

# **ENSAIOS E METODOLOGIAS LABORATORIAIS DO PROJETO PILOTO DO PROGRAMA AMR**

**(Ciclo 2025-2026)**



Documento Técnico do Projeto Piloto do Programa Nacional de Monitoramento de Microrganismos Resistentes e Resíduos de Antimicrobianos em Alimentos: Programa AMR



# FICHA TÉCNICA

## **Diretor-Presidente**

Diretor: Leandro Pinheiro Safatle

Adjunto: Diogo Penha Soares

## **Segunda Diretoria**

Diretor: Daniel Meirelles Fernandes Pereira

Adjunto: Leandro Rodrigues Pereira

## **Terceira Diretoria**

Diretora: Daniela Marreco Cerqueira

Adjunta: Elkiane Macedo Rama

## **Quarta Diretoria**

Diretor: Rômison Rodrigues Mota

Adjunta: Suzana Yumi Fujimoto

## **Quinta Diretoria**

Diretor: Thiago Lopes Cardoso Campos

Adjunta: Roberta Meneses Marquez de Amorim

## **Gerência-Geral de Monitoramento de Produtos Sujeitos à Vigilância Sanitária - GGMON**

Gerente Geral: Simone de Oliveira Reis Roderio

## **Gerência de Hemo e Biovigilância e Vigilância Pós-Uso de Alimentos, Cosméticos e Produtos Saneantes - GHBIO**

Gerente: Leonardo Oliveira Leitão

## **Elaboração**

Ana Paula Coelho Penna Rossoni (GHBIO/GGMON)

Gracielle Rodrigues Pereira (Consultora- Cooperação Técnica OPAS/OMS)

# COLABORADORES

## **Anvisa**

Gerência de Laboratórios de Saúde Pública (Gelas)

Luciane Berno Reato ( Cooperação Técnica OPAS/OMS)

## **Laboratórios Centrais de Saúde Pública**

Instituto Adolf Lutz- São Paulo (IAL- SP)

Laboratório Central do Rio Grande do Sul (Lacen- RS)

Fundação Ezequiel Dias (FUNED-MG)

## **Fundação Oswaldo Cruz**

Departamento de Microbiologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS)

## **Ministério da Agricultura e Pecuária**

Laboratório de Resíduos e Contaminantes em Alimentos- Laboratório Federal de Defesa Agropecuária de Minas Gerais (RCA- LFDA/MG)

# APRESENTAÇÃO

O monitoramento de microrganismos resistentes e de resíduos de antimicrobianos em alimentos constitui estratégia crucial no enfrentamento da resistência aos antimicrobianos (AMR, do inglês *antimicrobial resistance*).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), por meio da Coordenação da Gerência de Hemo e Biovigilância e Vigilância Pós-Use de Alimentos, Cosméticos e Produtos Saneantes (GHBIO), a qual integra a Gerência Geral de Monitoramento de Produtos Sujeitos à Vigilância Sanitária (GGMON), implementou o Projeto Piloto do Programa Nacional de Monitoramento de Microrganismos Resistentes e Resíduos de Antimicrobianos em Alimentos (Programa AMR) em 1º de agosto de 2025.

O Programa AMR é parte dos Pronamas – Programas Nacionais de Monitoramento de Alimentos – e será executado bienalmente, com alternância entre as matrizes avaliadas.

A estratégia de Projeto Piloto foi adotada para o primeiro ciclo do Programa (2025–2026) com o objetivo de favorecer a implementação gradual das atividades planejadas.

Este documento fornece informações sobre os ensaios laboratoriais previstos no Projeto Piloto do Programa AMR, incluindo as metodologias adotadas em cada laboratório participante, fluxos de análise, critérios de qualidade e procedimentos para emissão dos resultados.

As análises serão desenvolvidas pelos Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACENs) de oito estados brasileiros, por Laboratórios do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS/Fiocruz) e pelo Laboratório de Enterobactérias do Instituto Oswaldo Cruz (LABENT/IOC/Fiocruz).

# SIGLAS E ABREVIATURAS

AMR- Resistência aos Antimicrobianos

Anvisa - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BrCAST- Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade

DTHA - Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar

Fiocruz - Fundação Oswaldo Cruz

IAL- Instituto Adolfo Lutz

IN- Instrução Normativa

INCQS- Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

IOC- Instituto Oswaldo Cruz

Lacen - Laboratório Central de Saúde Pública

LMR - Limite Máximo de Resíduos

OMS - Organização Mundial de Saúde

RDC - Resolução da Diretoria Colegiada

RNLVISA- Rede Nacional de Laboratórios de Vigilância Sanitária

VISA- Vigilância Sanitária

# SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	07
LABORATÓRIOS PARTICIPANTES.....	10
GARANTIA DA QUALIDADE DOS ENSAIOS.....	11
EMIÇÃO DOS RESULTADOS.....	13
VISUALIZAÇÃO GERAL DO FLUXO DE ANÁLISES DO PROGRAMA AMR.....	14
METODOLOGIAS.....	15
• Identificação e Isolamento de <i>E. coli</i> .....	16
• Identificação e Isolamento de <i>Salmonella</i> .....	19
• Suscetibilidade aos Antimicrobianos.....	22
• Sequenciamento Completo do Genoma.....	26
• Caracterização antigênica dos isolados (sorotipagem).....	28
• Identificação de <i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga (STEC).....	30
• Análise de Resíduos de Antimicrobianos.....	31
INFORMAÇÕES ADICIONAIS.....	34
REFERÊNCIAS.....	35
ANEXOS.....	41

# INTRODUÇÃO

## CONTEXTO E IMPORTÂNCIA

A terapia antimicrobiana revolucionou a medicina e representa um marco para a humanidade. Sua introdução promoveu avanços na qualidade e longevidade da vida humana e favoreceu o desenvolvimento agropecuário e a produção de alimentos em larga escala.

Devido ao papel crítico dos antimicrobianos, a evolução e disseminação da resistência a eles (AMR, do inglês *antimicrobial resistance*) constituem um dos maiores desafios globais em saúde pública. Os impactos da AMR alcançam:

- saúde humana;
- saúde animal;
- meio ambiente;
- economia.

Seu surgimento pode ser considerado um processo natural de adaptação e evolução dos microrganismos, contudo, ele é acelerado pelo uso intensivo e recorrente dos antimicrobianos. A AMR é conferida pelos chamados genes de resistência - ou determinantes de resistência. Estes genes normalmente conferem resistência a uma classe de antimicrobianos e sua ocorrência nos microrganismos é ainda de maior preocupação quando se encontram localizados em elementos genéticos móveis (MGE,

do inglês *mobile genetic elements*). Isto porque os MGE, a exemplo dos plasmídeos, têm grande importância como facilitadores da transferência de genes entre diferentes microrganismos (transferência horizontal).

Independentemente de sua localização - seja no genoma bacteriano ou em MGE - a identificação dos genes de resistência é uma estratégia importante para melhor compreensão e monitoramento da AMR. Técnicas de biologia molecular, como o sequenciamento completo do genoma, permitem esta identificação.

Quando os genes de resistência são expressos na célula bacteriana, o microrganismo apresentará o respectivo mecanismo de resistência ao antimicrobiano - ou classe de antimicrobianos - ao qual aquele determinante confere resistência. As análises de suscetibilidade aos antimicrobianos permitem identificar o perfil de resistência dos microrganismos, verificando se eles são sensíveis às substâncias avaliadas. Quando sensíveis, os microrganismos têm seu crescimento prejudicado pela presença do antimicrobiano, e, se apresentarem resistência, eles conseguem se desenvolver mesmo na presença desse medicamento.

A avaliação da suscetibilidade é fundamental no monitoramento da AMR, pois permite identificar padrões de resistência nos microrganismos em determinado contexto, bem como direcionar a identificação de fatores que estejam contribuindo para a promoção desses padrões.

