FERNANDA MONTSERRAT VOSS ARELLANO

**Qualidade microbiológica da alimentação fornecida aos
cães errantes nas imediações da reserva florestal da
Cidade Universitária**

São Paulo

2013

FERNANDA MONTSERRAT VOSS ARELLANO

**Qualidade microbiológica da alimentação fornecida aos cães errantes nas
imediações da reserva florestal da Cidade Universitária**

Dissertação apresentado ao Programa Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof^a. Dra. Evelise Oliveira Telles

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2865
FMVZ

Arellano, Fernanda Montserrat Voss
Qualidade microbiológica da alimentação fornecida aos cães errantes nas imediações da reserva florestal da Cidade Universitária. / Fernanda Montserrat Voss Arellano. -- 2013.
54 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Evelise Oliveira Telles.

1. Cães errantes. 2. Higiene alimentar. 3. *Salmonella* spp. 4. *Listeria monocytogenes*.
5. *Mycobacterium* spp. I. Título.

Bioética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Qualidade microbiológica da alimentação fornecida aos cães errantes nas imediações da reserva florestal da Cidade Universitária", protocolado sob o nº 2987/2013, não utilizando animais, sob a responsabilidade do(a) Profa. Dra. Evelise de Oliveira Telles, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 10/4/2013.

We certify that the Research "Microbiological quality of food provided to the stray dogs in the University of São Paulo forest reserve", protocol number 2987/2013, not using animals, under the responsibility Profa. Dra. Evelise de Oliveira Telles, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 4/10/2013.

São Paulo, 15 de abril de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ARELLANO, Fernanda Montserrat Voss

Título: **Qualidade microbiológica da alimentação fornecida aos cães errantes nas imediações da reserva florestal da Cidade Universitária.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Aos gatos da minha vida

Meu gatão Gian,

Meus gatinhos Link e Kira,

E ao meu querido Ikki que mora no céu.

AGRADECIMENTOS

Agradeço muito ao meu amor, companheiro e amigo Gian por estar sempre ao meu lado e por me ajudar de tantas e tantas maneiras!

A Prof. Dra. Evelise pela orientação, ensinamentos e confiança.

Ao Prof. Dr. Ricardo Dias pela oportunidade e por toda a sua colaboração. A Aline Guilloux pela ajuda e pela disposição e a João Seber pela cooperação.

Aos meus pais e a minha família. Aos meus sogrinhos, que me ajudaram muito quando precisei me hospedar em sua residência, além de toda a atenção e carinho que recebi.

Às pós graduandas Cássia e Luisa, um muito obrigada de todo coração pela ajuda e pelos ensinamentos.

A Patty, pela amizade e por estar sempre à disposição e por todas as dicas.

Às técnicas do Laboratório Sandra, Liliana, Gisele e Zenaide que também tiveram muita paciência e me ensinaram bastante. À residente Natalia e estagiária Luisa pelo companheirismo e pela ajuda.

E a todos que estiveram próximos ou distantes, e que me acompanharam nessa fase da minha vida. Muito obrigada!

RESUMO

ARELLANO, F. M. V. **Qualidade microbiológica da alimentação fornecida aos cães errantes nas imediações da reserva florestal da Cidade Universitária.** [Microbiological quality of food provided to the stray dogs in the University of São Paulo forest reserve]. 2013. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Este trabalho analisou as condições microbiológicas em que se encontram os alimentos fornecidos aos cães errantes que se localizam na reserva florestal da Cidade Universitária Armando de Salles Oliveira – Universidade de São Paulo. Trata-se de sobras de alimentos que foram consumidos em restaurantes locais e são fornecidos diariamente aos animais por um voluntário. Foram recolhidas amostras desses alimentos ao longo de cinco dias, e, em cada dia, foram escolhidas seis porções procurando a maior representatividade das amostras. Foram pesquisados os seguintes microrganismos: coliformes totais e termotolerantes, *Staphylococcus* coagulase positiva, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Mycobacterium* spp. Para coliformes totais (Log NMP/g) nas amostras de produtos cárneos a média foi 4,1, variando de 2,4 até >7,0, e para o grupo de outros alimentos a média foi 3,8 variando de 2,0 até 5,7. Para os coliformes termotolerantes (Log NMP/g) nas amostras de produtos cárneos a média foi 3,6, variando de 1,2 até 7,0; e para o grupo de outros alimentos a média foi 3,2, variando de 1,0 até 5,7. Para *Staphylococcus* coagulase positiva (Log UFC/g) nas amostras de produtos cárneos a mediana (distribuição dos dados não foi normal) foi <2 e o valor máximo foi 5,4; e para o grupo de outros alimentos a mediana foi <2 e o valor máximo 5,8. Houve ausência de *Salmonella* spp. em 25 g em todas as amostras, para *Listeria monocytogenes* 33,3% (10/30) das amostras foram positivas e 3,3% (1/30) das amostras houve presença de *Mycobacterium* spp. não pertencente aos complexos *M. tuberculosis*, *M. avium-intracelulare*. Considerando a susceptibilidade dos cães aos patógenos transmitidos por alimentos e as incertezas sobre dose-resposta aos desafios microbiológicos e, considerando ainda, o direito dos animais à alimentos seguros e saudáveis, conclui-se que os alimentos ofertados aos cães na CUASO apresentaram características microbiológicas insatisfatórias, interpretado pelos padrões microbiológicos da legislação para alimentação humana tendo em vista a

inexistência de padrões específicos para alimentação animal.

Palavras-chave: Cães errantes. Higiene alimentar. *Salmonella* spp. *Listeria monocytogenes*. *Mycobacterium* spp.

ABSTRACT

ARELLANO, F. M. V. **Microbiological quality of food provided to the stray dogs in the University of São Paulo forest reserve.** [Qualidade microbiológica da alimentação fornecida aos cães errantes nas imediações da reserva florestal da Cidade Universitária]. 2013. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

This study analyzed the microbiological conditions of the food provided stray dogs that are located in the University of São Paulo forest reserve. These foods are leftovers that were eaten in local restaurants and are provided daily to the animals by a volunteer. Samples were taken of these foods during five days, and every day six portions were selected for representative samples. We searched the following microorganisms: total and fecal coliforms, coagulase positive *Staphylococcus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* and *Mycobacterium* spp. For total coliforms (Log MPN/g) in samples of meat products, the average was 4.1, ranging from 2.4 to >7.0 and the group of other foods, the average was 3.8 ranging from 2.0 up to 5.7. For fecal coliforms (Log MPN/g) in samples of meat products, the average was 3.6, ranging from 1.2 to 7.0, and the group of other foods, the average was 3.2, ranging from 1.0 to 5.7. *Staphylococcus* coagulase positive (Log CFU/g) in samples of meat products the median (data distribution was not normal) was <2 and the maximum value was 5.4, and the other food group median was <2 and the value 5.8 max. There was no *Salmonella* spp. 25 g in all samples, *Listeria monocytogenes* 33.3% (10/30) of samples were positive, and 3.3% (1/30) samples showed the presence of *Mycobacterium* spp. not belonging to the complex *M. tuberculosis*, *M. avium-intracellulare*. Considering the susceptibility of dogs to foodborne pathogens and uncertainties about dose-response to microbial challenges, and considering also the right of animals to safe and healthy food, it is concluded that the food offered to dogs in CUASO showed unsatisfactory microbiological patterns, by microbiological standards for human food legislation due absence of specific standards for animal feed.

