência de genes de resistência a quinolonas na cadeia produtiva de aves.

O gene *blaCMY-2* é o gene plasmidial relacionado à produção de beta-lactamases (pAmpC) mais comumente detectado no mundo (JACOBY, 2009). O resultado da presença desse gene corrobora com os resultados de resistência aos beta-lactâmicos observados no teste de difusão em disco (ampicilina, cefalotina, cefazolina e ceftazidima). Sua presença traz preocupações para a saúde pública, considerando a importância dos beta-lactâmicos, especialmente cefalosporinas de terceira geração, para a saúde humana (WHO, 2019).

A presença do gene *aac(6')-Iaa*, relacionado à resistência a aminoglicosídeos, não conferiu resistência à gentamicina, única base dessa classe de antimicrobianos avaliada no teste de difusão em disco. Essa discordância entre fenótipo e genótipo também foi observada em isolados de *Salmonella* spp. oriundos de diferentes amostras na cadeia de

produção de frango dos estados de São Paulo, Bahia e Minas Gerais (MONTE *et al.*, 2019). Por outro lado, a ocorrência de resistência a tetraciclina e a sulfonamidas relaciona-se com a presença dos genes *tetA* e *sul2*, respectivamente. O resultado de ausência de genes de resistência à colistina detectados neste estudo corrobora com os resultados detectados por MONTE *et al.* (2019), que relatam ausência destes genes em isolados de *Salmonella* spp. obtidos a partir de amostras das cadeias de produção de suínos e aves oriundas de diversas regiões do Brasil, incluindo o Distrito Federal.

O perfil de resistência observado neste isolado de *Salmonella* spp. classifica-o como um isolado multirresistente (EFSA/ECDC, 2013). Essa característica, associada com a presença de elementos genéticos móveis relacionados à resistência como presença de PMQR e pAmpC sugerem potencial risco à saúde pública, considerando a origem do isolado em um abatedouro frigorífico de aves. Ademais, a ocorrência de resistência a quinolonas e cefalosporinas, associada à presença de elementos genéticos relacionados a esse fenótipo, são de especial preocupação, visto a importância destas drogas na saúde humana (WHO, 2019). Os resultados deste estudo sugerem a importância da manutenção da vigilância sobre a ocorrência de resistência antimicrobiana em *Salmonella* spp., em especial a vigilância sobre a ocorrência de isolados multirresistentes, e sugere também a necessidade de controle e revisão do uso de antimicrobianos como quinolonas e cefalosporinas na cadeia produtiva de carne de frango no Brasil.

#### **4.9. Capacidade de formação de biofilme de *Listeria monocytogenes***

Os resultados do teste de capacidade de formação de biofilme dos isolados de *L. monocytogenes*, de acordo com protocolo descrito por DJORDJEVIC *et al.* (2002), mostraram que na temperatura de incubação de 37°C, 11 dos 14 isolados (78,57%)

foram capazes de formação de biofilme com 24 horas de incubação, sendo todos classificados como formadores fracos de biofilme ( $DO_n < DO_i \leq 2xDO_n$ ). Na temperatura de incubação de 12°C, nove (09) dos 14 isolados (64,3%) foram capazes de formar biofilme com 168 horas (sete dias) de incubação, sendo todos também classificados como formadores fracos de biofilme ( $DO_n < DO_i \leq 2xDO_n$ ) (Tabela 7).

Identificação do isolado	DOi a 37°C	DOi a 12°C	Classificação a 37°C	Classificação a 12°C
42A-2	0,068	0,064	Fraco	Fraco
45A-2	0,061	0,053	Fraco	Não formador
52A-2	0,066	0,053	Fraco	Não formador
54A-2	0,05	0,059	Não formador	Não formador
59A-2	0,066	0,079	Fraco	Fraco
63A-1	0,069	0,072	Fraco	Fraco
69A-2	0,072	0,076	Fraco	Fraco
72A-2	0,057	0,06	Fraco	Não formador
74A-2	0,0835	0,091	Fraco	Fraco
76A-2	0,0756	0,074	Fraco	Fraco
77A-2	0,063	0,063	Fraco	Fraco
78A-2	0,047	0,069	Não formador	Fraco
88A-2	0,0515	0,052	Fraco	Não formador
117A-3	0,063	0,089	Fraco	Fraco

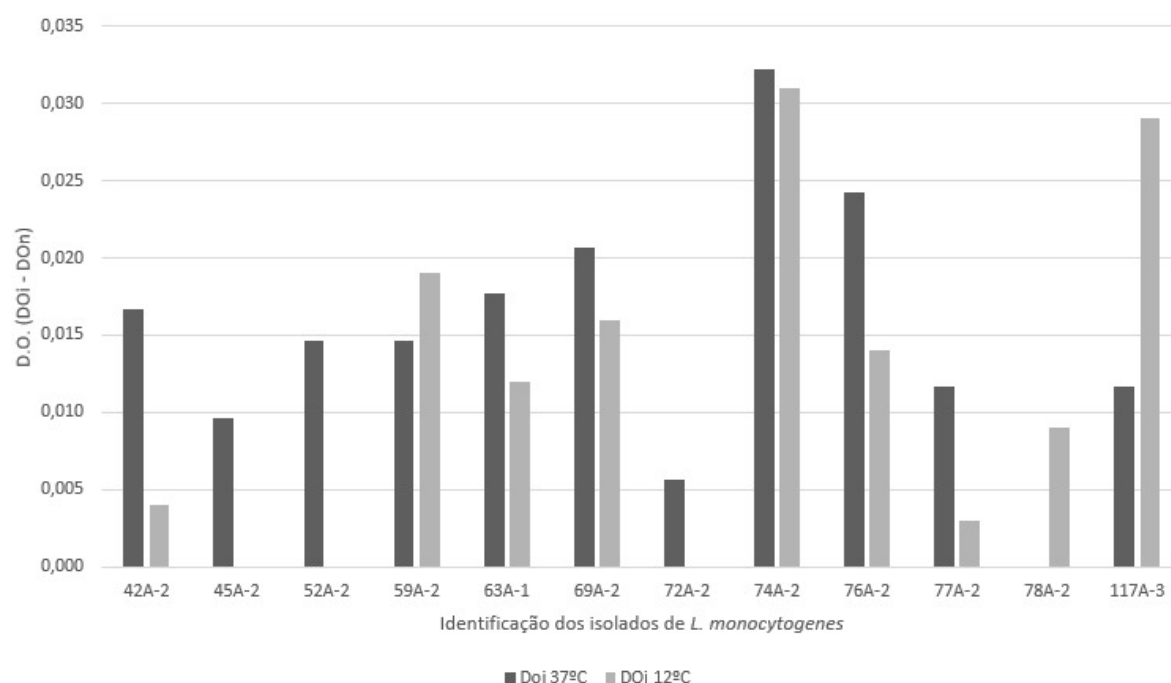
Parâmetros de classificação segundo STEPANOVIĆ *et al.* (2000): não formador se  $DO_i \leq DO_n$ ; formador fraco de biofilme se  $DO_n < DO_i \leq 2xDO_n$ ; formador de biofilme moderado se  $2xDO_n < DO_i \leq 4xDO_n$  e formador forte de biofilme se  $4xDO_n < DO_i$ .

**Tabela 7.** Resultados do teste de capacidade de formação de biofilmes *in vitro*, em microplaca de poliestireno, dos 14 isolados de *L. monocytogenes* de acordo com a classificação proposta por STEPANOVIĆ *et al.*, 2000. DOi: densidade óptica do isolado. Os valores de densidade óptica do controle negativo (DON) são: DON a 37°C: 0.0513 e DON a 12°C: 0.060.

Os resultados observados de capacidade de formação de biofilme pelos isolados de *L. monocytogenes* corroboram com outros estudos que relatam a capacidade das mesmas em aderir e formar biofilmes em superfícies abióticas (HARVEY *et al.*, 2007; DI BONAVENTURA *et al.*, 2008; MAGALHÃES *et al.*, 2017). Os resultados observados de

fraca capacidade de formação de biofilme da maioria dos isolados (78,57%) a 37°C corroboram com os achados de HARVEY *et al.* (2007), que relatam que 90% dos isolados de *L. monocytogenes* testados pelos mesmos foram classificados como formadores fracos de biofilme.