### **AMR EM ALIMENTOS**

No âmbito dos alimentos, o uso de antimicrobianos nos animais de produção constitui um elemento importante para o surgimento da resistência, podendo promover AMR nos microrganismos comensais, presentes no intestino dos animais, ou mesmo nos microrganismos infecciosos.

A aplicação de medicamentos veterinários nos animais destinados à produção de alimentos pode resultar na presença de resíduos desses medicamentos – ou de seus metabólitos – nos produtos destinados ao consumo, alguns deles com potencial toxicidade e risco para a promoção da AMR na microbiota humana.

Por estes motivos, existem limites máximos regulamentados (LMR) para esses resíduos em alimentos de origem animal.

**LMR: concentração máxima do resíduo de um medicamento legalmente permitida em determinado alimento.**

O estabelecimento desses limites visa a oferta de alimentos seguros para os consumidores, em que os níveis de resíduos presentes não causarão efeitos adversos à saúde.

Desta forma, o monitoramento da resistência em microrganismos indicadores ou causadores de doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA) em alimentos, bem como da presença de resíduos de antimicrobianos, são atividades importantes no combate à AMR. Essas ações permitem avaliar riscos, padrões e tendências da AMR em alimentos, direcionando políticas de prevenção e controle desta ameaça à saúde pública.

### **SOBRE ESTE DOCUMENTO**

Este documento apresenta os ensaios laboratoriais previstos no Projeto Piloto do Programa Nacional de Monitoramento de Microrganismos Resistentes e Resíduos de Antimicrobianos em Alimentos (Programa AMR), implementado pela Anvisa, em colaboração com as VISAs estaduais e locais, LACENs e Fiocruz em 1º de agosto de 2025.

Considerando-se que diferentes métodos podem ter fundamentos distintos ou, mesmo com o mesmo princípio analítico, empregar tecnologias ou procedimentos diferentes, a escolha do laboratório por determinada metodolo-



gia depende de fatores como custo de materiais, reagentes e pessoal para sua operação, tempo de análise, robustez do método, entre outros.

Uma vez que diferentes laboratórios realizarão as análises do Programa AMR, diferentes metodologias poderão ser adotadas para um mesmo ensaio, de

acordo com o método implementado em cada laboratório.

Contudo, os resultados serão comparáveis dentro dos objetivos do Programa. Os relatórios das análises serão emitidos individualmente pelos laboratórios e analisados pela Coordenação do Programa AMR.

# LABORATÓRIOS PARTICIPANTES

Os laboratórios e respectivos ensaios por eles realizados no Projeto Piloto

do Programa AMR são mostrados no **Quadro 01.**

**Quadro 01: Laboratórios participantes e respectivos ensaios a serem realizados no Projeto Piloto do Programa AMR**

Laboratório	Ensaio
IAL- SP	Identificação e isolamento de microrganismos, suscetibilidade aos antimicrobianos, sorotipagem, sequenciamento completo do genoma, análise de resíduos de antimicrobianos.
Funed-MG	Análise de resíduos de antimicrobianos
Lacen- AL	Identificação e isolamento de microrganismos
Lacen- PE	Identificação e isolamento de microrganismos
Lacen- SC	Identificação e isolamento de microrganismos
Lacen-PR	Identificação e isolamento de microrganismos, suscetibilidade aos antimicrobianos, sequenciamento completo do genoma
Lacen- RS	Identificação e isolamento de microrganismos, suscetibilidade aos antimicrobianos.
Lacen- GO	Identificação e isolamento de microrganismos, suscetibilidade aos antimicrobianos.
IOC- Fiocruz	Identificação e isolamento de microrganismos, suscetibilidade aos antimicrobianos, sorotipagem, sequenciamento completo do genoma, identificação de produtora <i>E. coli</i> produtora de toxina Shiga (STEC).
INCQS-Fiocruz	Suscetibilidade aos antimicrobianos, sequenciamento completo do genoma.

SP: São Paulo; MG: Minas Gerais; AL: Alagoas; PE: Pernambuco; SC: Santa Catarina; PR: Paraná; RS: Rio Grande do Sul; GO: Goiás.

# GARANTIA DA QUALIDADE DOS ENSAIOS

## CONTEXTUALIZAÇÃO

Existem diferentes métodos laboratoriais para uma mesma finalidade de análise de alimentos. Alguns desses métodos são internacionalmente reconhecidos e normalizados por organismos competentes na área, como a ISO (*International Organization for Standardization*), AOAC INTERNACIONAL (*Association of Official Analytical Chemists*) e APHA (*American Public Health Association*). Nestes casos, os métodos são validados e oficialmente publicados pelas respectivas organizações.

Os laboratórios que desejam implementar métodos normalizados em seu escopo devem realizar a verificação desses métodos. O processo de verificação tem por objetivo demonstrar que o laboratório possui condições de executar aquele método conforme o estudo de validação oficial, fornecendo resultados confiáveis e consistentes. Métodos alternativos (não normalizados) também podem estar disponíveis, sendo resultado dos avanços de pesquisa e desenvolvimento em seu respectivo campo. Recomenda-se que os laboratórios validem métodos alternativos antes de incluí-los na rotina. A validação demonstra que o método cumpre seu objetivo e produz resultados confiáveis e reprodutíveis.

## GESTÃO DA QUALIDADE NOS LABORATÓRIOS PARTICIPANTES

Os Lacens e o INCQS integram a Rede Nacional de Laboratórios de Vigilância Sanitária (RNLVISA) e seguem as diretrizes da Resolução RDC Anvisa N° 512, de 27 de maio de 2021, que dispõe sobre as Boas Práticas para Laboratórios de Controle de Qualidade. A política interna de qualidade do IOC segue as normas ABNT NBR ISO 9001, 17025 e 15189.

Dessa forma, todos os métodos adotados por esses laboratórios utilizam procedimentos apropriados para análise, tratamento dos dados e emissão de resultados.

Seus métodos analíticos devem atender, no mínimo, a um dos seguintes critérios:

- métodos prescritos ou validados conforme regulamento técnico oficial;
- métodos descritos em compêndios oficiais;
- métodos descritos em compêndios de aceitação nacional ou internacional;
- métodos validados por estudos colaborativos; ou
- métodos desenvolvidos ou modificados pelo próprio laboratório.

Métodos oficiais ou validados por estudos colaborativos devem ser verificados nas condições do laboratório;

métodos desenvolvidos ou modificados devem ser validados para demonstrar adequação ao seu propósito.

As normas supramencionadas exigem também critérios de rastreabilidade e outros procedimentos para garantir a qualidade dos resultados das análises.

Os métodos microbiológicos de isolamento de microrganismos previstos no Programa AMR devem atender também aos requisitos da RDC nº 724, de 1º de julho de 2022 da Anvisa, que estabelece os critérios de segurança microbiológica para alimentos comercializados no Brasil.

### **Critérios para escolha dos métodos de análise**

Visando-se a garantia da qualidade dos resultados, os métodos analíticos adotados pelos laboratórios devem atender pelo menos a um dos critérios ao lado:



Métodos prescritos ou validados por regulamento técnico oficial

Métodos descritos em compêndios oficiais

Métodos descritos em compêndios de aceitação nacional ou internacional

Métodos validados por estudos colaborativos

Métodos desenvolvidos ou modificados pelo próprio laboratório, devidamente validados

# EMIÇÃO DOS RESULTADOS

O sistema de gerenciamento de amostras laboratoriais HARPYA é utilizado para emissão de resultados no Projeto Piloto do Programa AMR. Esta ferramenta é utilizada pela Rede Nacional de Laboratórios de Vigilância Sanitária (RNLVISA) com o objetivo de garantir a rastreabilidade das amostras e análises laboratoriais.

As instruções para o cadastro de amostras e emissão de resultados no âmbito do Programa AMR estão publicadas em documento específico no site do Programa (ver item “Informações Adicionais” na página 33 deste documento).