Key-words: Cães errantes. Higiene alimentar. *Salmonella* spp. *Listeria monocytogenes*. *Mycobacterium* spp.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sacola trazida pelo voluntário com as sobras dos restaurantes locais.	31
Figura 2 - Gel de agarose 1,5% da PCR para gene <i>prs</i> das amostras sugestivas de <i>L. monocytogenes</i> no ágar ALOA® - São Paulo - junho de 2013.....	42
Figura 3 - Gel de agarose 1,5% da PCR para gene <i>hly</i> das amostras sugestivas de <i>L. monocytogenes</i> no ágar ALOA® - São Paulo - junho de 2013.....	42
Figura 4 - Gel de agarose 1,5% da PCR Multiplex das amostras que continham BAAR - São Paulo - maio de 2013.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultados do Log NMP/g de Coliformes totais, termotolerantes e Log de UFC/g de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva e os valores média, desvio padrão e mediana, valor mínimo e máximo de cada dos grupos de produtos cárneos e outros alimentos - São Paulo - abril de 2013...	41
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALOA	Agar Listeria according to Ottaviani & Agosti
AT	Colônias atípicas de <i>Staphylococcus aureus</i>
BAAR	Bacilos álcool ácido resistentes
BHI	Brain Heart Infusion
BVB	Bile verde brilhante
°C	Graus Celcius
CUASO	Cidade Universitária Armando de Salles Oliveira
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EC	Caldo Escherichia coli
EDTA	Etilenodiamino Tetracético
EPEC	<i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigênica
EUA	Estados Unidos
FDA	United States Food and Drug Administration
FMVZ USP	Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

h	Hora
Log	Logaritmo
OIE	Organização Mundial da Saúde Animal
M	Molar
MGIT	Mycobacteria Growth Indicator Tube
min	Minuto
mL	Mililitros
mM	Milimolar
ng	Nanograma
NMP	Número Mais Provável
rpm	Rotações por minuto
pb	Pares de Bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
s	Segundos
SS	Salmonella Shigella

T	Colônias típicas de <i>Staphylococcus aureus</i>
TE	Tris EDTA
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
TSA	Triptona de soja
TSI	Triplo açúcar ferro
U	Unidades
UFC	Unidades formadoras de Colônias
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
WHO	Organização Mundial da Saúde
<	Menor
>	Maior
±	Mais ou menos
%	Porcentagem / Porcento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	16
1.1	Zoonoses	17
1.1.1	<i>Salmonella</i> spp	18
1.1.2	<i>Listeria monocytogenes</i>	19
1.1.3	<i>Mycobacterium</i> spp.....	22
1.2	Microrganismos indicadores	23
1.2.1	Coliformes totais e coliformes fecais	24
1.2.2	<i>Escherichia coli</i>	25
1.2.3	<i>Staphylococcus aureus</i>	26
1.3	Qualidade da alimentação servida a animais	27
2	OBJETIVO.....	30
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1	Coleta dos alimentos.....	31
3.2	Preparo das Amostras.....	33
3.2.1	Análises quantitativas	34
3.2.2	Análises qualitativas	35
4	RESULTADOS	39
5	DISCUSSÃO	44
6	CONCLUSÃO.....	49
	REFERÊNCIAS	50

1 INTRODUÇÃO E REVIÃO DE LITERATURA

A convivência entre o ser humano e a espécie canina existe há muitos anos. Essa convivência trouxe inúmeros benefícios ao homem, pois esses animais podem proporcionar companhia, contribuição em atividades como proteção do território e caça, além de auxiliarem deficientes físicos e também por participarem em terapias assistidas por animais. No entanto, apesar dessa convivência desejável, a procriação descontrolada, abandono, hábitos inadequados de criação e à deterioração da qualidade de vida em certas comunidades humanas são fatores que influenciaram ao aparecimento de cães errantes (INSTITUTO PASTEUR, 2000). Cães errantes são aqueles que não estão sob o controle direto de uma pessoa ou cães que não são impedidos de andar livremente (OIE, 2009).

Essa população crescente de cães errantes tornou-se uma preocupação para as autoridades de saúde pública em diversos países. Isso se deve pelo fator que os cães errantes podem proporcionar alguns prejuízos como a transmissão de doenças e também provocar agressões ao homem. Diminuir população de animais errantes tornou-se preocupação para os órgãos públicos e, desse modo, programas de controle populacional passaram a fazer parte das medidas de saúde pública. A redução da população canina através da esterilização é eficiente, mas não mostra resultados significativos em curtos períodos de tempo. Além disso, a redução das taxas de abandono e a promoção da posse responsável contribuem para o controle populacional (AMAKU; DIAS; FERREIRA, 2009).

Existem alguns fatores que influenciam a distribuição dos cães errantes. A presença de abrigo é bastante desejável para a proteção, sobrevivência e reprodução destes animais. Outro fator é a disponibilidade de lixo, pois quando não está bem acondicionado ele proporciona uma fonte de alimentação para os cães errantes. Também, hábitos como a criação de animais semi domiciliados e propriedades que permitem a fuga de seus animais também influem nessa

distribuição (BECK, 1973). Desse modo, animais procuram principalmente abrigo e alimentos. Ao fornecer uma fonte de alimentação constante a uma população de cães errantes é possível mantê-la uma determinada região.

Segundo Dias et al. (2013), a comunidade da Universidade tem contato constante com cães errantes e esse contato pode levar à transmissão de zoonoses, acidentes por mordeduras e acidentes de carro por atropelamento. No estudo foi feita a estimativa da quantidade de cães presentes no campus e, durante as observações, os cães foram vistos na maioria das vezes próximos à prédios e restaurantes. O programa Práticas Educativas em Segurança dos Alimentos identificou e cadastrou na CUASO, até o primeiro semestre de 2012, 53 pontos de venda de alimentos em todo o campus (PORFIRIO et al., 2012).

Além disso, segundo Dias et al. (2013), ele responsabiliza que uma fonte constante de alimentação pode ser uma das razões principais da permanência dos cães no campus tendo em vista que a densidade dos cães nos pontos de venda de alimentos foi maior que a densidade de cães na mesma distância de lixos. A provável fonte de alimentação de escolha desses animais são os restos de comida oferecidos pelas pessoas e voluntários em volta dos restaurantes da universidade. Assim, uma fonte de alimentação é o principal motivo para a persistência dessa população dentro das fronteiras do campus. O autor também cita que as pessoas devem ser desencorajadas de providenciar restos de alimentos para os cães errantes.

1.1 Zoonoses

A Organização Mundial de Saúde conceitua zoonose como qualquer doença ou infecção que é naturalmente transmissível de animais vertebrados para os seres humanos (WHO, 2013).