Na análise estatística realizada com o programa SAS (University Edition, Cart, North Carolina) pela análise de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk seguida do teste T pareado para comparação de médias entre os dois grupos, os resultados demonstraram que não houve diferença significativa ( $p=0.2450$ ) na capacidade de formação de biofilme dos isolados quando incubados a 12°C e 37°C (Figura 5). Esses



**Figura 5.** Resultados do teste de capacidade de formação de biofilme *in vitro* em microplacas de poliestireno (DJORDJEVIC *et al.*, 2002) dos 12 isolados de *L. monocytogenes* que apresentaram capacidade de formação de biofilme a 37°C e/ou a 12°C. As barras representam a média de leitura da densidade óptica de cada ensaio para cada isolado (DOi), todos realizados em triplicata, subtraídos da média da densidade óptica do controle negativo para cada repetição (DOn).

resultados divergem de estudos anteriores, que indicam a temperatura como fator significativo para capacidade de formação de biofilme (DI BONAVENTURA *et al.*, 2008; KADAM *et al.*, 2013). Porém, a diferença nos resultados pode ser devido a diferenças metodológicas relacionadas com o tempo de incubação em cada temperatura. Para uma

avaliação adequada da capacidade de formação de biofilme a 12°C quando comparada com 37°C, futuros testes com o mesmo tempo de incubação (24 horas) deverão ser realizados com a temperatura de 12°C para que se avalie o real papel da temperatura baixa dentro da indústria como uma ferramenta válida na inibição da capacidade de formação de biofilmes desses isolados. Porém, independente da comparação entre as temperaturas testadas, os resultados de capacidade de formação de biofilme a 12°C de nove (09) dos 14 isolados evidencia os riscos que esses isolados podem representar para as indústrias em caso de falhas na higienização dos ambientes.

De uma maneira geral, a maioria dos isolados deste estudo demonstraram a capacidade de formação de biofilme no ambiente de abatedouro frigorífico de aves das áreas estudadas em ao menos uma das temperaturas testadas. Aliado aos achados da repetição de detecção de variações clonais dentro de mesma indústria em pontos diferentes (isolados 72A-2 e 77A-2, pertencentes ao pulsotipo 5, oriundos do abatedouro frigorífico C), e ainda aos resultados de detecção de mesma cepa disseminada nas instalações frigoríficas que foi identificada em visitas diferentes e em pontos de coleta diferentes dentro da mesma indústria, além da identificação deste mesmo pulsotipo em outro abatedouro de outra região (59A-2 e 78A-2, oriundos do abatedouro frigorífico C, no estado de Goiás; e o isolado 117A-2, oriundo do abatedouro frigorífico B, localizado no Distrito Federal, todos pertencentes ao pulsotipo 9), é possível afirmar que existem biofilmes de *L. monocytogenes* em abatedouros frigoríficos de aves localizados no Distrito Federal e Goiás. A detecção da capacidade de formação de biofilme dos isolados, especialmente em temperaturas observadas dentro de abatedouros frigoríficos, como a temperatura de 12°C, indica a possibilidade de aderência desses isolados nas instalações, equipamentos e utensílios desses ambientes, o que sugere a possibilidade de aderência e formação de biofilmes nos ambientes estudados em caso de falhas nos procedimentos de higienização, determinando um potencial risco para a saúde pública

em função da contaminação cruzada dos alimentos. O teste de capacidade de formação de biofilmes em microplacas de poliestireno foi de grande valia neste estudo em função de sua praticidade e reprodutibilidade, e permitiu verificar a capacidade de aderência em superfícies abióticas dos isolados de *L. monocytogenes* deste trabalho.

#### **4.10. Capacidade de formação de biofilme de *Salmonella* spp.**

O resultado do teste de capacidade de formação de biofilmes do isolado de *Salmonella* spp., segundo protocolo descrito por DJORDJEVIC *et al.* (2002) e modificado por BORGES *et al.* (2018), mostrou que o isolado possui capacidade de formação de biofilme nas temperaturas de 37°C e 12°C, e classificou o isolado como formador fraco de biofilme em ambas as temperaturas. Esses resultados corroboram com os resultados de YIN *et al.* (2018), que relatam a capacidade de formação de biofilme de isolados de *Salmonella* spp. oriundos de ambientes de produção de carne bovina na China em diferentes temperaturas, incluindo as temperaturas de 12°C e 37°C. A mesma limitação relacionada ao tempo de incubação nas diferentes temperaturas se fez presente nesta análise. Desta forma, a avaliação da capacidade de formação de biofilme a 12°C em 24 horas seria importante para a análise do papel da temperatura como fator inibidor da formação de biofilme deste isolado. Apesar disso, os resultados observados no presente estudo sugerem o potencial risco para a saúde pública oferecido pelo isolado de *Salmonella* spp. detectado em ambiente de abatedouro frigorífico nesse estudo, uma vez que, em adição à sua característica de multirresistência a antimicrobianos, este isolado possui capacidade de aderência em superfícies abióticas, o que o torna um potencial contaminante de alimentos processados na indústria.



## 5.CONCLUSÕES

Foi detectada a presença de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. em ambientes de abatedouros frigoríficos de aves localizados no Distrito Federal e estado de Goiás, sendo equipamentos e utensílios, especialmente tubulações de aço inox, os principais pontos de contaminação dentro das plantas avaliadas. Não houve detecção em abatedouros frigoríficos bovinos. A coleta consistente e repetida dos pontos permitiu a caracterização do biofilme nos ambientes destas indústrias, o que foi confirmado em 12 dos isolados de *L. monocytogenes* e no isolado de *Salmonella* spp. pelo teste de capacidade de formação de biofilme *in vitro* a 12°C e/ou 37°C. A análise dos padrões de PFGE permitiu definir a disseminação de pulsotipos específicos tanto dentro de uma indústria como nas regiões estudadas, sendo este o primeiro estudo desta natureza nesta região. O sequenciamento do gene *inlA* dos isolados de *L. monocytogenes* demonstrou a ausência de PMSCs em todos os isolados. Esses resultados, associados aos resultados dos testes de adesão e invasão, sugerem potencial de virulência dos mesmos. A detecção de resistência a antimicrobianos de importância para a saúde pública em isolados de *L. monocytogenes* e no isolado de *Salmonella* spp., além da detecção de isolados multirresistentes, também sublinham o risco potencial para o consumidor final devido à possibilidade de contaminação cruzada dos alimentos nas indústrias estudadas via contato com os biofilmes formados nas superfícies abióticas. Os resultados deste estudo permitem comprovar a importância de pesquisas que sustentem uma vigilância em ambientes de abatedouros frigoríficos para que, com essas informações, possam adequar os procedimentos de higiene locais. Além disso, a detecção de isolados com potencial patogênico relacionado a capacidade de invasão celular, capacidade de formação de biofilme e resistência antimicrobiana auxiliam na

avaliação de risco para a população, sendo, portanto, um instrumento para a proteção da saúde pública.

## 6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, Frank Møller *et al.* **Antimicrobial susceptibility and presence of resistance genes in staphylococci from poultry.** Veterinary microbiology, v. 74, n. 4, p. 353-364, 2000.

ALMEIDA, Fernanda *et al.* **Phylogenetic and antimicrobial resistance gene analysis of Salmonella Typhimurium strains isolated in Brazil by whole genome sequencing.** PloS one, v. 13, n. 8, 2018.

ALVAREZ, J.; SOTA, M.; VIVANCO, A.B.; PERALES, I.; CISTERNA, R.; REMENTERIA, A.; GARAIZAR, J. **Development of a Multiplex PCR Technique for Detection and Epidemiological Typing of Salmonella in Human Clinical Samples.** Journal of Clinical Microbiology, v. 42, n. 4, p. 1734-1738, abr. 2004

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNES - ABIEC. **Beef Report - Perfil da Pecuária no Brasil - Relatório anual.** 2019. Disponível em <http://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2019/>. Acesso em 10 de maio de 2020.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL - ABPA. **Protocolo de Bem-Estar para Frangos de Corte.** São Paulo, 2016. Disponível em [http://abpa-br.com.br/storage/files/protocolo\\_de\\_bem-estar\\_para\\_frangos\\_de\\_corte\\_2016.pdf](http://abpa-br.com.br/storage/files/protocolo_de_bem-estar_para_frangos_de_corte_2016.pdf). Acesso em 16 de julho de 2018.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL - ABPA. **Relatório Anual 2019.** São Paulo, 2019. Disponível em <http://abpa-br.org/wp-content/uploads/2019/08/Relat%C3%B3rio-Anual-2019.pdf>. Acesso em 10 de maio de 2020.