Os resultados individuais das análises (resultado por amostra) serão inseridos no sistema pelo laboratório responsável pela respectiva análise. A Coordenação do Programa fará a análise final dos resultados, compilando os dados de todas as amostras analisadas no Projeto Piloto.

Considerando as especificidades metodológicas e logísticas do Programa AMR, que envolve o envio de amostras e isolados entre laboratórios da RNLVISA e Fiocruz, estuda-se a adoção de planilhas padronizadas para emissão dos resulta-

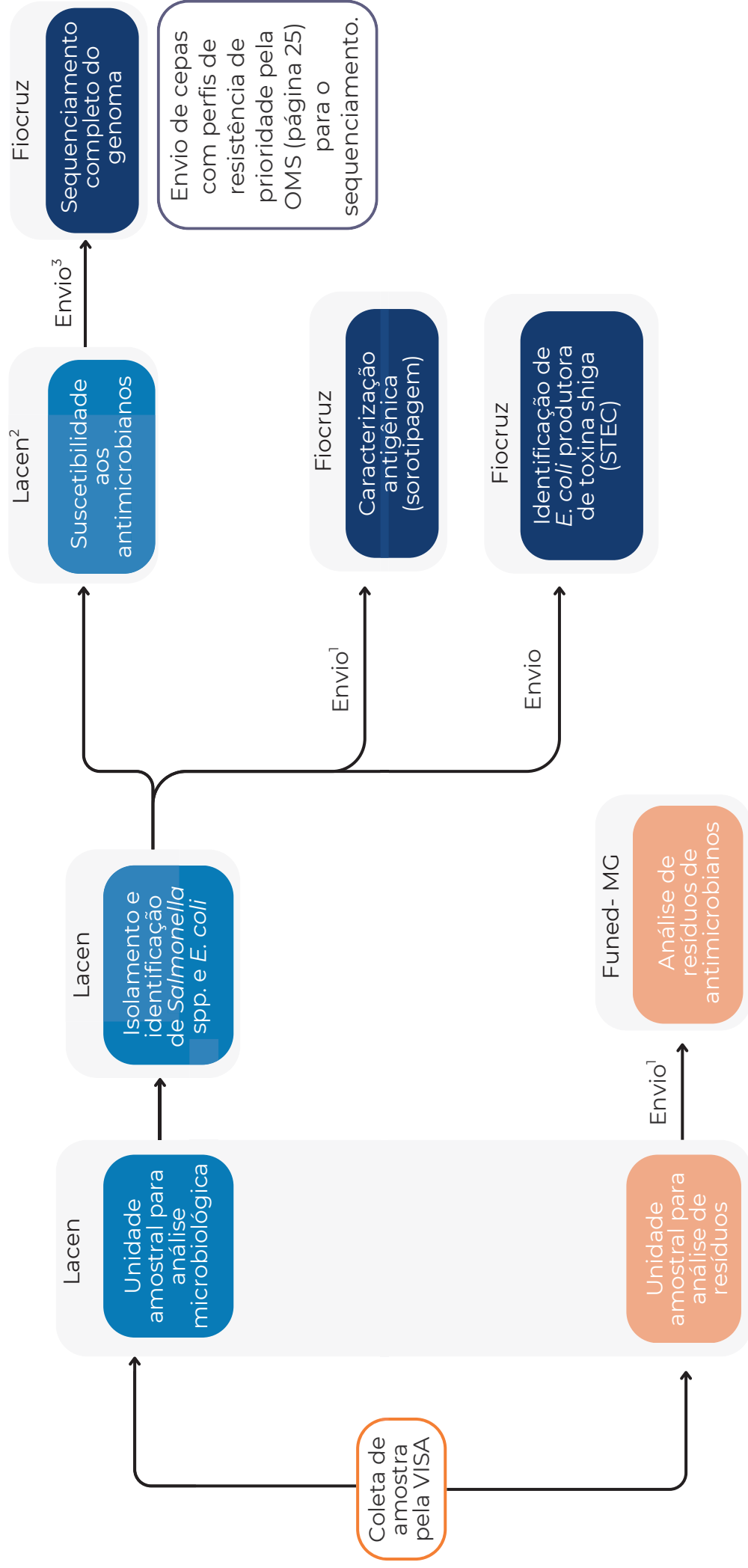
dos no âmbito do Programa. Desta forma, solicita-se que, os laboratórios que tiverem esta disponibilidade, preencham a (s) planilha (s) de resultado (Anexos I e II deste documento) e enviem à Coordenação do Programa AMR periodicamente, com os resultados das análises.

Este preenchimento é voluntário e tem por objetivo avaliar a viabilidade e adequabilidade do uso de planilhas para emissão dos resultados no Programa AMR. A experiência dos laboratórios e da Coordenação com estas planilhas subsidiará a decisão para uma possível adoção deste recurso nas próximas fases do Programa.

## Fluxo de recebimento de amostras e emissão dos resultados



# VISUALIZAÇÃO GERAL DO FLUXO DE ANÁLISE DO PROGRAMA AMR



<sup>1</sup>Exceto para o estado de São Paulo, situação na qual as análises serão feitas pelo Lacen do próprio estado (IAL-SP). <sup>2</sup>Exceto para os estados de AL, PE e SC, que enviarão os isolados para a Fiocruz para os ensaios de suscetibilidade. <sup>3</sup>Exceto para os estados de SP e PR, em que as análises serão realizadas pelo próprio Lacen do estado de coleta.

# METODOLOGIAS

# IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE *E. COLI*

A *Escherichia coli* é um microrganismo de grande importância no âmbito da segurança dos alimentos, sendo o agente etiológico identificado com maior frequência nos casos de doenças de transmissão hídrica e alimentar (DTHA) no Brasil. Trata-se de um bacilo Gram-negativo; a maioria das cepas é comensal e habita o intestino humano e de animais de sangue quente. Por este motivo, constituem bons indicadores das práticas higiênico-sanitárias na produção de alimentos, e é objeto de legislações para padrões microbiológicos de alimentos (RDC Anvisa nº 724, de 1º de julho de 2022 e sua respectiva IN nº 303 de 4 de setembro de 2024).

As cepas comensais também são indicadoras da presença de resistência aos antimicrobianos. Por habitar o intestino de animais saudáveis, o perfil de resistência em *E. coli* comensal oferece uma visão representativa da pressão seletiva exercida pelos antimicrobianos utilizados naquele ambiente. Esse microrganismo pode atuar ainda como reservatório de genes de resistência, que podem ser disseminados para outros microrganismos, incluindo pató-

genos de alta relevância na saúde humana e animal. A *E. coli* pertence à ordem *Enterobacterales*, a qual faz parte da lista de patógenos bacterianos prioritários da Organização Mundial da Saúde (OMS). Esta lista identificou patógenos considerados prioritários para o desenvolvimento de estratégias de controle, e cujos impactos são significativos e graves à saúde pública. O objetivo do documento é orientar a alocação de recursos, guiar e promover a pesquisa e desenvolvimento de novos agentes antibacterianos, além de apoiar o desenvolvimento de estratégias para o gerenciamento de infecções causadas pelos patógenos prioritários, incluindo sua prevenção.

Todos os microrganismos pertencentes à ordem *Enterobacterales* foram classificados como de máxima prioridade (grupo crítico da referida lista) quando apresentarem resistência às cefalosporinas de terceira geração ou carbapenêmicos, o que destaca ainda mais a importância de se conhecer e monitorar AMR em *E. coli*.



Existem diferentes métodos normalizados para o isolamento e identificação de *E. coli* em alimentos, geralmente com etapas comuns como enriquecimento da amostra, incubação em meio de cultura e testes adicionais de identificação baseados em características metabólicas. Na maioria das vezes, essas etapas incluem o enriquecimento da amostra, incubação em meio de cultura e testes adicionais de identificação do microrganismo, fundamentados em especificidades de seu metabolismo. O método petrifilm, em particular, envolve apenas o cultivo nas placas de petrifilm e leitura dos resultados.