Fezes de cães podem conter diversos tipos de microrganismos potencialmente patogênicos para humanos, sendo, nesse caso, zoonoses. Bactérias que são patógenos e que podem causar diarreia como *Campylobacter*, *Salmonella*, *Yersinia* e *E. coli*. Em ambientes urbanos, as fezes de animais no ambiente podem representar uma fonte importante de microrganismos potencialmente patogênicos para outros animais assim como para a comunidade (CINQUEPALMI et al., 2013).

Cães são suscetíveis a infecção por diversos patógenos causadores de doenças gastrointestinais em humanos. No entanto, na maioria das vezes quando são expostos a esses agentes, não demonstram sinais clínicos. Contudo, a excreção desses agentes pelas fezes pode acontecer e possui grande potencial zoonótico. Nos EUA, aproximadamente 3% de todas as salmoneloses podem ser atribuídas ao contato com animais de companhia (LENZ et al., 2009).

1.1.1 *Salmonella* spp.

As salmonelas são bacilos Gram negativos, não formadores de esporos e anaeróbios facultativos. Localizam-se primordialmente no trato gastrointestinal de diversas espécies animais incluindo: aves, répteis e mamíferos. Podem multiplicar-se em temperaturas entre 7 e 49,5°C, sendo 37°C a temperatura ideal para seu crescimento (GERMANO, 2008). Altas temperaturas podem causar a destruição da *Salmonella*. No leite é possível causar sua destruição a 71,2 °C por 1,2s (JAY, 2009).

No estudo realizado por Ribeiro et al. (2010) encontrou *Salmonella* em 42 amostras de fezes em cães com enterite. Os sorotipos mais identificados em cães foram *Salmonella Typhimurium* e *Salmonella Enteritidis*.

Casos clínicos causados por infecção por *Salmonella* spp. são raros em cães, contudo a sintomatologia clínica é similar àquela que acontece nos humanos. Os sintomas incluem febre, mal estar, vômitos, dor abdominal e

diarréia. Colapso cardiovascular e choque podem acontecer, mas em casos de infecções sistêmicas em animais jovens, idosos ou imunocomprometidos. Já as fontes de infecção para cães são o consumo de alimentos contaminados, consumo de roedores infectados e coprofagia (FINLEY; REID-SMITH; WEESE, 2006).

O tratamento para salmonelose em cães também é apenas de suporte em casos não complicados. Em animais imunocomprometidos ou com risco de desenvolver septicemia o uso de antimicrobianos é necessário (MARKS et al., 2011).

Os cães podem tornar-se portadores de salmonela pela ingestão de alimentos contaminados. Os cães são capazes de eliminar o microrganismo nas suas fezes durante seis semanas ou mais, podendo haver a eliminação intermitente dos cães portadores assintomáticos. Estes podem servir como fonte de salmonelose para outros cães ou para o ser humano (MORSE et al., 1976).

1.1.2 *Listeriamonocytogenes*

Listeriose é a doença causada pelas bactérias do gênero *Listeria* e a *L. monocytogenes* é considerada a mais patogênica das espécies, tanto para humanos, quanto para animais. A ingestão de alimentos contaminados é a principal rota de infecção, porém não se sabe a carga microbiana mínima capaz para desenvolver a doença em humanos. A temperatura de crescimento varia de 1 a 45 °C e de modo geral, protocolos de pasteurização do leite são suficientes para sua destruição (MCLAUCHLIN, 2004; JAY, 2009).

O desenvolvimento da doença, pelo menos em humanos, depende do estado do hospedeiro. Uma pessoa saudável, não grávida e não imunossuprimida é bastante resistente à infecção podendo não apresentar listeriose clínica ou apenas sinais genéricos semelhantes a uma virose. No entanto, quando há

comprometimento do sistema imune, a doença pode ser grave. Aborto, nascimento prematuro ou natimortalidade são observados em grávidas. Em outros casos meningite, septicemia, meningite, encefalite, meningoencefalite e linfadenopatia podem ocorrer (JAY, 2009).

Poucos relatos foram feitos da listeriose canina, no caso relatado por Schroeder e van Rensburg (1993), uma cadela da raça Doberman foi levada ao veterinário pela queixa de andar em círculos, hemiparesia e depressão. No exame clínico revelou dor abdominal, anemia, conjuntivite, diminuição da sensibilidade facial, diminuição do tônus muscular da mandíbula e língua, e diminuição da propriocepção. Na citologia da medula óssea apresentou infecção bacteriana. Apesar do tratamento com antibióticos, a cadela veio a óbito. Na necrópsia, lesões inflamatórias multifocais generalizadas foram encontradas nos pulmões, fígado, baço, meninges, gânglios linfáticos, glândulas adrenais e rins. *Listeria monocytogenes* foi isolada em cultura pura a partir destes órgãos e tecidos. O exame histopatológico revelou numerosas bactérias em forma de bastonete intracelulares gram-positivas observadas em todos os órgãos acima referidos.

Em outro relato por Marien et al. (2007) foi encontrada *L. monocytogenes* da vesícula biliar de uma cadela com meses imunocomprometida. A cadela estava sendo tratada há quatro meses com corticoesteróides devido ao diagnóstico de artrite auto-imune. Após esse período, apresentou diarreia e hepatomegalia. Diversos exames complementares foram feitos, mas no aspirado da vesícula biliar foi detectada a presença de *L. monocytogenes*. A cadela teve que ser eutanasiada alguns dias depois.

O tratamento por diversos meses com corticoesteróides pode ser o fator de predisposição mais provável nesse caso. Já, a origem da listeriose nesse caso é difícil de descobrir. Cães podem se infectar através da alimentação, mas também podem se infectar ao ter contato com outros animais infectados ou portadores, ou, até mesmo, a *L. monocytogenes* podia estar presente na microbiota intestinal e manifestado a doença após a queda da resistência por parte do animal (MARIEN et al., 2007).

As listerias estão altamente distribuídas no ambiente e são considerados microrganismos ubiquitários (JAY, 2009). E, apesar dos surtos de listeriose humana estarem relacionados ao consumo de alimentos contaminados por falta de higiene ou contaminação cruzada, o contato direto com animais doentes ou portadores pode levar à listeriose humana (QUINN et al., 1999¹ apud MARIEN et al., 2007, p.354; GAHAN; HILL, 2005²; apud MARIEN et al., 2007, p.354).

No trabalho de Hardy, Margolis e Contag (2006) foi demonstrada a replicação extracelular de *L. monocytogenes* no lúmen da vesícula biliar de camundongos e verificou que as bactérias foram liberadas ao intestino e depois excretadas pelas fezes permanecendo viáveis no ambiente.

Ainda, a *L. monocytogenes* pode ser isolada das fezes de animais saudáveis e humanos. No estudo que investigou a presença de *L. monocytogenes* no conteúdo intestinal de errantes, houve o isolamento em 1,22% (1/82) dos animais. O animal em que foi isolada era aparentemente saudável. O sorotipo isolado foi o 1/2b que é um sorotipo comumente isolado nos casos de listeriose humana. Ainda, a possibilidade que cães de rua possam ser uma reservatório de *L. monocytogenes* existe e, também, podendo ser uma fonte de listeriose para humanos (KOCABIYIK; ÇETIN; ÖZAKIN, 2005).