BALOGU, T.V.; NWAUGO, V.O.; ONYEAGBA, R.A; BALOGU, D.O. **Assessment of Listeria monocytogenes and biofilm formation in poultry abattoirs.** Developmental Journal of Science and Technology Research, v. 2, n. 1, p. 165-171, 2013.

BARBUDDHE, S.; HAIN, T.; CHAKRABORTY, T. Listeria. In: GOLDMAN, E.; GREEN, L.H. **Practical Handbook of Microbiology.** 3.ed. Florida: CRC Press, 2015. cap. 37, p. 653-689.

BARROS, Márcia AF *et al.* **Listeria monocytogenes: Occurrence in beef and identification of the main contamination points in processing plants.** Meat science, v. 76, n. 4, p. 591-596, 2007.

BERRANG, M. E. *et al.* **Molecular characterization of Listeria monocytogenes isolated from a poultry further processing facility and from fully cooked product.** Journal of Food protection, v. 65, n. 10, p. 1574-1579, 2002.

BERRANG, M. E. *et al.* **Distribution of Listeria monocytogenes subtypes within a poultry further processing plant.** Journal of food protection, v. 68, n. 5, p. 980-985, 2005.

BERRANG, Mark E. *et al.* **Colonization of a newly constructed commercial chicken further processing plant with *Listeria monocytogenes*.** Journal of food protection, v. 73, n. 2, p. 286-291, 2010.

BERTRAND, Sophie *et al.* **Detection and characterization of tet (M) in tetracycline-resistant *Listeria* strains from human and food-processing origins in Belgium and France.** Journal of medical microbiology, v. 54, n. 12, p. 1151-1156, 2005.

BEZZERA, W.I.; MARTINS, T.D.D. **Análise dos Pontos Críticos em uma unidade frigorífica de abate de suínos em Igarassu-PE.** Anais da Jornada Nacional da Agroindústria. Bananeiras, Paraíba. Universidade Federal da Paraíba, 2008.

BOHÁČOVÁ, Martina *et al.* **Monitoring of resistance genes in *Listeria monocytogenes* isolates and their presence in the extracellular DNA of biofilms: a case study from the Czech Republic.** Folia microbiologica, v. 63, n. 5, p. 653-664, 2018.

DI BONAVENTURA, G. *et al.* **Influence of temperature on biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on various food-contact surfaces: relationship with motility and cell surface hydrophobicity.** Journal of applied microbiology, v. 104, n. 6, p. 1552-1561, 2008.

BORGES, Karen A. *et al.* **Biofilm formation capacity of *Salmonella* serotypes at different temperature conditions.** Pesquisa Veterinaria Brasileira, v. 38, n. 1, p. 71-76, 2018.

BORUCKI, Monica K. *et al.* **Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*.** Appl. Environ. Microbiol., v. 69, n. 12, p. 7336-7342, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.09, 27 de junho de 2003. **Proibir a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos.** Diário Oficial da União, Brasília, 27 jun. 2003a.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.70, 10 de outubro de 2003. **Dispõe sobre o Programa de redução de Patógenos, monitoramento microbiológico e controle de *Salmonella* sp. em carcaças de frangos e perus.** Diário Oficial da União, Brasília, seção 1, p. 9, 10 out. 2003b.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango – PREBAF.** 20 p. Brasília, jul. 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Relatório do Monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil – PREBAF.** 186 p. Brasília, Brasil, jan. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da *Salmonella* spp.** Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.20, 21 de outubro de 2016. **Estabelece o controle e o monitoramento de *Salmonella* spp. nos estabelecimentos avícolas comerciais de frangos e perus de corte e nos estabelecimentos de abate de frangos, galinhas, perus de corte e reprodução, registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF), com objetivo de reduzir a prevalência desse agente e estabelecer um nível adequado de proteção ao consumidor.** Diário Oficial da União, Brasília, seção 1, p. 13, 21 out. 2016a.

BRASIL.Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 45, 22 de novembro de 2016. **Proibir, em todo o território nacional, a importação ea fabricação da substância antimicrobiana sulfato de colistina, com afinidade de aditivo zootécnico melhorador de desempenho na alimentaçãoanimal, na forma desta Instrução Normativa.** Diário Oficial da União, Brasília, seção 1, p. 6, 30 nov. 2016b.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 01, 13 de janeiro de 2020. **Proibir, em todo território nacional, a importação, a fabricação, a comercialização e o uso de aditivos melhoradores de desempenho que contenham os antimicrobianos tilosina, lincomicina, e tiamulina, classificados como importantes na medicina humana, na forma desta Instrução Normativa.** Diário Oficial da União, Brasília, seção 1, p. 6, 23 jan. 2020.

CAMARGO, Anderson Carlos *et al.* **Low occurrence of Listeria monocytogenes on bovine hides and carcasses in Minas Gerais State, Brazil: molecular characterization and antimicrobial resistance.** Journal of food protection, v. 77, n. 7, p. 1148-1152, 2014.

CAMARGO, Anderson Carlos *et al.* **Serotypes and pulsotypes diversity of Listeria monocytogenes in a beef-processing environment.** Foodborne pathogens and disease, v. 12, n. 4, p. 323-326, 2015a.

CAMARGO, Anderson Carlos *et al.* **Antibiotic resistance of Listeria monocytogenes isolated from meat-processing environments, beef products, and clinical cases in Brazil.** Microbial Drug Resistance, v. 21, n. 4, p. 458-462, 2015b.

CAMARGO, Anderson Carlos *et al.* **Listeria monocytogenes in food-processing facilities, food contamination, and human listeriosis: the Brazilian scenario.** Foodborne pathogens and disease, v. 14, n. 11, p. 623-636, 2017.

CAMARGO, Anderson C. *et al.* **Whole-genome sequencing reveals Listeria monocytogenes diversity and allows identification of long-term persistent strains in Brazil.** Environmental microbiology, v. 21, n. 12, p. 4478-4487, 2019.

CARPENTIER, Brigitte; CERF, Olivier. **Persistence of Listeria monocytogenes in food industry equipment and premises.** International journal of food microbiology, v. 145, n. 1, p. 1-8, 2011.

CASTELLANO, P. *et al.* **Lactobacillus spp. impair the ability of Listeria monocytogenes FBUNT to adhere to and invade Caco-2 cells.** Biotechnology letters, v. 40, n. 8, p. 1237-1244, 2018.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of Listeria monocytogenes.** 2015. 15 p. Disponível em <https://www.cdc.gov/pulsenet/PDF/listeria-pfge-protocol-508c.pdf>. Acesso em 11 de maio de 2020.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **National Enteric Disease Surveillance: Salmonella Annual Report, 2016.** Disponível em <https://www.cdc.gov/nationalsurveillance/pdfs/2016-Salmonella-report-508.pdf>. Acesso em 12 de maio de 2020.

CENCIČ, Avreljja; LANGERHOLC, Tomaž. **Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology—a review.** International journal of food microbiology, v. 141, p. S4-S14, 2010.

CESAR, Alessandra Paro Rodrigues *et al.* **Listeria spp. e Listeria monocytogenes na produção de salsichas tipo Hot Dog e hábitos de consumo.** 2008.

CHARPENTIER, Emmanuelle; COURVALIN, Patrice. **Antibiotic Resistance in Listeria spp.** Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 43, n. 9, p. 2103-2108, 1999.

CHEN, B. Y. *et al.* **Antibiotic resistance in Listeria species isolated from catfish fillets and processing environment.** Letters in applied microbiology, v. 50, n. 6, p. 626-632, 2010.

CHIARINI, Eb *et al.* **Listeria monocytogenes in two different poultry facilities: manual and automatic evisceration.** Poultry Science, v. 88, n. 4, p. 791-797, 2009.