As metodologias podem ser classificadas em dois grupos principais:

- aquelas que fornecem resultados expressos em unidades de Número Mais Provável (NMP) e,
- aquelas que geram resultados em Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

Os métodos baseados em NMP envolvem a realização de diluições seriadas da amostra em meios de cultura líquidos, seguidas da incubação e aplicação de testes bioquímicos para identificação de *E. coli*. Os resultados são interpretados com auxílio de tabelas estatísticas padronizadas, que permitem estimar o número mais pro-

vável de células viáveis presentes por grama (g) ou mililitro (mL) de amostra, a depender da natureza da amostra em análise. Exemplos desses métodos incluem o método dos tubos múltiplos e sistemas automatizados que seguem o mesmo princípio estatístico, como o método AOAC 2005.03.

Diferentemente dessas opções, alguns métodos permitem a contagem direta de colônias características de *E. coli* em meio de cultura sólido. O resultado é expresso em UFC por grama ou mililitro e, assim como nos métodos anteriores, o cultivo dos microrganismos é acompanhado de testes bioquímicos para confirmação de sua identidade.

### TESTES BIOQUÍMICOS DE CONFIRMAÇÃO

Dentre os testes bioquímicos utilizados para a identificação de *E. coli*, pode-se destacar:

- Teste de produção de indol: avalia a capacidade da bactéria de degradar o aminoácido triptofano, resultando na formação de indol, cuja presença é detectada pela adição do reagente de Kovacs, gerando coloração vermelha em caso positivo;
- Teste de atividade da enzima  $\beta$ -glucuronidase: verifica a atividade dessa enzima específica, cuja presença é indicativa de *E. coli*;
- Teste de fermentação de lactose: o teste de fermentação de lactose

com produção de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) é amplamente utilizado em metodologias como o dos tubos múltiplos. Ele consiste na detecção do gás gerado pela fermentação da lactose, evidenciado pela formação de bolhas em tubos de Durham inseridos nos tubos de ensaio contendo meios de cultura.

Esses testes são fundamentais para confirmar a presença de *E. coli* em alimentos. Cada metodologia adota reagentes e protocolos específicos, permitindo o isolamento do microrganismo, quando presente.

As metodologias adotadas pelos laboratórios para identificação e isolamento de *E. coli* na primeira fase do Projeto Piloto do Programa AMR constam no **Quadro 02**.

Os resultados poderão ser expressos em Unidades Formadoras de Colônia por grama de amostra (UFC/ g); Número Mais Provável (NMP/ g); ou limites microbiológicos mínimo (m) e máximo (M) conforme estabelecido pela IN Anvisa nº 161/ 2022.

**Quadro 02: Laboratórios, metodologias e unidades para emissão dos resultados dos ensaios de isolamento de *E. coli***

Método	Laboratórios	Resultado (unidade)
ISO 16649-2	IAL- SP; Lacen- RS	UFC/g
APHA- Petrifilm	Lacen- AL; Lacen- GO	UFC/ g
APHA- NMP	Lacen- PE; Lacen- PR	NMP/ g
AOAC 2005.03	Lacen- RS	NMP/ g
AOAC 998.08	Lacen- SC	UFC/ g
Ewing 1986	IOC	UFC/g

AOAC 2005.03: Detection and confirmed quantitation of coliforms and *E.coli* in foods.. SimPlate® Total Coliform and *E. coli* Color Indicator. AOAC 998.08: Confirmed Escherichia coli Counts in Poultry, Meats, and Seafood. Dry Rehydratable Film Method Petrifilm™ *E. coli* Coliform Count Plate. Ewing 1986: EDWARDS, Philip R.; EWING, William H. Identification of Enterobacteriaceae. 4. ed. New York: Elsevier, 1986.

# IDENTIFICAÇÃO E ISOLAMENTO DE *SALMONELLA*

*Salmonella* é um gênero de bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos e de importância zoonótica. Das duas espécies conhecidas, *Salmonella enterica* é a mais relevante no contexto das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar (DTHA). Esta espécie pode ser encontrada no trato intestinal de animais de produção, como frangos, bovinos e suínos, sendo dividida em 6 subespécies e mais de 2000 sorovares (sorotipos). Mais de 90% dos casos de infecção em animais e humanos são causados por diferentes sorotipos de *S. enterica* subespécie *enterica*. O principal modo de contaminação humana é pela ingestão de alimentos contaminados, sobretudo de origem animal. *Salmonella* spp. é um microrganismo que possui certa persistência em diferentes ambientes de produção de alimentos, o que faz o seu controle ser desafiador e de extrema relevância para esta indústria.

## DOENÇAS CAUSADAS POR *SALMONELLA*

As doenças causadas por *Salmonella* em humanos podem ser classificadas em dois tipos principais:

- Salmonelose não tifóide: causada por sorotipos não relacionados à febre tifóide e, à exceção daquelas causadas por algumas linhagens que causam infecção invasiva (maior prevalência na África Subsaariana), a salmonelose não-tifóide se caracteriza por gastroenterite aguda com diarreia inflamatória.

- Febre tifóide: é causada por *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorotipo Typhi (*Salmonella* Typhi) e apresenta sintomas mais graves, podendo causar infecção sistêmica. A doença apresenta sintomas iniciais similares à gastroenterite e sua progressão pode ocasionar hepatoesplenomegalia (aumento do fígado e baço), manifestações neuropsiquiátricas, hemorragia intestinal e perfuração intestinal, além de inflamações do pericárdio e miocárdio. Este sorotipo coloniza exclusivamente humanos, portanto a contaminação via fecal-oral tem particular importância nestes casos.

Além de pertencer à ordem *Enterobacterales*, *Salmonella* foi elencada como de prioridade alta (grupo intermediário) pela OMS quando apresentar resistência às fluoroquinolonas.

## METODOLOGIA DE ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO

Assim como para *E. coli*, há diferentes metodologias para o isolamento de *Salmonella* em alimentos.

Os métodos clássicos de isolamento envolvem quatro etapas:

1- Pré-enriquecimento da amostra em caldo não seletivo, como água peptonada ou caldo lactosado. Esta etapa objetiva recuperar células danificadas pelo processamento/armazenamento da amostra, recuperando os danos estruturais e restabelecendo o metabolismo do microrganismo.

2- Cultivo em meio(s) líquido(s) de enriquecimento seletivo, por exemplo, Rappaport-Vassiliadis e Caldo Tetrationato de Kauffmann.

3- Semeadura em meio seletivo-indicador, como ágar xilose lisina desoxicolato ou ágar verde brilhante para seleção de colônias com morfologia típica de *Salmonella*.

4- Provas bioquímicas presuntivas das colônias selecionadas. Diversos testes bioquímicos estão disponíveis, podendo-se destacar três principais:



**Teste da urease:** detecta a capacidade de hidrolisar ureia em amônia e CO<sub>2</sub>, alcalinizando o meio. (A maioria das cepas de *Salmonella* é urease negativa; não deve haver alteração da cor do meio.)



**Tríplice Açúcar e Ferro (TSI):** avalia fermentação de glicose, não fermentação de lactose/sacarose, produção de gás e de H<sub>2</sub>S. (Produção de H<sub>2</sub>S resulta em escurecimento característico no fundo do tubo.)



**Descarboxilação de aminoácidos:** verifica a capacidade de remover CO<sub>2</sub> (descarboxilar) aminoácidos, como a lisina (meio de cultura LIA- lisina descarboxilase), gerando alcalinização e mudança de cor do meio. (A maioria das cepas de *Salmonella* é positiva para lisina.)

O método automatizado “VIDAS” (AOAC 2011.03), em particular, fundamenta-se em imunoabsorção enzimática (ELISA) e as amostras com resultado positivo devem ser submetidas à confirmação por meio do cultivo microbiológico.