Outro estudo feito na Alemanha por Weber et al. (1995) teve uma ocorrência semelhante. Verificou-se a presença de *L. monocytogenes* em 1,3% das amostras (4/300). Sendo encontrado o sorovar 1/2b três vezes e o sorovar 4ab uma vez.

Como mencionado, as infecções por *L. monocytogenes* são pouco relatadas em cães. A rota mais comum de infecção por *L. monocytogenes*, tanto em humanos, quanto nos animais, é a rota oral/gastrointestinal. Mas pode

¹QUINN, P. J.; CARTER, M. E.; MARKEY, B. K.; CARTER, G. R. *Listeria species*. **Clinical Veterinary Microbiology**, p. 170-174, 1999.

²GAHAN, C.G.M.; HILL, C. Gastrointestinal phase of *Listeria monocytogenes* infection. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 1345-1352, 2005.

também ser que a *L. monocytogenes* esteja presente na microbiota normal do animal (LÄIKKÖ et al., 2004).

1.1.3 *Mycobacterium* spp.

As infecções por micobactérias são incomuns em cães e o diagnóstico é difícil. Os principais sinais como caquexia, debilidade e emagrecimento nem sempre são observados nos animais. A prova de tuberculinização pode apresentar resultados falso-positivo ou falso-negativo, dificultando o diagnóstico ante-mortem. Já, outros sinais como vômitos, perda de apetite, caquexia e diarreia tem sido reportados aos cães infectados por micobactérias (OLIVEIRA et al., 2012).

Em um relato por Erwin et al. (2004) uma mulher foi positiva para *M. tuberculosis*. Seis meses depois, levou seu Yorkshire de três anos e meio para o veterinário relatando tosse, emagrecimento e vômito. O teste inicial para tuberculose foi negativo. Oito dias após, o animal foi eutanasiado por obstrução uretral. Na necropsia, as amostras de fígado e linfonodo tronqueobraquial foram positivas para *M. tuberculosis* por PCR. As amostras de *M. tuberculosis* da dona e do cão foram genotipadas e foram idênticas. Esse foi o primeiro relato com gentotipagem confirmada. O verdadeiro risco de transmissão de humanos para cães não se conhece, ou vice-versa. No entanto, o potencial de transmissão existe e profissionais da área da saúde devem estar cientes deste risco.

Muitas espécies de mamíferos domésticos são sensíveis aos agentes da tuberculose. Os cães se infectam através de exposição maciça e repetida, ao coabitarem com pacientes humanos ou ao consumir repetidas vezes produtos contaminados. Em um relato de caso realizado por Megid et al. (1994), estudou uma família com 18 pessoas, destas cinco apresentavam tuberculose pulmonar confirmada por exames clínicos, radiológicos e pesquisa de micobactéria em escarro. A família possuía uma cadela e dois gatos. A cadela foi submetida a diversos exames para pesquisar a presença de tuberculose e houveram

alterações radiográficas compatíveis com a doença, assim como a baciloscopia apresentou Bacilos Álcool Ácido Resistentes (BAAR). Na necropsia não foram encontradas alterações macroscópicas, porém, no exame histológico dos linfonodos mediastínicos, corados pelo método de Ziehl-Neelsen, foram observados no citoplasma dos macrófagos a presença de material particulado de coloração eosinofílica (compatível com micobactérias). Esse animal foi considerado como fonte de infecção potencial apesar de não saber exatamente o perigo que o cão tuberculoso representa para o homem.

Cães são mais suscetíveis às infecções por *Mycobacterium* das espécies *M. tuberculosis* e *M. bovis*, no entanto, já foram relatadas infecções por *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. chelonae-abscessus*, *M. flavescense* e *M. genavense*. Os cães podem se contaminar quando vivem em estreita relação com o homem doente ou com bovinos. A infecção por *M. bovis* ocorre principalmente pela via digestiva e por *M. tuberculosis* pela via aérea (OLIVEIRA et al., 2012).

Sabe-se que a tuberculose é uma doença reemergente e pode ser encontrada em grandes centros urbanos. A manipulação de alimentos por indivíduos doentes ou portadores podem ser fontes de contaminação do alimento (GERMANO, 2008). Desse modo, *M. tuberculosis* pode ser transmitido por via digestiva quando alimentos contaminados por um indivíduo doente forem consumidos por outro indivíduo.

1.2 Microrganismos indicadores

Microrganismos indicadores podem ser utilizados para refletir a qualidade microbiológica dos alimentos em relação à segurança dos alimentos. A presença destes microrganismos pode fornecer informações sobre a ocorrência de contaminação de origem fecal, sobre a provável presença de patógenos ou sobre a deterioração potencial do alimento, além de poderem indicar condições sanitárias inadequadas durante o processamento, produção ou armazenamento.

Geralmente os microrganismos indicadores são considerados como sendo de grande significância quando da avaliação da qualidade e segurança microbiológicas de alimentos (JAY, 2009).

1.2.1 Coliformes totais e coliformes fecais

Os coliformes são bastonetes Gram negativos, não esporulados e que fermentam lactose em 48 horas. De maneira geral, os coliformes são representados por quatro gêneros da família *Enterobacteriaceae*: *Citrobacter*, *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*. Os coliformes crescem em uma ampla variedade de meios e também de alimentos. Esses microrganismos são frequentemente utilizados como indicadores da qualidade microbiológica em alimentos (JAY, 2009).

O grupo dos coliformes totais ou coliformes a 35°C compreende bactérias que podem ser entéricas, ou não. A presença desse grupo microbiano em alimentos não aponta necessariamente a presença de patógenos ou a contaminação fecal. Contudo, números elevados indicam condições higiênico-sanitárias insatisfatórias (CHOUMAN; PONSANO; MICHELIN, 2010).

Coliformes fecais produzem gás em caldo EC em temperaturas de 44°C a 46°C. Um teste para coliformes fecais é essencialmente um teste para *E. coli* tipo I, embora algumas linhagens de *Citrobacter* e *Klebsiella* possam se adequar a essa definição. O habitat primário de muitos coliformes, incluindo a *E. coli* é o trato gastrointestinal, porém muitos vegetais abrigam bastonetes Gram negativos como certos tipos de *Enterobacter*, mas que não possuem interesse em saúde pública. Já, para produtos de origem animal, os coliformes termotolerantes indicam a contaminação fecal (JAY, 2009). Quanto à maior quantidade de coliformes fecais, maior a chance de encontrar eventuais enteropatógenos como *E. coli* patogênica (WEESE; ROUSSEAU; ARROYO, 2005).

1.2.2 *Escherichia coli*

Diarréia em cães é um dos problemas mais comuns na clínica de animais pequenos e enteropatógenos bacterianos desempenham um papel importante em diversos casos. No entanto, muitos desses patógenos estão presentes na microbiota normal do animal o que dificulta a documentação clínica desses casos (MARKS; KATHER, 2003).