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **CLSI M100 - ED30:2020 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.** 30 ed. Disponível em <http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20ED30:2020&scope=user>. Acesso em 11 de maio de 2020.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION – CAC/GL 63-2007. **Principles and Guidelines for the conduct of microbiological risk management (MRM).** 2007.

CONTER, Mauro *et al.* **Characterization of antimicrobial resistance of foodborne Listeria monocytogenes.** International journal of food microbiology, v. 128, n. 3, p. 497-500, 2009.

CORCORAN, M.; MORRIS, D.; DE LAPPE, N.; O'CONNOR, J.; LALOR, P.; DOCKERY, P.; CORMICAN, M. **Commonly used disinfectants fail to eradicate Salmonella enterica biofilms from food contact surface materials.** Applied and Environmental Microbiology, v. 80, n. 4, p. 1507-1514, fev. 2014.

CRAIG, Amanda M. *et al.* **Listeriosis in pregnancy: a review.** Obstetrical & Gynecological Survey, v. 74, n. 6, p. 362-368, 2019.

CUNHA-NETO, Adelino da *et al.* **Salmonella isolated from chicken carcasses from a slaughterhouse in the state of Mato Grosso, Brazil: antibiotic resistance profile, serotyping, and characterization by repetitive sequence-based PCR system.** Poultry science, v. 97, n. 4, p. 1373-1381, 2018.

D'AGOSTINO, M. *et al.* **A validated PCR-based method to detect Listeria monocytogenes using raw milk as a food model—towards an international standard.** Journal of food protection, v. 67, n. 8, p. 1646-1655, 2004.

DANTAS, Stéfani TA *et al.* **Environmental persistence and virulence of Salmonella spp. Isolated from a poultry slaughterhouse.** Food Research International, v. 129, p. 108835, 2020.

DAVIS, Margaret A. *et al.* **Genotypic-phenotypic discrepancies between antibiotic resistance characteristics of Escherichia coli isolates from calves in management settings with high and low antibiotic use.** Appl. Environ. Microbiol., v. 77, n. 10, p. 3293-3299, 2011.

DICE, Lee R. **Measures of the amount of ecologic association between species.** Ecology, v. 26, n. 3, p. 297-302, 1945.

DJORDJEVIC, D.; WIEDMANN, Martin; MCLANDBOROUGH, L. A. **Microtiter plate assay for assessment of Listeria monocytogenes biofilm formation.** Applied and environmental microbiology, v. 68, n. 6, p. 2950-2958, 2002.

DONLAN, R.M. **Biofilms: Microbial Life on Surfaces**. *Emerging Infectious Diseases*, v. 8, n. 9, p. 881-890, set. 2002.

DOUMITH, M.; MUCHRIESER, C.; GLASER, P.; JACQUET, C.; MARTIN, P. **Differentiation of the Major *Listeria monocytogenes* Serovars by Multiplex PCR**. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 8, p. 3819-3822, ago. 2004.

EFSA/ECDC. **The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2011**. *EFSA Journal*, v.11, n. 5, 2013.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **Evolução e Qualidade da Pecuária Brasileira. Nota técnica**. Campo Grande, 2017. Disponível em <https://www.embrapa.br/documents/10180/21470602/EvolucaoQualidadePecuaria.pdf/64e8985a-5c7c-b83e-ba2d-168ffaa762ad>. Acesso em 10 de maio de 2020.

ESCOLAR, Cristina *et al.* **Antimicrobial resistance profiles of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* isolated from ready-to-eat products of animal origin in Spain**. *Foodborne pathogens and disease*, v. 14, n. 6, p. 357-363, 2017.

EUCAST - **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**. Versão 9.0. 2019. Disponível em [https://eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_9.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](https://eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_9.0_Breakpoint_Tables.pdf). Acesso em 11 de maio de 2020.

FREITAS, C.G.; SANTANA, A.P.; SILVA, P.H.C.; GONÇALVES, V.S.P.; BARROS, M.A.F.; TORRES, F.A.G.; MURATA, L.S.; PERECMANIS, S. **PCR multiplex for detections of *Salmonella* Enteritidis, Typhi and Typhimurium and occurrence in poultry meat**. *International Journal of Food Microbiology*, v. 139, p. 15-22, 2010.

GAILLARD, JEAN-LOUIS *et al.* **In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2**. *Infection and immunity*, v. 55, n. 11, p. 2822-2829, 1987.

GITTER, M.; SOJKA, W. **Salmonella Ruiru Infection in Sheep: An Outbreak of Abortion in South East England**. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, v. 74, p. 322-330, 1964.

GÓMEZ, Diego *et al.* **Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment**. *Food microbiology*, v. 42, p. 61-65, 2014.

GOUVÊA, R. **Comparação entre isolamento bacteriológico convencional e PCR na detecção de *Salmonella* spp. em amostras de carne de frango artificialmente contaminadas e de campo**. Dissertação (Dissertação em Medicina Veterinária). Universidade Federal Fluminense, p. 54. 2009.

GUIBOURDENCHE, P.R.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P.I.; BOCKEMÜHL, J.; GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F. **Supplement 2003 - 2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme**. *Research in Microbiology*, v.161, p. 26-29, 2010.

GUZMÁN-MARTÍN, José Luis *et al.* **Nalidixic acid surrogate test for susceptibility to ciprofloxacin in *Salmonella*. Revisiting the question**. *Journal of medical microbiology*, v. 67, n. 7, p. 965-967, 2018.

- HAKANEN, Antti *et al.* **Detection of decreased fluoroquinolone susceptibility in salmonellas and validation of nalidixic acid screening test.** Journal of clinical microbiology, v. 37, n. 11, p. 3572-3577, 1999.
- HARVEY, J.; KEENAN, K. P.; GILMOUR, A. **Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains.** Food Microbiology, v. 24, n. 4, p. 380-392, 2007.
- HAUBERT, L. *et al.* ***Listeria monocytogenes* isolates from food and food environment harbouring tetM and ermB resistance genes.** Letters in applied microbiology, v. 62, n. 1, p. 23-29, 2015.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - ISO 6579. **Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.** 27 p. 2002.
- JACKSON, Kelly A. *et al.* **Listeriosis outbreaks associated with soft cheeses, United States, 1998–2014.** Emerging infectious diseases, v. 24, n. 6, p. 1116, 2018.
- JACOBY, George A. **AmpC  $\beta$ -lactamases.** Clinical microbiology reviews, v. 22, n. 1, p. 161-182, 2009.
- JACOBY, George A.; STRAHILEVITZ, Jacob; HOOPER, David C. **Plasmid-mediated quinolone resistance.** Plasmids: Biology and Impact in Biotechnology and Discovery, p. 475-503, 2015.
- JEON, Hye Young *et al.* **Characteristics of third-generation cephalosporin-resistant *Salmonella* from retail chicken meat produced by integrated broiler operations.** Poultry science, v. 98, n. 4, p. 1766-1774, 2019.
- JOSEPH, B.; OTTA, S.K.; KARUNASAGAR, I.; KARUNASAGAR, I. **Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers.** International Journal of Food Microbiolog, Amsterdã, v. 64, n. 3, p. 367-372, 2001.
- KADAM, Sachin R. *et al.* **Diversity assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation: impact of growth condition, serotype and strain origin.** International journal of food microbiology, v. 165, n. 3, p. 259-264, 2013.
- KASNOWSKI, M.C.; MANTILLA, S.P.S; OLIVEIRA, L.A.T.; FRANCO, R.M. **Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfície.** Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, ano 8, n.15, 2010. Disponível em: [http://faef.revista.inf.br/imagens\\_arquivos/arquivos\\_destaque/fxPTiYWerLkT9Si\\_2013-6-25-16-32-0.pdf](http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/fxPTiYWerLkT9Si_2013-6-25-16-32-0.pdf). Acesso em 20 de maio de 2018.
- KÉROUANTON, Annaëlle *et al.* **Evaluation of a multiplex PCR assay as an alternative method for *Listeria monocytogenes* serotyping.** Journal of Microbiological Methods, v. 80, n. 2, p. 134-137, 2010.
- LAPAGE, S. P.; TAYLOR, Joan. **The incidence and description of salmonella ruiu.** Journal of comparative pathology, v. 74, p. 320-321, 1964.
- LECLERCQ, A.; MOURA, A.; VALES, G., TESSAUD-RITA, N.; AGUILHON, C., LECUIT, M. ***Listeria thailandensis* sp. nov.** International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Microbiology Society, v. 69, n. 1, p.74-81, 2019.
- LECUIT, M. A. R. C. *et al.* **Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization.** Infection and immunity, v. 65, n. 12, p. 5309-5319, 1997.