As metodologias adotadas no âmbito do Programa AMR são mostradas no **Quadro 03**. Os resultados serão reportados como presença ou ausência do microrganismo em 25g de amostra.

**Quadro 03: Laboratórios e metodologias adotadas nos ensaios de isolamento de *Salmonella***

Método	Laboratórios
ISO 6579-1	IAL- SP; Lacen- PR; Lacen- RS
APHA 2015	Lacen- GO, Lacen- PE
BAM	Lacen- AL
AOAC 2011.03 (Triagem)	Lacen- RS; Lacen- SC
Manual Técnico Ministério da Saúde	IOC

BAM: Bacteriological Analytical Manual (Food and Drug Administration). APHA 2015: American Public Health Association. Compendium of Microbiological Examination of Foods, Chapter 36.13. General Description for the Identification of *Salmonella*. 5th Ed. 2015.

# SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

## METODOLOGIAS RECOMENDADAS

O teste de suscetibilidade (ou sensibilidade) aos antimicrobianos pode ser realizado por diferentes metodologias, sendo a microdiluição em caldo considerada o padrão ouro que permite determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM ou MIC, do inglês *minimum inhibitory concentration*). De acordo com a Portaria nº 64, de 11 de dezembro de 2018 do Ministério da Saúde, os laboratórios no Brasil devem adotar as normas da versão brasileira do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST / versão BrCAST) para interpretação dos resultados destes ensaios.

## ESPECIFICAÇÕES METODOLÓGICAS DO BRCAST

As orientações do BrCAST incluem especificações metodológicas, como meio de cultura e inóculo (concentração do microrganismo) que devem ser utilizados. As metodologias recomendadas, para as quais os pontos de corte foram estabelecidos são: i) o teste de disco-difusão, baseado na medição do halo de inibição em ágar padronizado; ii). microdiluição em caldo.

O **BrCAST** é o Comitê Nacional do EUCAST no Brasil e trabalha junto com o Ministério da Saúde e Anvisa na padronização e melhoria da qualidade dos testes de sensibilidade em todo país e no combate à resistência aos antimicrobianos.

Equipamentos automatizados (como Vitek® e Phoenix®) são também adotados nas rotinas laboratoriais, sendo altamente recomendável a validação de seus desempenhos por meio da comparação com o método de referência, microdiluição em caldo (critérios e orientações: ISO 20776-2).

Para a colistina, o BrCAST recomenda especificamente a microdiluição em caldo, não sendo adequado usar disco-difusão ou sistemas automatizados.

## Interpretação dos resultados:

Os pontos de corte fornecidos pelo BrCAST categorizam os resultados em três categorias de sensibilidade:

S - Sensível, dose padrão: Um microrganismo é categorizado como

Sensível, dose padrão quando há uma alta probabilidade de sucesso terapêutico utilizando o regime de dose padrão do agente.

I - Sensível, aumentando exposição: Um microrganismo é categorizado como Sensível, aumentando exposição quando há uma alta probabilidade de sucesso terapêutico devido ao aumento da exposição ajustando-se o regime de dosagem ou sua concentração no local de infecção.

R - Resistente: um microrganismo é categorizado como Resistente quando há alta probabilidade de falha terapêutica mesmo quando há aumento da exposição.

Todos os métodos devem ser realizados com cepas de referência para controle de qualidade. Para microrganismos da ordem Enterobacterales, recomenda-se

a cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 como controle para os testes.

#### METODOLOGIAS NO ÂMBITO DO PROGRAMA AMR

As metodologias adotadas no Programa AMR constam no **Quadro 04** e os antimicrobianos analisados, no **Quadro 05**.

Os resultados serão reportados como S, I ou R, recomendando-se que os laboratórios informem os valores de CIM quando disponíveis.

Após a emissão do laudo, o laboratório poderá, de forma voluntária, preencher a “Planilha Resultados Ensaio Microbiológicos\_Programa AMR” (Anexo 01) e enviar à Coordenação, colaborando para avaliar a viabilidade de uso desse recurso e para simplificar e padronizar os fluxos do Programa.

**Quadro 04: Laboratórios e técnicas adotadas nos ensaios de suscetibilidade aos antimicrobianos**

Método	Laboratórios
Disco-difusão	IAL- SP; IOC; Lacen- PR; Lacen- RS
Microdiluição em caldo	IOC; Lacen- PR; Lacen- RS
Microdiluição automatizado (VITEK®)	Lacen- GO; INCQS

## Quadro 05: Painei antimicrobianos- ensaios de suscetibilidade

Classe de antimicrobiano	Antimicrobiano	Métodos Manuais	Método Automatizado VITEK
Aminoglicosídeos	Amicacina	Não	Sim
	Gentamicina	Sim	Sim
Beta-lactâmicos (penicilinas)	Amoxicilina + Clavulanato	Sim	Não
	Ampicilina	Sim	Não
	Piperacilina + Tazobactam	Não	Sim
Beta-lactâmicos (monobactâmico)	Aztreonam	Não	Sim
Beta-lactâmicos (cefalosporinas de 2ª geração)	Cefoxitin	Sim	Não
	Cefuroxima	Não	Sim
Beta-lactâmicos (cefalosporinas de 3ª geração)	Ceftazidima	Sim	Sim, em associação à avibactam
	Ceftriaxona	Não	Sim
Beta-lactâmicos (cefalosporinas de 4ª geração)	Cefepima	Sim	Sim
Beta-lactâmicos (cefalosporinas de 5ª geração)	Ceftolozano	Não	Sim, em associação à tazobactam
Quinolonas (fluoroquinolonas)	Ciprofloxacina	Sim	Sim
	Norfloxacina	Não	Sim
Anfenicóis	Cloranfenicol	Sim	Não
Polimixinas	Colistina	Sim	Não
Beta-lactâmicos (carbapenêmicos)	Ertapenem	Não	Sim
	Meropenen	Sim	Sim
Nitrofuranos	Nitrofurantoína	Sim	Sim
Sulfonamidas	Sulfametoxazol + Trimetoprima	Sim	Sim
Glicilciclinas	Tigeciclina	Não	Sim

As diferenças em alguns dos antibióticos testados se deve às especificidades de cada método. O equipamento automatizado VITEK utiliza kits disponibilizados pelo fabricante (cartões) que contêm os antimicrobianos a serem avaliados, não sendo possível fazer alterações.

®





As cepas com perfis de resistência correspondente àqueles listados como prioridade pela OMS deverão ser encaminhadas para o sequenciamento completo do genoma. Desta forma, caso um isolado apresente **pelo menos um** dos perfis de resistência do **Quadro 06**, o mesmo deverá ser encaminhado para o ensaio de sequenciamento.

**Quadro 06: Critérios para envio de cepas (isolados) para o sequenciamento completo do genoma**

Microrganismo	Perfil de resistência
<i>Salmonella</i> spp.	Cefalosporinas de terceira geração
	Carbapenêmicos
	Fluoroquinolonas
<i>E. coli</i>	Cefalosporinas de terceira geração
	Carbapenêmicos

Os isolados que apresentarem resistência a pelo menos um antimicrobiano das classes constantes no **Quadro 06** deverão ser encaminhados para o sequenciamento completo do genoma.

# SEQUENCIAMENTO COMPLETO DO GENOMA

O sequenciamento completo do genoma (WGS, do inglês *whole genome sequencing*) permite identificar todos os genes presentes no código genético, fornecendo informações a respeito dos determinantes de resistência (genes de resistência), fatores de virulência, patogenicidade, homologia com outros microrganismos e possíveis associações com surtos anteriores – aspectos essenciais para a vigilância epidemiológica.

A OMS recomenda a adoção desta técnica para aprimorar sistemas de vigilância e respostas em saúde pública, destacando que a técnica aumenta a rapidez na detecção e compreensão de ameaças, promovendo respostas mais ágeis e assertivas em segurança dos alimentos.