Segundo Beutin (1999), *E. coli* provoca doença gastrointestinal em cães jovens. Entre os cinco grupos de *E. coli* causadora de diarréia em humanos, as variantes ETEC e EPEC foram claramente associados com doença gastrointestinal em cães.

Cepas patogênicas de *E. coli* podem ser isolados em cães aparentemente saudáveis e em cães que manifestam sintomas graves como diarréia hemorrágica. A variação de sintomas depende também de presença de outros patógenos concomitantes como parvovirus, *C. perfringens* e parasitos intestinais, assim, a *E. coli* patogênica pode associar-se à essas infecções e causar complicações como septicemia (BEUTIN, 1999). Por conseguinte, é difícil determinar se *E. coli* pode ser considerado um patógeno primário. O tratamento para animais com diarréia causada por *E. coli* normalmente é apenas de suporte. O uso de antimicrobianos é recomendável em casos mais graves e em casos de septicemia (MARKS; KATHER, 2003).

A *E. coli* é um habitante comensal no trato intestinal de humanos e animais de homeotermos. Dentro das espécies de *E. coli*, algumas cepas são capazes de provocar infecções entéricas e infecções extra intestinais em várias espécies. Algumas dessas cepas podem ser transmitidas entre espécies, podendo ser patogênicas para uma espécie e não para a outra (BEUTIN, 1999).

Cães e gatos podem participar como fontes de infecção de *E. coli* para outros animais e para o homem. Achados indicam que cães assintomáticos podem ser portadores de variantes de *E. coli* patogênicas, incluindo a cepa O157:H7, e podem ser associados a casos e infecção em humanos (BEUTIN, 1999). Desse modo, os cães errantes têm a possibilidade de contaminar o ambiente em que se localizam ou também, infectar as pessoas que possuem contato direto com esses animais.

1.2.3 *Staphylococcus aureus*

As bactérias da espécie *Staphylococcus aureus* habitam a pele e mucosas do trato respiratório e intestino em humanos. Do mesmo modo, habitam a flora bacteriana das diferentes espécies de animais domésticos e silvestres (GERMANO, 2008).

Algumas variantes de *Staphylococcus aureus* produzem exotoxina durante seu crescimento em um meio de cultura favorável. A temperatura de crescimento do *S. aureus* é de 7°C a 47,8°C, porém as enterotoxinas são produzidas entre 10°C a 46°C. A quantidade mínima de enterotoxina necessária para causar doença em humanos é aproximadamente 20 ng, já o número de células de *S. aureus* mínimo para produzir esses níveis de enterotoxina é 10^4 UFC/g (JAY, 2009).

Experimentos revelaram que a administração intra intestinal do extrato de *Staphylococcus* produtor de toxina leva a enterite aguda em cães. Já, a administração contínua e por longos períodos leva a enterite crônica (KOCANDRLE; HOUTTUIN; PROHASKA, 1966).

Os autores Weese, Rousseau e Arroyo (2005) relatam que, em cães, *Staphylococcus aureus* têm menor importância em cargas de contaminação menores, mas podem causar doença nos cães quando há ambientes favoráveis

para sua multiplicação e produção de toxinas. No entanto, não se sabe exatamente qual é a quantidade mínima de enterotoxina para causar doença em cães.

1.3 Qualidade da alimentação servida a animais

O *Codex Alimentarius* estabelece um sistema de segurança alimentar para animais de produção, que abrange toda a cadeia alimentar, levando em conta aspectos relevantes da saúde dos animais e do meio ambiente, a fim de minimizar os riscos para a saúde dos consumidores. O objetivo deste código é para ajudar a garantir a segurança dos alimentos para consumo humano por meio de adesão a boas práticas de alimentação animal a nível agrícola e de boas práticas de fabricação (BPF) durante a aquisição, manuseio, armazenamento, processamento e distribuição de alimentos e ração para animais de produção (FAO/WHO, 2004). Desse modo, a FAO tem maior preocupação para com a alimentação de animais de produção, mas não há menção sobre animais de companhia.

Já o órgão dos Estados Unidos Food and Drug Administration (FDA), responsável por proteger e promover a saúde pública, exige em seu regulamento que todos os alimentos para animais, assim como alimentos humanos, devem ser seguros para o consumo. Os alimentos devem ser produzidos em condições sanitárias adequadas, não conter substâncias nocivas, além de não possuir microrganismos patogênicos (FDA, 2013).

Um dos fatores de risco para a saúde dos animais se refere à contaminação dos alimentos por fungos e outros microrganismos. Esta contaminação pode ocorrer desde a produção até o armazenamento da matéria prima. Um fator que pode comprometer a qualidade da ração é sua exposição ao ambiente que pode proporcionar o contato do alimento com veiculadores de microrganismos. De todo modo, a ausência de padrões microbiológicos para a

alimentação animal dificulta a análise sobre o possível risco que rações ou outros alimentos destinados à alimentação contaminados possam oferecer à saúde dos animais (GIRIO et al., 2012).

Em um estudo realizado por Weese, Rousseau e Arroyo (2005) foi feita a avaliação da qualidade microbiológica de alimentos comerciais para animais compostos por carne crua, devido ao aumento da demanda dos consumidores por esse tipo de alimentação para seus animais de estimação. Nesse estudo foram identificados coliformes totais e fecais, *E. coli*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Clostridium perfringens*. Além disso, os autores afirmam que a exposição dos animais por alimentos contaminados podem levar ao aparecimento de doença, principalmente infecções gastrointestinais por *E. coli* patogênica e por *Salmonella* spp. Para os humanos, o risco seria a exposição direta ou indireta pelo contato com esses animais.

Um estudo para o monitoramento da dinâmica populacional de cães errantes na CUASO (Cidade Universitária Armando de Salles Oliveira) identificou um voluntário que costuma alimentar diariamente os cães que habitam na reserva florestal da CUASO com restos de alimentos dos restaurantes locais. A estimativa é que haja 15 indivíduos adultos e não esterelizados. A reprodução desses animais acontece, mas poucos filhotes chegam à idade adulta, pois sua mortalidade é grande devido ao abandono pelas mães entre duas a três semanas após o parto e são expostos a diversos agentes infecciosos e parasitários. Não foram encontradas carcaças nem tocas nas observações feitas dentro da reserva em 2012, mas é possível que ocorra o infanticídio também. O comportamento desses cães é aversivo a humanos, pois foi moldado pelo oferecimento constante de comida dentro da reserva e assim, esses animais passam sua fase de sociabilização dentro da reserva e não são apresentados a estímulos que possam reduzir esse comportamento. Contudo, esses animais não são considerados

ferais, pois são dependentes de recursos oferecidos por humanos (DIAS, 2013 informação pessoal)³.

Assim, esse trabalho se dispôs a estudar a qualidade microbiológica desses alimentos oferecidos aos cães errantes da reserva florestal da CUASO.