LECUIT, Marc *et al.* **A transgenic model for listeriosis: role of internalin in crossing the intestinal barrier.** *Science*, v. 292, n. 5522, p. 1722-1725, 2001.

LEMOS, A.L.S.C. **Biofilmes.** CTC - TecnoCarnes. Boletim de Conexão Industrial do Centro de Tecnologia de Carnes do Itai., v. 12, n.1, 2002. Disponível em <http://www.ital.sp.gov.br/ctc/>. Acesso em 16 de julho de 2018.

LERICHE, V.; CARPENTIER, B. **Limitation of adhesion and growth of *Listeria monocytogenes* on stainless steel surfaces by *Staphylococcus sciuri* biofilms.** *Journal of Applied Microbiology*, v. 88, p. 595-605, 2000.

LOURA, Cláudia AC; ALMEIDA, Rogeria CC; ALMEIDA, Paulo F. **The incidence and level of *Listeria spp.* and *Listeria monocytogenes* contamination in processed poultry at a poultry processing plant.** *Journal of food safety*, v. 25, n. 1, p. 19-29, 2005.

LUNDÉN, Janne M. *et al.* **Persistent *Listeria monocytogenes* strains show enhanced adherence to food contact surface after short contact times.** *Journal of food protection*, v. 63, n. 9, p. 1204-1207, 2000.

LUNDRÉN, P.U.; SILVA, J.A.; MACIEL, J.F.; FERNANDES, T.M. 2009. **Perfil da qualidade higiênica sanitária comercializada em feiras livres e mercados públicos de João Pessoa/PB.** *Revista Alimentos e Nutrição, Araraquara*, v.20, n.1, p. 113-119, 2009.

LUQUE-SASTRE, L.; ARROYO, C.; FOX, E.M.; MCMAHON, B. J.; BAI, L.; LI, F.; FANNING, S. **Antimicrobial Resistance in *Listeria* Species.** *Microbiology Spectrum*, v.6, n.4, p. 01-23, 2018.

MA, Yeben *et al.* **High-levels of resistance to quinolone and cephalosporin antibiotics in MDR-ACSSuT *Salmonella enterica* serovar Enteritidis mainly isolated from patients and foods in Shanghai, China.** *International journal of food microbiology*, v. 286, p. 190-196, 2018.

MAGALHÃES, Vanda D. *et al.* **Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia: uma revisão técnica.** *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*, v. 64, n. 2, p. 155-161, 2005.

MAGALHÃES, Rui *et al.* **Biofilm formation by persistent and non-persistent *Listeria monocytogenes* strains on abiotic surfaces.** *Acta Alimentaria*, v. 46, n. 1, p. 43-50, 2017.

MANUEL, Clyde S. *et al.* **Prevalence and distribution of *Listeria monocytogenes* inIA alleles prone to phase variation and inIA alleles with premature stop codon mutations among human, food, animal, and environmental isolates.** *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 81, n. 24, p. 8339-8345, 2015.

MARTINS, M.F. **Avaliação da eficácia de desinfetantes e produtos de limpeza de superfícies usados em restaurantes em Portugal em biofilmes de *Salmonella enterica*.** 2013. 58 f. Dissertação (Mestrado em Segurança Alimentar ) - Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra.

MATSUBARA, E.N. **Condição higiênica – sanitária de meias carcaças de suínos após o abate e depois do resfriamento e análise de utilização de Lista de Verificação para avaliar boas práticas no abate de suínos.** 2005. 152 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Zootecnia, Universidade de São Paulo.

MATSUSHITA, S. *et al.* **Serovar-distribution and drug-resistance of *Salmonella* strains isolated from domestic and imported cases in 1990-1994 in Tokyo.** *The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases*, v.70, n.1, p. 42-50, 1995.



MAUNG, Aye Thida *et al.* **Antimicrobial resistance profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from chicken meat in Fukuoka, Japan.** International journal of food microbiology, v. 304, p. 49-57, 2019.

MAURY, Mylène M. *et al.* **Uncovering *Listeria monocytogenes* hypervirulence by harnessing its biodiversity.** Nature genetics, v. 48, n. 3, p. 308, 2016.

MCEWEN, Scott A.; COLLIGNON, Peter J. **Antimicrobial resistance: a One Health perspective.** Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals, p. 521-547, 2018.

MEDEIROS, Margareti. **Análise do gene da internalina A e capacidade de adesão e invasão celular de *Listeria monocytogenes* de indústrias e alimentos de origem animal.** 2019. 47 f., il. Tese (Doutorado em Saúde Animal)—Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

MELONI, Domenico *et al.* ***Listeria monocytogenes* in five Sardinian swine slaughterhouses: prevalence, serotype, and genotype characterization.** Journal of food protection, v. 76, n. 11, p. 1863-1867, 2013.

MENDONÇA, Karla Sequeira *et al.* **Genetic relatedness among *Listeria monocytogenes* isolated in foods and food production chain in southern Rio Grande do Sul, Brazil.** Food control, v. 28, n. 1, p. 171-177, 2012.

MENDONÇA, Eliane Pereira *et al.* **Spread of the serotypes and antimicrobial resistance in strains of *Salmonella* spp. isolated from broiler.** Brazilian Journal of Microbiology, v. 50, n. 2, p. 515-522, 2019.

MENGAUD, Jérôme *et al.* **E-cadherin is the receptor for internalin, a surface protein required for entry of *L. monocytogenes* into epithelial cells.** Cell, v. 84, n. 6, p. 923-932, 1996.

MIRANDA, J. M. *et al.* **Comparison of antimicrobial resistance in *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Listeria monocytogenes* strains isolated from organic and conventional poultry meat.** Journal of food protection, v. 71, n. 12, p. 2537-2542, 2008.

MONTE, Daniel F. *et al.* **Genomic Features of High-Priority *Salmonella enterica* Serovars Circulating in the Food Production Chain, Brazil, 2000–2016.** Scientific reports, v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.

MORAES, D. M. C. *et al.* **Sources of infection and antimicrobial susceptibility profile of *Salmonella* sp. isolated in broiler production flow.** Arquivos do Instituto Biológico (São Paulo), v. 81, n. 3, p. 195-201, 2014.

MOREIRA, Giselle do Nascimento *et al.* **Ocorrência de *Salmonella* sp. em carcaças de frangos abatidos e comercializados em municípios do estado de Goiás.** Rev. Inst. Adolfo Lutz, v. 67, n. 2, p. 126-130, 2008.

MØRETRØ, T.; LANGSRUD, S. ***Listeria monocytogenes*: biofilm formation and persistence in food-processing environments.** Biofilms, v. 1, n. 2, p. 107-121, 2004.

MORONI, Olivier *et al.* **Inactivation of adhesion and invasion of food-borne *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Bifidobacterium* strains of human origin.** Appl. Environ. Microbiol., v. 72, n. 11, p. 6894-6901, 2006.

MORVAN, A. *et al.* **Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from humans in France.** Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 54, n. 6, p. 2728-2731, 2010

NICOLAU, A.I.; BOLOCAN, A.S. Sampling the Processing Environment for *Listeria*. In: JORDAN, K.; FOX, E.M.; WAGNER, M. ***Listeria monocytogenes: Methods and Protocols***, Methods in Molecular Biology. New York: Humana Press, 2014, p. 3-14.

NIGHTINGALE, K. K. *et al.* **Select *Listeria monocytogenes* subtypes commonly found in foods carry distinct nonsense mutations in inIA, leading to expression of truncated and secreted internalin A, and are associated with a reduced invasion phenotype for human intestinal epithelial cells.** Appl. Environ. Microbiol., v. 71, n. 12, p. 8764-8772, 2005.

NIGHTINGALE, K. K. *et al.* **inIA premature stop codons are common among *Listeria monocytogenes* isolates from foods and yield virulence-attenuated strains that confer protection against fully virulent strains.** Appl. Environ. Microbiol., v. 74, n. 21, p. 6570-6583, 2008.