## LABORATÓRIOS PARTICIPANTES E TECNOLOGIAS

Na primeira fase do Projeto Piloto do Programa AMR, os ensaios de WGS serão realizados pelos laboratórios IAL-SP, IOC, INCQS e Lacen-PR, utilizando tecnologia de sequenciamento de nova geração.

## Etapas do sequenciamento

- 1- Extração do DNA dos isolados: realizada utilizando-se kits comercialmente disponíveis para este propósito (BIO GENE extração de gDNA/ Bioclin, BR ou similar).
- 2- Quantificação do DNA e verificação da qualidade dos fragmentos previamente ao sequenciamento.
- 3- Preparo da biblioteca: deve ser realizada de acordo com a especificação do equipamento utilizado (Illumina, Ion Torrent ou MinION), sendo a plataforma Illumina preferida.

Recomenda-se o uso da ferramenta Fastp (Chen et al, 2018) para aparar os nucleotídeos ambíguos com base no índice de qualidade e nas sequências do adaptador; remoção das sequências com um *Phredscore* inferior a 30; uso do software Unicycler (WICK et al., 2017) para montagem de novo de leituras aparadas e sequências de alta qualidade e o uso do software BUSCO v5.8.2 (Manni et al, 2021) para avaliação da qualidade dos genomas montados.

As sequências serão depositadas no GenBank (acesso restrito) para análise.

O **GenBank** é o banco de dados de sequências genéticas do NIH (Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos, *National Health Institutes*) e parte da Colaboração Internacional de Bancos de Dados de Nucleotídeos, que compreende bases de dados também do Japão e União Europeia. O depósito das sequências nesta base de dados permite sua análise por meio de softwares de bioinformática e comparação com dados de outros microrganismos, inclusive de outros países.

No contexto do Programa AMR, as sequências deverão ser depositadas pelos laboratórios no formato de acesso restrito por 12 meses. A avaliação genômica da resistência aos antimicrobianos será realizada utilizando o software RGI (Resistance Gene Identifier) da base de dados CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database) para investigar a presença de genes de resistência adquiridos (GRA); e o software/ base de dados ResFinder (Bortolaia et al, 2020) para avaliar as mutações que induzem resistência.

Quando da emissão do laudo e envio dos resultados para a Coordenação do Programa, os laboratórios deverão reportar os genes de resistência e as mutações identificadas nestas análises.

# CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA DOS ISOLADOS (SOROTIPAGEM)

Os sorotipos (ou sorovares) são subgrupos dentro de uma mesma espécie ou subespécie com características específicas de virulência, adaptabilidade ao hospedeiro e estrutura. Nas enterobactérias, os antígenos somáticos (O) e flagelares (H) são componentes estruturais cuja combinação é específica para cada sorotipo. Desta forma, sua identificação permite a identificação do sorovar do microrganismo.

**Antígenos somáticos “O”:** são parte do lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa em enterobactérias e divide-se em três regiões: a porção lipídica (lipídeo A), responsável pela toxicidade e pelas características pirogênicas; o “core” ou fração basal; e o polissacarídeo O, formado por unidades repetitivas cujo arranjo espacial e tipo de ligação determinam a especificidade somática do antígeno “O”.

**Antígeno flagelar “H”:** é constituído pela proteína flagelina e é encontrado em bactérias móveis. Suas diferenças antigênicas resultam de variações na sequência primária de aminoácidos da flagelina, originando determinantes

que reagem com anticorpos anti-H.

**Antígenos “K”:** (chamados de “Vi” para *Salmonella*) são os antígenos capsulares, externos ao antígeno “O” e não possuem a mesma relevância que os anteriores para fins de sorotipificação.

A sorotipagem complementa a identificação de cepas bacterianas e é aplicada a culturas puras (após realização do isolamento). Nos métodos sorológicos (lâmina e tubos), anticorpos produzidos em hospedeiros expostos aos antígenos bacterianos são testados contra suspensões das bactérias de interesse.

Atualmente há kits comerciais que identificam rapidamente os sorogrupos de *Salmonella* a partir dos antígenos somáticos O (A, B, C1, C2, D e E), flagelares H e capsulares Vi, quando presentes. O resultado é comparado com o sistema de classificação Kauffman-White do Instituto Pasteur-Paris para se obter o sorotipo específico. Por exemplo, *Salmonella* enterica sorotipo Typhimurium é representada pela fórmula “1,4,[5],12:i:1,2”, que indica os

fatores O 1, 4, [5] e 12, o antígeno H “1” na fase 1 e os antígenos H “1” e “2” na fase 2.

Alguns sorotipos de *E. coli* estão associados a grupos de virulência que podem causar doenças graves. Por este motivo, a classificação sorológica dessas cepas é ferramenta essencial e, no contexto da AMR, permite identificar possíveis relações entre determinados sorotipos e perfis de resistência.

Técnicas de biologia molecular também podem ser empregadas para sorotipificação, como reação em cadeia da polimerase (PCR- polymerase chain reaction) e PCR em tempo real (qPCR, quantitative polymerase chain reaction). Tanto técnicas sorológicas como moleculares serão adotadas pelos laboratórios que realizarão estes ensaios no âmbito do Programa AMR (IAL-SP e IOC).

# IDENTIFICAÇÃO DE *E. COLI*/PRODUTORA DE TOXINA SHIGA (STEC)

As *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) são cepas patogênicas associadas à colite hemorrágica, uma forma grave de diarreia, e à síndrome urêmico-hemolítica (SHU), uma doença de alta gravidade, que causa lesão renal aguda e compõe a Lista Nacional de Doenças e Agravos a serem monitorados pela Estratégia de Vigilância Sentinela do Ministério da Saúde. As *E. coli* produtoras de toxina Shiga (STEC) são cepas patogênicas associadas à colite hemorrágica — uma forma grave de diarreia — e à Síndrome Urêmico-Hemolítica (SHU), doença de alta gravidade que causa lesão renal aguda e integra a Lista Nacional de Doenças e Agravos monitorados pela Estratégia de Vigilância Sentinela do Ministério da Saúde.

Considerando o caráter nacional do Programa AMR, a análise de *E. coli* STEC nas amostras coletadas foi apontada como uma oportunidade para avaliar a ocorrência deste patógeno em alimentos disponíveis para o consumidor brasileiro.

As análises serão realizadas pelo LABENT/IOC/Fiocruz por técnicas de biologia molecular.

O principal fator de virulência das cepas STEC, a produção de toxinas Shiga, é utilizado na identificação dessas cepas. Existem pelo menos duas formas antigênicas da toxina Shiga:

- toxina Shiga-like 1 e
- toxina Shiga-like 2.

Essas toxinas são codificadas pelos genes *stx1* e *stx2* respectivamente. A detecção dos genes ou das toxinas em *E. coli* identificam uma cepa STEC.

Técnicas de reação em cadeia da polimerase (PCR convencional) ou PCR em tempo real (qPCR) poderão ser adotadas para as análises, de acordo com as metodologias propostas por Perelle et al. (2004) e Omar e Barnard (2014).

# ANÁLISE DE RESÍDUOS DE ANTIMICROBIANOS

## METODOLOGIA ANALÍTICA

As análises de resíduos de antimicrobianos serão realizadas por metodologias quantitativas de cromatografia líquida de alta eficiência (ou ultra alta) acoplada à espectrometria de massas em tandem (CLAE/EM-EM, ou HPLC (ou UHPLC)/ MS-MS, siglas do inglês mais comumente utilizadas, que significam *High-Performance Liquid Chromatography/ Tandem Mass Spectrometry* ou *Ultra-High Performance Liquid Chromatography/ Tandem Mass Spectrometry*). Os laboratórios e respectivos equipamentos utilizados nesta primeira fase do Programa AMR constam no **Quadro 07**.