³Informação fornecida por DIAS, R. A. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, recebida por <dias@vps.fmvz.usp.br> em 22 Julho de 2013

2 OBJETIVO

O trabalho tem como objetivo avaliar as condições microbiológicas dos alimentos fornecidos aos cães errantes da reserva florestal da CUASO.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Caracterização e coleta das amostras

Há cinco anos o voluntário realiza a distribuição de alimentos por diversos pontos na CUASO todos os dias de maneira sistemática. Entrou-se em contato com esse voluntário e foi pedido que, antes de colocar esses alimentos a disposição para os animais, fosse colhida uma porção desses alimentos para posterior análise. O voluntário relatou que os alimentos trazidos para os animais durante a semana são provenientes de dois restaurantes do campus. Assim, esses restos de pratos e sobras do *Buffet* do dia são recolhidos e colocados em uma sacola plástica como visto na figura 1. Esses alimentos não sofrem refrigeração e na maioria das vezes estão aquecidos por serem sobras dos *Buffets*.

Figura 1 -Sacola trazida pelo voluntário com os restos e algumas sobras dos restaurantes locais

Fonte: (ARELLANO, F. M. V., 2013)

Foram coletadas amostras por cinco dias durante a semana, e, em cada dia, eram colhidas seis porções distintas do *pool* de alimentos para tentar alcançar maior representatividade. Ao todo, foram seis amostras por dia em cinco dias totalizando 30 amostras.

Cada amostra foi colhida em sacolas plásticas próprias para acondicionamento de alimentos em freezer e a coleta foi feita com ajuda de luvas descartáveis. Essas amostras foram refrigeradas em caixa de isopor com gelo reutilizável e transportadas para o Laboratório de Higiene Alimentar FMVZ USP.

No laboratório, essas amostras foram congeladas para a posterior análise microbiológica.

As amostras eram escolhidas diferenciando a classe de alimento predominante na porção colhida. As coletas aleatórias eram compostas de um apanhado sem escolher os alimentos para a amostra.

Essa divisão foi:

Dia 1: 1.Carne bovina.

2. Filé de Frango.
3. Coxa e sobre coxa de frango com osso.
4. Recheio de carne desfiada de frango.
5. Arroz, feijão e batata frita.
6. Coleta aleatória

Dia 2: 7.Carne bovina fatiado

8. Croquetes de carne bovina.
9. Peixe assado com osso.
10. Ovo e frituras.
11. Arroz, feijão e batata frita.
12. Coleta aleatória.

Dia 3: 13. Carne bovina.

14. Medalhão de carne suína.

- 15. Carne temperada bovina.
- 16. Pastel frito com recheio.
- 17. Arroz, Feijão e purê de batata.
- 18. Coleta aleatória.

Dia 4: 19. Carne bovina.

- 20. Coxa de frango assado com osso.
- 21. Filé de frango.
- 22. Lasanha de presunto e queijo.
- 23. Arroz, feijão e batata frita.
- 24. Coleta aleatória.

Dia 5: 25. Carne bovina assada.

- 26. Almôndega de carne.
- 27. Carne bovina assada e almôndega de carne.
- 28. Macarrão.
- 29. Arroz, feijão e batata frita.
- 30. Coleta aleatória.

Para fins de comparação, essas amostras foram divididas em dois grupos:

- Produtos a base de carnes, pescados, ovos e similares:

Amostras: 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15, 19, 20, 21, 25, 26, 27.

- Outros

Amostras: 5, 6, 11, 12, 16, 17, 18, 22, 23, 24, 28, 29, 30.

3.2 Preparo das amostras

As amostras foram descongeladas em geladeira por 24h e então quatro porções de 25 g foram pesadas em saco de Stomacher® para homogeneização em meio específico, segundo a análise a ser realizada.

O conteúdo de cada saco foi homogeneizado com o auxílio do homogeneizador de laboratório Stomacher® por 60 segundos.

3.2.1 Análises quantitativas

Uma porção de 25 g da amostra foi homogeneizada com 225 mL de água peptonada 0,1% e, a partir daí, diluições decimais e seriadas foram preparadas até a diluição 10^{-7} .

A técnica do Número Mais Provável (NMP) foi empregada para a pesquisa de coliformes, segundo Brasil (2003). Para a prova presuntiva, usou-se caldo Lauril com tubo de Durham invertido (incubação 36°C/48h). Os tubos positivos foram confirmados para Coliformes Totais, em ágar Levine (36°C/48h), e para Coliformes Fecais, em caldo EC com tubos de Durham invertido (45°C/48h). Foram anotados os tubos positivos e, com o auxílio da tabela do NMP, feita a expressão do resultado em NMP/g de cada um desses grupos.

Para a análise de *Staphylococcus* coagulase positiva, as diluições foram semeadas em duplicata na superfície do ágar Baird Parker (36°C/48h). Foram registrados os números de colônias típicas (T) e atípicas (AT) na diluição que apresentou entre 20 e 200 UFC. Cinco colônias (entre T e AT) foram cultivadas individualmente em caldo BHI (36°C/24h) para prova da coagulase (36°C/6h ou 24h). Por regra de três, o número de UFC/g foi calculado.

Os dados de quantificação de coliformes totais, coliformes fecais e *Staphylococcus* coagulase positiva foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov. Nos dados de distribuição normal, usou-se o teste T de Student para comparar os dados entre os grupos de alimentos “cárneos” e “outros”. Nos dados não normais, utilizou-se o método Mann-Whitney. Empregou-se nesses testes o software MINITAB 16, IC=95%.

3.2.2 Análises qualitativas

Uma porção de 25 g da amostra foi homogeneizada em 225 mL caldo de enriquecimento específico, segundo o agente a ser pesquisado.

Salmonella spp.: pré-enriquecimento em água peptonada a 1% (36°C/24h) seguido de enriquecimento seletivo em caldo Rappaport Vassiliadis e caldo Selenito Cistina (ambos a 41°C em banho-maria por 24h). O isolamento foi feito em ágar BVB e ágar SS (36°C/24 h). Confirmação em ágar TSI (36°C/24h) seguido de prova de aglutinação, usando anti-soro polivalente (anti-O e anti-H) (BRASIL, 2003).

Listeria monocytogenes: enriquecimento seletivo feito em duas etapas: primeiro em caldo LEB (30°C/24h) seguido de caldo Fraser (30°C/24h). O isolamento foi feito em placas com meio ALOA® (30°C/48h) (BRASIL, 2003). Uma colônia de cada placa de ALOA® foi semeada em tubos contendo o meio TSA (37°C/24h) e posteriormente foi submetida a metodologia molecular que será descrita a seguir.

A extração do DNA total foi realizada segundo protocolo de Chapman et al. (2001) por meio de choque térmico. Os isolados foram semeados em 2mL de caldo BHI e incubados a 37 °C por 24 horas. O conteúdo foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e centrifugado a 12.000 rpm por 10 minutos a 24°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado com 1mL de água MilliQ® estéril. O material homogeneizado foi centrifugado a 12.000 rpm a 24°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado novamente e o *pellet* ressuscitado com 200µl de água MilliQ® estéril. A suspensão foi colocada em banho-maria a 95°C por 10 minutos, e, posteriormente acomodada em freezer a -20°C por 30 minutos, para a liberação do DNA. Os microtubos foram retirados do freezer e descongelados em temperatura ambiente. Os microtubos foram novamente centrifugados a 12.000 rpm a 24°C por 10 minutos. Desse modo, aproximadamente 200µl do sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo microtubo de 1,5 mL, armazenado a -20°C.