OLIER, Maiwenn *et al.* **Assessment of the pathogenic potential of two *Listeria monocytogenes* human faecal carriage isolates.** Microbiology, v. 148, n. 6, p. 1855-1862, 2002.

OLIER, Maiwenn *et al.* **Truncated internalin A and asymptomatic *Listeria monocytogenes* carriage: in vivo investigation by allelic exchange.** Infection and immunity, v. 73, n. 1, p. 644-648, 2005.

ORSI, R. H. *et al.* **Recombination and positive selection contribute to evolution of *Listeria monocytogenes* inIA.** Microbiology, v. 153, n. 8, p. 2666-2678, 2007.

ORSI, Renato H.; DEN BAKKER, Henk C.; WIEDMANN, Martin. ***Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics.** International Journal of Medical Microbiology, v. 301, n. 2, p. 79-96, 2011.

PAILLARD, D.; DUBOIS, V.; DURAN, R.; NATHIER, F.; GUITTET, C.; CAUMETTE, P.; QUENTIN, C. **Rapid identification of *Listeria* species by using restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 23S rRNA gene fragments.** Applied and environmental microbiology, v.69, p. 6386-6392, 2003.

PALMA, Joana M. *et al.* **Caracterização molecular de *Listeria monocytogenes* oriundas de cortes cárneos bovinos e de abatedouros frigoríficos de bovinos localizados no Distrito Federal, Brasil.** Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 36, n. 10, p. 957-964, 2016.

PAN, Y.; BREIDT JR, F.; KATHARIOU, S. **Resistance of *Listeria monocytogenes* Biofilms to Sanitizing Agents in a Simulated Food Processing Environment.** Applied and Environmental Microbiology, v. 72, n. 12, p. 7711-7717, dez. 2006.

PANZENHAGEN, Pedro Henrique Nunes *et al.* **Prevalence and fluoroquinolones resistance of *Campylobacter* and *Salmonella* isolates from poultry carcasses in Rio de Janeiro, Brazil.** Food Control, v. 61, p. 243-247, 2016.

PARANÁ (Estado). Secretaria de Estado da Saúde do Paraná (SESA). **Levantamento do Uso e Comercialização de Medicamentos Veterinários em Frango de Corte.** Paraná, 2005.

PERNI, Stefano *et al.* **The resistance to detachment of dairy strains of *Listeria monocytogenes* from stainless steel by shear stress is related to the fluid dynamic characteristics of the location of isolation.** International journal of food microbiology, v. 116, n. 3, p. 384-390, 2007.

PHELPS, Christopher C. *et al.* **Relative roles of Listeriolysin O, InIA, and InIB in Listeria monocytogenes uptake by host cells.** Infection and immunity, v. 86, n. 10, 2018.

PIFFARETTI, Jean-Claude *et al.* **Genetic characterization of clones of the bacterium Listeria monocytogenes causing epidemic disease.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 86, n. 10, p. 3818-3822, 1989.

POYART, Claire; TRIEU-CUOT, Patrick; BERCHE, Patrick. **The inIA gene required for cell invasion is conserved and specific to Listeria monocytogenes.** Microbiology, v. 142, n. 1, p. 173-180, 1996.

POYART-SALMERON, C. *et al.* **Genetic basis of tetracycline resistance in clinical isolates of Listeria monocytogenes.** Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 36, n. 2, p. 463-466, 1992.

QUEREDA, Juan J. *et al.* **Reassessing the role of Internalin B in Listeria monocytogenes virulence using the epidemic strain F2365.** Clinical Microbiology and Infection, v. 25, n. 2, p. 252. e1-252. e4, 2019.

REITER, M. G. R. *et al.* **Prevalence of Salmonella in a poultry slaughterhouse.** Journal of food protection, v. 70, n. 7, p. 1723-1725, 2007.

RIEU, Aurélie *et al.* **Listeria monocytogenes EGD-e biofilms: no mushrooms but a network of knitted chains.** Appl. Environ. Microbiol., v. 74, n. 14, p. 4491-4497, 2008.

RISTORI, Christiane Asturiano *et al.* **Prevalence and populations of Listeria monocytogenes in meat products retailed in Sao Paulo, Brazil.** Foodborne pathogens and disease, v. 11, n. 12, p. 969-973, 2014.

ROCHA, R.A.; SILVA, P.H.C.; SOUZA, N.R.; MURATA, L.M.; GONÇALVES, V.S.P.; SANTANA, A.P. **Ocorrência e diferenciação de espécies de Listeria spp. em salsichas tipo hot dog a granel e em amostras de carne moída bovina comercializadas no Distrito Federal.** Ciência Rural, Santa Maria, v.44, n.1, p.147-152, jan, 2014.

RODRIGUES, Laura Beatriz *et al.* **Quantification of biofilm production on polystyrene by Listeria, Escherichia coli and Staphylococcus aureus isolated from a poultry slaughterhouse.** Brazilian journal of microbiology, v. 41, n. 4, p. 1082-1085, 2010.

ROBICSEK, Ari; JACOBY, George A.; HOOPER, David C. **The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance.** The Lancet infectious diseases, v. 6, n. 10, p. 629-640, 2006.

ROSSI, Livia PR *et al.* **Occurrence of Listeria spp. in Brazilian fresh sausage and control of Listeria monocytogenes using bacteriophage P100.** Food Control, v. 22, n. 6, p. 954-958, 2011.

RYSER, E.T.; DONNELLY, C.W. **Listeria.** In: SALFINGER, Y.; TORTORELLO, M.L. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 5 ed. American Public Health Association, 2015.

SCALLAN, Elaine *et al.* **Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens.** Emerging infectious diseases, v. 17, n. 1, p. 7, 2011.

SCHÄFER, Daniela F. *et al.* **Monitoring of contamination sources of Listeria monocytogenes in a poultry slaughterhouse.** LWT, v. 86, p. 393-398, 2017.

SCHLECH, W.; LAVIGNE, P.; BORTOLUSSI, R.A.; ALLEN, A.C., HALDANE, E.V.; WORT, A. J., HIGHTOWER, M.S.; JOHNSON, S.E.; KING, S.H.; NICHOLLS, E.S.; BROOME, C.V. **Epidemic listeriosis – evidence for transmission by food**. The New England Journal of Medicine, v. 308, n. 4, p. 203- 206, 1983.

SCHWARTZ, Thomas *et al.* **Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms**. FEMS microbiology ecology, v. 43, n. 3, p. 325-335, 2003.

SERENO, Mallu Jagnow *et al.* **Distribution, adhesion, virulence and antibiotic resistance of persistent *Listeria monocytogenes* in a pig slaughterhouse in Brazil**. Food microbiology, v. 84, p. 103234, 2019.

DA SILVA, Margarida Ferreira *et al.* **Detection of premature stop codons leading to truncated internalin A among food and clinical strains of *Listeria monocytogenes***. Food microbiology, v. 63, p. 6-11, 2017.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C.; VIEIRA, M.J. **A review of current and emergent biofilm control strategies**. LWT - Food Science and Technology, v. 43, p. 573-583, 2010.

SIMON, Moyra C.; GRAY, David I.; COOK, Nigel. **DNA extraction and PCR methods for the detection of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon**. Appl. Environ. Microbiol., v. 62, n. 3, p. 822-824, 1996.

SINDE, E.; CARBALLO, J. **Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers**. Food Microbiology, v. 17, p. 439-447, 2000.

SINDICATO DAS INDÚSTRIAS AVÍCOLAS DO ESTADO DO PARANÁ - SINDIAVIPAR. **Dados estatísticos sobre a produção e exportação da carne de frango**. Disponível em: <https://www.sindiavipar.com.br/index.php?modulo=8&acao=frango>. Acesso em 9 de fevereiro de 2018.

SMITH, Alva *et al.* ***Listeria monocytogenes* isolates from ready to eat plant produce are diverse and have virulence potential**. International journal of food microbiology, v. 299, p. 23-32, 2019.

SRINIVASAN, V. *et al.* **Prevalence of antimicrobial resistance genes in *Listeria monocytogenes* isolated from dairy farms**. Foodborne Pathogens & Disease, v. 2, n. 3, p. 201-211, 2005.