### Princípios da Cromatografia Líquida

A cromatografia líquida é uma técnica analítica que separa os componentes de uma mistura, através da distribuição destes componentes entre duas fases: uma estacionária e a outra móvel. À medida que a fase móvel atravessa a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos constituintes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em

migrações diferenciais de cada um.

### Princípios da Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas é uma técnica analítica que identifica, quantifica e caracteriza compostos químicos com base em sua massa e estrutura química. Esta técnica é normalmente acoplada a outra técnica analítica, como a cromatografia líquida. Diversos equipamento de CLAE/EM estão disponíveis no mercado. A escolha por um modelo ou outro depende das necessidades do laboratório, quanto à resolução, por exemplo, e à disponibilidade de recursos para aquisição e manutenção do equipamento.

### Execução e Validação

Estas análises exigem reagentes com alto grau de pureza analítica e o preparo e análise de curvas de calibração a cada execução. O preparo da curva, condições cromatográficas e do espectrômetro (incluindo as transições monitoradas), bem como os critérios para aceitabilidade dos resultados deverão estar de acordo com o relatório de validação do método.

O painel dos antimicrobianos cujos resíduos serão avaliados no Projeto Piloto Programa AMR encontra-se no **Quadro 08**. Os resultados serão expressos em µg/Kg para cada antimicrobiano avaliado. O resultado da análise será considerado não conforme se for igual ou superior ao limite de decisão para a confirmação (CC<sub>α</sub>), o qual é determinado pelo laboratório durante a validação do método. Este critério segue as diretrizes do Regulamento de Execução (UE 2021/808) da Comissão Europeia.

Após a emissão do laudo de análise, o laboratório poderá, voluntariamente, preencher a “Planilha Resultados Resíduos Antimicrobianos\_Programa AMR” (Anexo II) e enviá-la à Coordenação do Programa AMR. Objetiva-se avaliar a viabilidade e adequação do uso de planilhas para emissão de resultados, subsidiando eventual adoção nas próximas fases. Recomenda-se o preenchimento e envio para simplificar e padronizar os fluxos do Programa.

**Quadro 07: Laboratórios, técnicas e equipamentos adotados para as análises de resíduos de antimicrobianos**

Laboratório	Técnica/ Equipamento
Funed- MG	HPLC-MS/MS (HPLC Shimadzu Proeminence; triplo quadrupolo (QQQ) 4000 Qtrep Sciex)
IAL- SP	UHPLC-MS/MS (UHPLC Agilent – modelo LC1290 (acoplado ao espectrômetro de massas). Espectrômetro modelo QQQ6495A, Agilent; UHPLC – Shimadzu – modelo LC30 AD (acoplado aos detectores DAD e fluorescência).



## Quadro 08: Painei antimicrobianos- ensaios de resíduos de antimicrobianos

Classe de antimicrobiano	Antimicrobiano
Aminoglicosídeos	Diidroestreptomicina
	Espectinomicina
	Estreptomicina
	Gentamicina
	Neomicina
Derivados do ácido fosfônico	Fosfomicina
Macrolídeos	Tilmicosina
	Tilosina
Beta-lactâmicos (penicilinas)	Amoxicilina
	Ampicilina
Polimixinas	Colistina
Quinolonas (fluoroquinolonas)	Ciprofloxacina
	Enrofloxacin
	Norfloxacin
Sulfonamidas	Sulfadimetoxina
Tetraciclins	Doxiciclina
	Oxitetraciclina

# INFORMAÇÕES ADICIONAIS



Demais informações/ orientações sobre o Programa AMR estão disponíveis na página oficial do Programa.

Endereço eletrônico:

<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/fiscalizacao-e-monitoramento/programas-nacionais-de-monitoramento-de-alimentos/monitoramento-de-microorganismos-resistentes-e-residuos-de-antimicrobianos-em-alimentos>).

## Manual do Programa

Informações gerais do Ciclo 2025-2026, incluindo objetivos, amostras, plano amostral, análises laboratoriais e gestão da informação.

## Manual de Coleta, Acondicionamento, Transporte e Análise de Amostras/Isolados

Orientações para Laboratórios e Vigilâncias Sanitárias sobre procedimento de coleta de amostras, envio e recebimento de amostras e isolados bacterianos.

## Informe Técnico

Informações gerais do Ciclo 2025-2026 para consultas rápidas.

## Instruções para CADASTRO DE AMOSTRAS E Registro de Resultados no Sistema Harpya

Orientações para Laboratórios sobre procedimentos de registro, envio e recebimento de amostras e isolados bacterianos no sistema de gerenciamento de amostras laboratoriais Harpya.

# REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária- Anvisa. **Limites Máximos de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal. Documento de base para discussão regulatória.** Brasília, 2018. 136p. Disponível em: [https://antigo.anvisa.gov.br/documents/219201/219401/Med+Vet\\_Documento+base+discussa~o+18.10/69d161b5-785c-4907-862c-2294b48a79c5](https://antigo.anvisa.gov.br/documents/219201/219401/Med+Vet_Documento+base+discussa~o+18.10/69d161b5-785c-4907-862c-2294b48a79c5). Acesso em 20 agosto 2025.

AJAYI, R. F. et al. Nanoparticles in biosensor development for the detection of pathogenic bacteria in water. In: **Emerging Freshwater Pollutants**. [s.l.] Elsevier, 2022. p. 331–358.

American Public Health Association- APHA. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods: 8.935 Petrifilm for *E.coli* and Coliforms.** 4. ed. Washington, D.C: APHA, 2001

American Public Health Association- APHA. **Compendium of Microbiological Examination of Foods, Chapter 36.13. General Description for the Identification of *Salmonella*.** 5th Ed., 2015

American Public Health Association- APHA. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, Chapter 9: Enterobacteriaceae, Coliforms and *Escherichia coli* as Quality and Safety Indicators.** 5. ed. Washington, D.C, 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO 9001:2015 – Sistemas de gestão da qualidade — Requisitos.** Rio de Janeiro: ABNT, 2015.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO/IEC 17025:2017 – Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração.** Rio de Janeiro: ABNT, 2017.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR ISO 15189:2023 – Laboratórios clínicos — Requisitos de qualidade e competência.** Rio de Janeiro: ABNT, 2023.

Australian government. Department of Agriculture. 2015. **SimPlate Colour Indicator: Detection and Quantitation of Coliforms and *E. coli* in Foods- AOAC 2005.03**. 2p. Disponível em:

<https://www.agriculture.gov.au/sites/default/files/sitecollectiondocuments/aqis/exporting/meat/elmer3/approved-methods-manual/Generic-E-coli-SimPlate-Colour-Indicator-AOAC-2005.03.pdf>. Acesso em 09 agosto 2025.

Australian government. Department of Agriculture, Fisheries and Forestry. 2024. ***E. coli* Petrifilm - AOAC 991.14 and AOAC 998.08**. 2p. Disponível em:

<https://www.agriculture.gov.au/sites/default/files/sitecollectiondocuments/aqis/exporting/meat/elmer3/approved-methods-manual/Generic-E-coli-SimPlate-Colour-Indicator-AOAC-2005.03.pdf>. Acesso em 25 agosto 2025.

BIO-RAD. **Bacterial Serotyping Guide for *Salmonella***. 7p. Disponível em:

<https://www.who.int/publications/i/item/9789241509763>. Acesso em 20 agosto 2025.

Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, Philippon A, Allesoe RL, Rebelo AR, Florensa AR, Fagelhauer L, Chakraborty T, Neumann B, Werner G, Bender JK, Stingl K, Nguyen M, Coppens J, Xavier BB, Malhotra-Kumar S, Westh H, Pinholt M, Anjum MF, Duggett NA, Kempf I, Nykäsenoja S, Olkkola S, Wieczorek K, Amaro A, Clemente L, Mossong J, Losch S, Ragimbeau C, Lund O, Aarestrup F. M. (2020). ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 75(12),3491-3500

BRASIL. Ministério da Saúde. 2025. **Febre Tifóide**. Disponível em:

<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/f/febre-tifoide>. Acesso em 20 agosto 2025.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução Normativa IN nº 161, de 1º de julho de 2022**. Estabelece os padrões microbiológicos dos alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, 06 julho 2022.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução Normativa- IN N° 303, de 28 de maio de 2024**. Altera a Instrução Normativa - IN nº 211, de 1º de março de 2023, que estabelece as funções tecnológicas, os limites máximos e as condições de uso para os aditivos alimentares e os coadjuvantes de tecnologia autorizados para uso em alimentos. . Diário Oficial da União, Brasília, 29 maio 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp**. Brasília, 2011. 60p. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/svsa/doencas-diarreicas-agudas/manual-tecnico-de-diagnostico-laboratorial-das-salmonella-spp.pdf/view>. Acesso em 05 setembro 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Portaria nº 64, de 11 de dezembro de 2018**. Determina aos laboratórios da rede pública, de todas as Unidades Federadas, a utilização das normas de interpretação para os testes de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA), tendo como base os documentos da versão brasileira do European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 12 dez. 2018. Seção I, p. 59.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 512, de 27 de maio de 2021**. Dispõe sobre as Boas Práticas para Laboratórios de Controle de Qualidade. . Diário Oficial da União, Brasília, 31 maio 2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 724, de 1º de julho de 2022**. Dispõe sobre os padrões microbiológicos dos alimentos e sua aplicação. Diário Oficial da União, Brasília, 06 julho 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2025. ***Salmonella* (Salmonelose)**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/s/salmonella>. Acesso em 20 agosto 2025.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2024. **Surtos de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar – Informe 2024**. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/situacao-epidemiologica/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe-2024.pdf>. Acesso em 04 de agosto de 2025.

CARMEN, K. et al. Jawetz, **Melnick & Adelberg: Microbiologia Médica**. 26. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.

CHEN, S. et al. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. **Bioinformatics**, v. 34, n. 17, p. i884–i890, 1 set. 2018.. doi: 10.1093/bioinformatics/bty560.

Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade- BRCAST. **Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica**. 2015. Disponível em: <https://brcast.org.br/wp-content/uploads/2022/07/Orientacoes-do-EUCAST-para-a-deteccao-de-mecanismos-de-resistencia-e-resistencias-especificas-de-importancia-clinica-e-ou-epidemiologica.pdf>. Acesso em 25 agosto 2025.

COMISSÃO EUROPEIA. **Regulamento de execução (UE) 2021/808**, de 22 de março de 2021, relativo ao desempenho dos métodos analíticos para os resíduos de substâncias farmacologicamente ativas utilizadas em animais produtores de gêneros alimentícios e à interpretação dos resultados, bem como aos métodos a utilizar na amostragem, que revoga as Decisões 2002/657/CE e 98/179/CE. Jornal Oficial da União Europeia, L 180, 21 maio 2021, p. 84-109.

Crowley E. et al. Evaluation of VIDAS® Salmonella (SLM) Easy *Salmonella* Method for the Detection of Salmonella in a Variety of Foods: Collaborative Study. **Journal of AOAC International**. Vol. 94, no. 6, p. 1821-1834, 2011. DOI: 10.5740/jaoacint.CS2011\_03.

CRUMP, J. A.; WAIN, J. *Salmonella*. In: **International Encyclopedia of Public Health**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 425–433.

DWIVEDI, H.P.; DEVULDER, G.; JUNEJA, V.K. *Salmonella*: detection by immunoassays. In: WOOD, B.J.B. (ed.). **Encyclopedia of Food Microbiology**. 2. ed. Oxford: Academic Press, 2014. p. 339–342.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing- EUCAST. 2023. **EUCAST Frequently Asked Questions**. 34p. Disponível em: [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/General\\_documents/FAQ/FAQ\\_EUCAST\\_20230614.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/General_documents/FAQ/FAQ_EUCAST_20230614.pdf). Acesso em 01 setembro 2025.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing- EUCAST. 2025. **Enterobacterales Calibration of zone diameter breakpoints to MIC values**. Version 13.0. 128p. Disponível em: [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Disk\\_criteria/Validation\\_2025/Enterobacterales\\_v13.0\\_January\\_2025.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_criteria/Validation_2025/Enterobacterales_v13.0_January_2025.pdf)

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 16649-2:2001 – Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* — Part 2: Colony-count technique at 44 °C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-glucuronide**. Geneva: ISO, 2001.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 6579-1:2017 – Microbiology of the food chain — Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* — Part 1: Detection of *Salmonella* spp.** Geneva: ISO, 2017.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 20776-2:2021 – Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices — Part 2: Evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices**. Geneva: ISO, 2021.

INSTITUT PASTEUR. **World Health Organization Collaboration Centres WHO collaborating centre for *Salmonella***. 2025. Disponível em <https://research.pasteur.fr/en/whocc/salmonella/>. Acesso em 01 setembro 2025.

Manni, M., Berkeley, M. R., Seppey, M., & Zdobnov, E. M. (2021). BUSCO: Assessing genomic data quality and beyond. **Current Protocols**, 1, e323. doi: 10.1002/cpz1.323

MCMASTER UNIVERSITY. **Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD)**. Hamilton: McMaster University. Disponível em: <https://card.mcmaster.ca/>. Acesso em 20 agosto 2025.

MUMY, K. L. *Salmonella*. In: **Encyclopedia of Toxicology**. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 211–212.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION- NCBI. **GenBank**. Bethesda: NCBI. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Acesso em 20 agosto 2025.

OMAR, K. B.; BARNARD, T. G. Detection of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in clinical and environmental water sources in South Africa using single-step 11-gene m-PCR. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 10, p. 2663–2671, 27 out. 2014.

PERELLE, S. et al. Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases. **Molecular and Cellular Probes**, v. 18, n. 3, p. 185–192, jun. 2004.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. **Bacteriological Analytical Manual (BAM): Chapter 5 – Salmonella**. Silver Spring: FDA, 2021. Atualizado em: maio 2024. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-5-salmonella>. Acesso em 04 agosto 2025.

UNITED STATES. Food and Drug Administration. **Bacteriological Analytical Manual (BAM): Chapter 4 – Enumeration of *Escherichia coli* and the coliform bacteria**. Silver Spring: FDA, 2020. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-4-enumeration-escherichia-coli-and-coliform-bacteria>. Acesso em 04 agosto 2025.

WICK, R. R. et al. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. **PLOS Computational Biology**, v. 13, n. 6, p. e1005595, 8 jun. 2017. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005595.

WORLD HEALTH ORGANIZATION- WHO. **WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance**. Geneva: World Health Organization, 2024b. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461>. Acesso em 14 julho 2025.

WORLD HEALTH ORGANIZATION- WHO. **WHO global strategy for food safety 2022-2030: towards stronger food safety systems and global cooperation**. Geneva: WHO, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241509763>. Acesso em 10 julho 2025.



---

# ANEXOS

[Anexo I](#)- “Planilha Resultados Ensaio Microbiológicos\_Programa AMR”. Planilha a ser adotada pelos laboratórios, de forma voluntária, para envio dos resultados. O envio desta planilha devidamente preenchida à Coordenação não elimina a obrigatoriedade da utilização do sistema Harpya para emissão de resultados no Projeto Piloto do Programa AMR.

[Anexo II](#)- “Planilha Resultados Resíduos Antimicrobianos\_Programa AMR” . Planilha a ser adotada pelos laboratórios, de forma voluntária, para envio dos resultados. O envio desta planilha devidamente preenchida à Coordenação não elimina a obrigatoriedade da utilização do sistema Harpya para emissão de resultados no Projeto Piloto do Programa AMR.