Para a confirmação do gênero *Listeria* foi feita a amplificação do gene *prs*. Assim, foram utilizados os iniciadores expostos por Doumith et al. (2004) para amplificação de um fragmento gênico de, aproximadamente, 370 pb. Além disso, foi realizada a pesquisa do gene de virulência *hly* com os iniciadores propostos por Border et al. (1990) para amplificação de um fragmento de, aproximadamente, 170pb. Para o mix da PCR com volume final de 25 µL, foi utilizado: 5 µL de DNA

genômico, tampão de reação 10X; 1,5 mM cloreto de Magnésio; 200 µM de desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP); 200 µM de cada um dos iniciadores; 1,25 U de Taq-DNA-polimerase e água deionizada MilliQ® estéril.

As reações de PCR foram realizadas com um ciclo inicial de 94°C por 2 minutos, 35 ciclos de 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, além de um ciclo de extensão final de 72°C por 5 minutos.

Para o controle positivo nas reações de PCR foram utilizadas as cepas de *L. monocytogenes* ATCC 19115 e ATCC 19111.

Finalmente, para visualização dos produtos obtidos nas reações de PCR, estes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% preparado com tampão e corado com brometo de etídio. Os marcadores de peso molecular utilizados foram de 100 pb da Invitrogen® no gel do *hly* e 1kb plus no do *prs*. Ao final da corrida os fragmentos foram visualizados em luz ultravioleta e fotodocumentados.

Mycobacterium spp.: foi feita uma adaptação da metodologia usada para material clínico, introduzindo uma etapa de enriquecimento da amostra, proposta por AGUNSO (2013): o caldo enriquecimento foi MGIT modificado, em que o meio base7H9 foi adicionado de piruvato (ao invés do glicerol) e a mistura de antibióticos foi produzida no laboratório que é composta por: Polimixina B= 0,0038g, Anfotericina B= 0,0006g, Ácido nalidíxico= 0,0024g, Trimetoprim= 0,0024g, diluídos em 3 mL de água destilada e filtrados no meio (ao invés da mistura comercial PANTA). Nesse enriquecimento a amostra foi incubada a 36 ± 1°C por 72h. O isolamento foi feito em duplicata em meio Stonebrink-Leslie, também acrescido da mistura de antibióticos usada no enriquecimento. As colônias sugestivas foram submetidas à coloração Ziehl-Neelsen e uma vez confirmadas como bacilos álcool ácido resistentes (BAAR), foram cultivadas em Stonebrink-Leslie para posterior teste molecular, visando avaliar se pertencia ao complexo *M. tuberculosis* pela técnica TB Multiplex-PCR.

A extração e purificação do DNA foi realizada segundo o protocolo de Bemer-Melchior e Drugeon (1999) e Kremer et al. (1999). Foi retirada uma alçada de massa bacteriana e transferida para tubos contendo a solução tampão (10 mM Tris-HCl e 1mM EDTA pH 8). Para a inativação dos bacilos, foi incubada a amostra a 80°C por

20 minutos, e, logo após, adicionou-se 50 µL de lisozima e foi armazenado a 37°C *overnight*. Após esse período, acrescentou-se 5 µL de proteinase K 10 mg/ mL e 70 µL SDS (10%), que foi incubado a 65°C por 10 minutos. Adicionou-se 100 µL de NaCl (5M) e 100 µL de solução CTAB/NaCl (4,1 g NaCl e 10 g CTAB em 100 ml de H₂O) pré aquecida a 65 °C, foi homogeneizado e incubado a 65°C por 10 minutos. Em seguida foi acrescentado 750 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (proporção 24:1), agitado e centrifugado a 12.000 rpm por 7 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de microcentrifuga e o DNA foi precipitado com 450 µL isopropanol e resfriado a -20 °C por 30 minutos. Uma nova centrifugação foi realizada a 12.000 rpm por 15 minutos, desprezando-se o sobrenadante. O sedimento foi lavado com etanol 70% resfriado e foi centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos desprezando-se o sobrenadante novamente. A amostra com o sedimento foi colocado em banho seco a 56°C por 10 minutos e o sedimento seco foi suspenso com 50 µL de TE. A amostra foi armazenada a -20°C.

Após, foi realizada a amplificação de DNA. Executou-se a técnica de Reação TB Multiplex-PCR adaptada de Wilton e Cousins (1992). Para o mix da PCR com volume final de 25 µL, foram utilizados: 2,5 µL do DNA genômico, 1x PCR Buffer, 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), 1,5 mM de Cloreto de Magnésio, 1,5 U de Taq polimerase, água deionizada MilliQ® esteril e 0,12 µM dos primers: MYCGEN-F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), MYCGEN-R (5'-TGCACACAGGCCACAAGGGA-3'), MYCAV-R (5'-ACCAGAAGACATGCGTCTTG-3'), MYCINT-F (5'-CCTTTAGGCGCATGTCTTTA-3'), TB1-F (5'-GAACAATCCGGAGTTGACAA-3') e TB1-R (5'-AGCACGCTGTCAATCATGTA-3').

As reações de PCR foram realizadas com um ciclo inicial de 94°C por 10 minutos, 61°C por 2 minutos, 72°C por 3 minutos, 33 ciclos de 94°C por 30 segundos, 61 °C por 2 minutos, 72°C por 3 minutos, ainda um ciclo de 94°C por 30 minutos, 61°C por 2 minutos e 72°C por 20 minutos.

Para visualização dos produtos obtidos nas reações de PCR, estes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Para a corrida do gel misturou-se 5 µL dos produtos amplificados com o corante azul de bromofenol. Usou-se como

referencia o DNA ladder de 100 pb e 50 pb. Por fim, o gel de corrida foi corado com GelRed™ e fotodocumentado.

Durante o processo foram tomadas precauções para se evitar a contaminação de utensílios e equipamentos de laboratório, e também, houve a inclusão de controles negativos e controle positivo (cepa de referência AN5 *Mycobacterium bovis* cedida pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas).

4 RESULTADOS

A tabela 1 contém os resultados encontrados para Coliformes totais, fecais (ou termotolerantes) em Log NMP/g e *Staphylococcus* coagulase positiva em Log UFC/g. Ressalta-se que os valores expressos como $<2,0$ Log UFC/g de *Staphylococcus* coagulase positiva referem-se ao limite mínimo da técnica e indicam ausência de crescimento do agente nessas amostras. Para fins estatísticos, esses valores foram considerados como 0 (zero). Uma amostra apresentou coliformes totais $>7,0$ LogNMP/g, indicando que o número excedeu a expectativa do plano de análise, resultando positivos todos os tubos na máxima diluição realizada; para fins estatísticos foi considerado o valor pontual de 7,0 Log NMP/g.