STEPANOVIĆ, Srdjan *et al.* **A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation**. Journal of microbiological methods, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.

SUTCLIFFE, Joyce *et al.* **Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR**. Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 40, n. 11, p. 2562-2566, 1996.

SWAMINATHAN, Bala; GERNER-SMIDT, Peter. **The epidemiology of human listeriosis**. Microbes and infection, v. 9, n. 10, p. 1236-1243, 2007.

TEIXEIRA, Larrayane AC *et al.* ***Listeria monocytogenes* in Export-approved Beef from Mato Grosso, Brazil: Prevalence, Molecular Characterization and Resistance to Antibiotics and Disinfectants**. Microorganisms, v. 8, n. 1, p. 18, 2020.

VAN, Thi Thu Hao *et al.* **Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes.** International journal of food microbiology, v. 124, n. 3, p. 217-223, 2008.

VESTBY, L.K.; MØRETRØ, T.; LANGSRUD, S.; HEIR, E.; NESSE, L.L. **Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal and feed factories.** BMC veterinary Research, v. 5, n. 20, mai. 2009.

VILELA, Felipe Pinheiro *et al.* **Genotypic resistance to quinolone and tetracycline in *Salmonella* Dublin strains isolated from humans and animals in Brazil.** Microbial Drug Resistance, v. 25, n. 2, p. 143-151, 2019.

VINUEZA-BURGOS, Christian *et al.* **Occurrence, genotypes and antimicrobial susceptibility of *Salmonella* collected from the broiler production chain within an integrated poultry company.** International journal of food microbiology, v. 299, p. 1-7, 2019.

VITAS, ANA ISABEL *et al.* **Antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from food and clinical cases in Navarra, Spain.** Journal of food protection, v. 70, n. 10, p. 2402-2406, 2007.

VOSS-RECH, Daiane *et al.* **Antimicrobial resistance in nontyphoidal *Salmonella* isolated from human and poultry-related samples in Brazil: 20-year meta-analysis.** Foodborne pathogens and disease, v. 14, n. 2, p. 116-124, 2017.

WANG, Jingjin *et al.* **Persistent and transient *Listeria monocytogenes* strains from retail deli environments vary in their ability to adhere and form biofilms and rarely have inIA premature stop codons.** Foodborne pathogens and disease, v. 12, n. 2, p. 151-158, 2015.

WANG, Yage *et al.* **Comparative Genomic Analysis of a Multidrug-Resistant *Listeria monocytogenes* ST477 Isolate.** Foodborne pathogens and disease, v. 16, n. 9, p. 604-615, 2019.

WARD, Todd J. *et al.* **Multilocus genotyping assays for single nucleotide polymorphism-based subtyping of *Listeria monocytogenes* isolates.** Appl. Environ. Microbiol., v. 74, n. 24, p. 7629-7642, 2008.

WARD, Todd J. *et al.* **Molecular and phenotypic characterization of *Listeria monocytogenes* from US Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service surveillance of ready-to-eat foods and processing facilities.** Journal of food protection, v. 73, n. 5, p. 861-869, 2010.

WIEDMANN, Martin. **Molecular subtyping methods for *Listeria monocytogenes*.** Journal of AOAC International, v. 85, n. 2, p. 524-531, 2002.

WHO. **Global Action Plan for Antimicrobial Resistance.** 2015. Disponível em [https://www.amcra.be/swfiles/files/WHO%20actieplan\\_90.pdf](https://www.amcra.be/swfiles/files/WHO%20actieplan_90.pdf). Acesso em 11 de maio de 2020.

WHO. **Model List of Essential Medicines.** 21st list. 2019. Disponível em <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/325771/WHO-MVP-EMP-IAU-2019.06-eng.pdf?ua=1>. Acesso em 11 de maio de 2020.

WHO. **Global Antimicrobial resistance Surveillance System (GLASS) Report – early implementation 2017 - 2018.** 2018. Disponível em <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/279656/9789241515061-eng.pdf?ua=1>. Acesso em 11 de maio de 2020.

YAMATOGLI, Ricardo S. *et al.* **Clonal relatedness and resistance patterns of *Salmonella* *Corvallis* from poultry carcasses in a Brazilian slaughterhouse.** The Journal of Infection in Developing Countries, v. 9, n. 10, p. 1161-1165, 2015.

YIN, Binru *et al.* **The characterization of biofilm formation and detection of biofilm-related genes in *Salmonella* isolated from beef processing plants.** Foodborne Pathogens and Disease, v. 15, n. 10, p. 660-667, 2018.

ZANKARI, Ea *et al.* **Identification of acquired antimicrobial resistance genes.** Journal of antimicrobial chemotherapy, v. 67, n. 11, p. 2640-2644, 2012.

ZHANG, Yifan *et al.* **Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from retail foods.** International journal of food microbiology, v. 113, n. 1, p. 47-53, 2007.

ZHANG, Shaokang *et al.* **SeqSero2: Rapid and Improved *Salmonella* Serotype Determination Using Whole-Genome Sequencing Data.** Applied and environmental microbiology, v. 85, n. 23, 2019.

ZHU, Yuanting *et al.* **Antimicrobial resistance and resistance genes in *Salmonella* strains isolated from broiler chickens along the slaughtering process in China.** International journal of food microbiology, v. 259, p. 43-51, 2017.

ZILELIDOU, Evangelia A. *et al.* **Highly invasive *Listeria monocytogenes* strains have growth and invasion advantages in strain competition.** PLoS One, v. 10, n. 11, 2015.

## ANEXO A

Quadro de descrição das 08 coletas de *swabs* realizadas em abatedouros-frigoríficos de aves, separados entre as regiões do Distrito Federal (DF) e de Goiás (GO). Os estabelecimentos foram denominados de A, B e C e foi discriminado o número de isolados de *Listeria monocytogenes* identificados em cada ponto de coleta e número de *swabs* obtidos em cada coleta.

Identificação da coleta em ordem cronológica de realização das visitas	Região	Estabelecimento	Número de isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> identificados em cada tipo de Ponto de Coleta de <i>swabs</i>						Total de isolados de <i>Listeria monocytogenes</i> detectados na coleta	Total de <i>swabs</i> obtidos em cada coleta
			Pisos e paredes	Ralos	Mesas de evisceração	Esteiras	Tubulações de aço inox	Ganchos, maquinários		
1	DF	A	0	0	0	0	0	0	0	16
2	DF	A	0	0	0	0	0	0	0	16
3	DF	A	0	1	0	0	0	0	1	16
4	DF	A	0	0	0	0	0	0	0	15
5	DF	A	0	0	0	0	0	0	0	25
6	GO	C	0	0	0	3	2	0	5	25
7	GO	C	1	1	2	0	3	0	7	25
8	DF	B	0	1	0	0	0	0	1	31
<b>Total</b>			<b>1</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>0</b>	<b>14</b>	<b>169</b>

## ANEXO B

Alinhamento das sequências resultantes do sequenciamento dos fragmentos do gene *InlA* dos 14 isolados de *Listeria monocytogenes*. Pontos indicam homologia com a cepa de referência. Cepa de referência *Listeria monocytogenes* EGD-e número de acesso: CP023861, disponível em [blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).





210 220 230 240 250 260 270 280 290 300

Lm EGD-e GACCCGCTTAAAAATCTAACAAATTTAAATCGGCTAGAACTATCCAGTAACACGATTAGTGATATTAGTGCGCTTTTCAGGTTTAACTAGTCTACAGCAAT

42A-2 .....T.....

45A-2 .....T.....

52A-2 .....T.....

54A-2 .....T.....

59A-2 .....T.....

69A-2 .....T.....

72A-2 .....T.....

74A-2 .....T.....

76A-2 .....T.....

77A-2 .....T.....

78A-2 .....T.....

88A-2 .....T.....

63A-1 .....T.....A.....

117A-3 .....T.....

310 320 330 340 350 360 370 380 390 400

Lm EGD-e TATCTTTTGGTAATCAAGTGACAGATTTAAAACCATTAGCTAATTTAAACAACACTAGAACGACTAGATATTTCAAGTAATAAGGTGTCGGATATTAGTGT

42A-2 .....G.....

45A-2 .....G.....

52A-2 .....G.....

54A-2 .....G.....

59A-2 .....G.....

69A-2 .....G.....

72A-2 .....G.....

74A-2 .....G.....

76A-2 .....G.....

77A-2 .....G.....

78A-2 .....G.....

88A-2 .....G.....

63A-1 .....T.....A.....

117A-3 .....G.....

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500

Lm EGD-e TCTGGCTAAATTAACCAATTTAGAAAGTCTTATCGCTACTAACCAACCAATAAGTGATATAACTCCACTTGGGATTTTAAACAAATTTGGACGAATTTATCC

42A-2 .....

45A-2 .....

52A-2  
 54A-2  
 59A-2  
 69A-2  
 72A-2  
 74A-2  
 76A-2  
 77A-2  
 78A-2  
 88A-2  
 63A-1  
 117A-3

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600

Lm EGD-e T T A A A T G G T A A C C A G T T A A A A G A T A T A G G C A C A T T G G C G A G T T T A A C A A A C C T T A C A G A T T T A G A T T T A G C A A A T A A C C A A A T T A G T A A T C T A G C A C C A C

42A-2  
 45A-2  
 52A-2  
 54A-2  
 59A-2  
 69A-2  
 72A-2  
 74A-2  
 76A-2  
 77A-2  
 78A-2  
 88A-2  
 63A-1  
 117A-3

610 620 630 640 650 660 670 680 690 700

Lm EGD-e T G T C G G G T C T A A C A A A A C T A A C T G A G T T A A A A C T T G G A G C T A A C C A A A T A A G T A A C A T C A G T C C C C T A G C A G G T T T A A C C G C A C T C A C T A A C T T A G A G C T

42A-2  
 45A-2  
 52A-2  
 54A-2  
 59A-2  
 69A-2  
 72A-2  
 74A-2

76A-2  
 77A-2  
 78A-2  
 88A-2  
 63A-1  
 117A-3

710 720 730 740 750 760 770 780 790 800

Lm EGD-e TAAATGAAAATCAGCTGGAAGATATTAGCCCAATTTCTAACCTGAAAAATCTCACATATTTAACTTTGTACTTTAATAAATAAAGTGATATAAGCCCAGTT

42A-2  
 45A-2  
 52A-2  
 54A-2  
 59A-2  
 69A-2  
 72A-2  
 74A-2  
 76A-2  
 77A-2  
 78A-2  
 88A-2  
 63A-1  
 117A-3

G

810 820 830 840 850 860 870 880 890 900

Lm EGD-e TCTAGTTTAAACAAAGCTTCAAAGATTAATTTTTCTATAATAACAAGGTAAGTGACGTAAGCTCACTTGCGAACTTAACAAATAATTAATTGGCTTTTCAGCTG

42A-2  
 45A-2  
 52A-2  
 54A-2  
 59A-2  
 69A-2  
 72A-2  
 74A-2  
 76A-2  
 77A-2  
 78A-2  
 88A-2  
 63A-1  
 117A-3

C

G

```

          910      920      930      940      950      960      970      980      990      1000
          |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Lm EGD-e  GGCATAACCAAATTAGCGATCTTACACCATTGGCTAATTTAACCAAGAATCACCCAAC TAGGGTTGAATGATCAAGCATGGACAAATGCAACCAGCTAAGC
42A-2     .....
45A-2     .....
52A-2     .....
54A-2     .....
59A-2     .....
69A-2     .....
72A-2     .....
74A-2     .....
76A-2     .....
77A-2     .....
78A-2     .....
88A-2     .....
63A-1     .....
117A-3    .....

```

```

          1010     1020     1030     1040     1050     1060     1070     1080     1090     1100
          |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Lm EGD-e  CCGTAAAAGAAGGTCACACATTTGTTGGTTGGTTTGATGCCCAAAACAGGCGGAACTAAATGGAATTTTCAGTACGGATAAAATGCCGACAAATGACATCAA
42A-2     .....G.....C.....G.....
45A-2     .....G.....C.....G.....
52A-2     .....G.....C.....G.....
54A-2     .....G.....C.....G.....
59A-2     .....G.....C.....G.....
69A-2     .....G.....C.....G.....
72A-2     .....G.....C.....G.....
74A-2     .....G.....C.....G.....
76A-2     .....
77A-2     .....G.....C.....G.....
78A-2     .....G.....C.....G.....
88A-2     .....G.....C.....G.....
63A-1     .....
117A-3    .....G.....C.....G.....

```

```

          1110     1120     1130     1140     1150     1160     1170     1180     1190     1200
          |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Lm EGD-e  TTTATATGCACAATTTAGTATTAACAGCTACACAGCAACCTTTGATAATGACGGTGTAACAACATCTCAAAACAGTAGATTATCAAGGCTTGTTACAAGAA
42A-2     .....G.....G.....C.....
45A-2     .....G.....G.....C.....

```

52A-2 .....G.....G.....C.....  
 54A-2 .....G.....G.....C.....  
 59A-2 .....G.....G.....C.....  
 69A-2 .....G.....G.....C.....  
 72A-2 .....G.....G.....C.....  
 74A-2 .....G.....G.....C.....  
 76A-2 .....G.....G.....C.....  
 77A-2 .....G.....G.....C.....  
 78A-2 .....G.....G.....C.....  
 88A-2 .....G.....G.....C.....  
 63A-1 .....G.....G.....C.....  
 117A-3 .....G.....G.....C.....

1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300

Lm EGD-e CCTACGGCACCAACAAAAGAAGGTTATACTTTTAAAGGCTGGTATGACGCAAAAACTGGTGGTGACAAGTGGGATTTTCGCAACTAGCAAAATGCCTGCTA

42A-2 .....C.....  
 45A-2 .....C.....  
 52A-2 .....C.....  
 54A-2 .....C.....  
 59A-2 .....C.....  
 69A-2 .....C.....  
 72A-2 .....C.....  
 74A-2 .....C.....  
 76A-2 .....AC.....C.....  
 77A-2 .....C.....  
 78A-2 .....C.....  
 88A-2 .....C.....  
 63A-1 .....AC.....C.....C.....T.....T.....G.....  
 117A-3 .....C.....

1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400

Lm EGD-e AAAACATCACCTTATATGCCCAATATAGCGCCAATAGCTATACAGCAACGTTTGATGTTGATGGAAAAATCAACGACTCAAGCAGTAGACTATCAAGGACT

42A-2 .....A.....A.....A.....  
 45A-2 .....A.....A.....A.....  
 52A-2 .....A.....A.....A.....  
 54A-2 .....A.....A.....A.....  
 59A-2 .....A.....A.....A.....  
 69A-2 .....A.....A.....A.....  
 72A-2 .....A.....A.....A.....  
 74A-2 .....A.....A.....A.....

76A-2 .....  
 77A-2 ..... A ..... A ..... A .....  
 78A-2 ..... A ..... A ..... A .....  
 88A-2 ..... A ..... A ..... A .....  
 63A-1 ..... T ..... C ..... A .....  
 117A-3 ..... A ..... A ..... A .....

1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500

Lm EGD-e TCTAAAAGAACCAAAGGCACCAACGAAAAGCCGGATATACTTTCAAAGGCTGGTATGACGAAAAAACAGATGGG---AAAAAATGGGATTTTTCGACGGAT

42A-2 .....  
 45A-2 .....  
 52A-2 .....  
 54A-2 .....  
 59A-2 .....  
 69A-2 .....  
 72A-2 .....  
 74A-2 .....  
 76A-2 .....  
 77A-2 .....  
 78A-2 .....  
 88A-2 .....  
 63A-1 ..... AA.G ..... A ..... T ..... T ..... A .....  
 117A-3 ..... GAA .....

1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580

Lm EGD-e AAAATGCCAGCAAAATGACATTACGCTGTACGCTCAATTTACGAAAAATCCTGTGGCACCACCAACAACCTGGAGGGAAACAC

42A-2 .....  
 45A-2 .....  
 52A-2 .....  
 54A-2 .....  
 59A-2 .....  
 69A-2 .....  
 72A-2 .....  
 74A-2 .....  
 76A-2 .....  
 77A-2 .....  
 78A-2 .....  
 88A-2 .....  
 63A-1 ..... T ..... C .....  
 117A-3 ..... A .....