Para coliformes totais (Log NMP/g) nas amostras de produtos cárneos a mediana foi 4,0, variando de 2,4 até $>7,0$, e para o grupo de outros alimentos a mediana foi 3,4 variando de 2,0 até 5,7. Para os coliformes termotolerantes (Log NMP/g) nas amostras de produtos cárneos a mediana foi 3,4, variando de 1,2 até 7,0; e para o grupo de outros alimentos a mediana foi 3,3, variando de 1,0 até 5,7. Para *Staphylococcus* coagulase positiva (Log UFC/g) nas amostras de produtos cárneos a mediana foi $<2,0$ e o valor máximo foi 5,4; e para o grupo de outros alimentos a mediana foi $<2,0$ e o valor máximo 5,8.

Os dados de coliformes totais e fecais apresentaram distribuição normal e os de estafilococos não. Os testes mostraram que não houve diferença entre os grupos de alimentos “produtos cárneos” e “outros”.

O resultado para *Salmonella* spp. foi ausência em 25g de todas as amostras.

Em 10 amostras foram isoladas colônias azul esverdeadas com presença de halo opaco, sugestivas de *L. monocytogenes* no ágar ALOA®.

Uma colônia de cada amostra foi então submetida à pesquisa dos genes *prf* e *hly*. Todas as colônias apresentaram a presença dos dois genes, como pode ser visto nas figuras 2 e 3.

A presença do gene *prs* confirma o gênero *Listeria* enquanto a detecção do gene *hly* (hemolisina) está presente tanto na espécie *L. monocytogenes* quanto na *L. ivanovii*. Mas, considerando o histórico dos isolados (provenientes de amostras de alimento), as características fenotípicas no cultivo em ALOA® e a presença do gene *hly*, assume-se que sejam isolados de *L. monocytogenes* (ROSSEN et al., 1991; GUERRA; MCLAUCHLIN; BERNARDO, 2001; GEBRETSADIK et al., 2011; SYNE; RAMSUBHAG; ADESIYUN, 2011). Assim, 33,3% das amostras (10/30) foram positivas para *L. monocytogenes* em 25g. Cinco dessas amostras positivas pertenciam ao grupo de produtos cárneos e as outras cinco pertenciam ao grupo de outros alimentos.

Trinta por cento das amostras submetidas à pesquisa de *Mycobacterium* (9/30) foram perdidas por contaminação.

Observou-se a presença de BAAR em 13,3% (4/30) das amostras, mas apenas uma colônia resultou positiva na avaliação molecular feita pelo PCR TB Multiplex, tendo sido identificado o gene para o gênero, mas não os genes das espécies pesquisadas (Figura 4). Assim, esse isolado é caracterizado como *Mycobacterium* spp. não pertencente aos complexos *M. tuberculosis* (o qual estão inclusos o *M. bovis* e o *M. tuberculosis*) e *M. avium-intracellulare*. A amostra positiva pertence ao grupo de alimentos de produtos cárneos.

Tabela 1 - Resultados do Log NMP/g de Coliformes totais, termotolerantes e Log de UFC/g de *Staphylococcus* coagulase positiva e os valores média, desvio padrão e mediana, valor mínimo e máximo de cada dos grupos de produtos cárneos e outros alimentos - São Paulo - abril de 2013.

	Amostra	Coliformes totais (Log NMP/g)	Coliformes Termotolerantes (Log NMP/g)	<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva (Log UFC/g)
Produtos Cárneos	1	4,0	3,7	<2,0*
	2	4,0	4,0	4,2
	3	4,7	4,7	<2,0*
	4	5,4	4,2	<2,0*
	7	3,7	2,9	<2,0*
	8	2,7	2,7	<2,0*
	9	4,4	2,5	<2,0*
	10	4,4	4,4	<2,0*
	13	3,4	3,4	<2,0*
	14	3,2	3,0	<2,0*
	15	3,7	3,2	<2,0*
	19	2,4	2,0	1,7
	20	2,7	2,2	4,2
	21	3,4	1,2	<2,0*
	25	>7,0**	7,0	<2,0*
	26	4,0	3,7	<2,0*
	27	6,0	6,0	5,4
	Média	4,1	3,6	0,9
	Desvio padrão	1,22	1,46	1,83
	Mediana	4,0	3,4	<2,0*
	Valor máximo	>7,0	7,0	5,4
	Valor mínimo	2,4	1,2	<2,0*
Outros	5	5,0	3,3	<2,0*
	6	5,6	5,0	<2,0*
	11	3,0	2,5	<2,0*
	12	3,4	3,4	<2,0*
	16	2,0	2,0	<2,0*
	17	3,0	2,6	2,0
	18	4,0	4,0	<2,0*
	22	2,2	1,0	<2,0*
	23	3,4	2,0	<2,0*
	24	4,0	2,4	<2,0*
	28	4,4	4,4	4,5
	29	3,3	3,3	5,8
	30	5,7	5,7	5,4
	Média	3,8	3,2	1,5
	Desvio padrão	1,17	1,32	2,27
	Mediana	3,4	3,3	<2,0*
	Valor máximo	5,7	5,7	5,8
	Valor mínimo	2,0	1,0	<2,0*

*indica contaminação abaixo do limite mínimo de quantificação da técnica empregada

**indica que a contaminação excedeu ao limite máximo de quantificação da técnica empregada

Figura 2 - Gel de agarose 1,5% da PCR para gene *prs* das amostras sugestivas de *L. monocytogenes* no ágar ALOA® - São Paulo - junho de 2013

Fonte: (ARELLANO, F. M. V., 2013)

Legenda: Colunas 1 – 10: PCR para gene *prs* das amostras sugestivas de *L. monocytogenes* no ágar ALOA®. Colunas 11 e 12: controles positivos. M: marcador de peso molecular 1kb plus (Fermentas).

Figura 3 – Gel de agarose 1,5% da PCR para gene *hly* das amostras sugestivas de *L. monocytogenes* no ágar ALOA - São Paulo - junho de 2013

Fonte: (ARELLANO, F. M. V., 2013)

Legenda: Colunas 1 – 10: PCR para gene *hly* das amostras sugestivas de *L. monocytogenes* no ágar ALOA®. Colunas 11 e 12: controles positivos. Coluna 13: controle negativo. M: marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen).

Figura 4 – Gel de agarose 1,5% da PCR Multiplex das amostras que continham BAAR - São Paulo - maio de 2013

Fonte: (ARELLANO, F. M. V., 2013)

Legenda: Coluna AN5: controle positivo. Colunas 7, 7A, 8B, 21.1, 21.2, 22.1, 22.2: amostras negativas. Coluna 8: amostra positiva. M: marcador de peso molecular de 100 pb (DNA ladder).

5 DISCUSSÃO

A qualidade higiênico-sanitária dos dois grupos de alimentos, avaliada pela carga contaminante de coliformes e *Staphylococcus* coagulase positivo, foi semelhante e isso provavelmente se justifica pela condição em que foram encontrados no momento da coleta, ou seja, misturados, o que favorece a contaminação cruzada.

Mas é difícil interpretar os resultados obtidos em função de não haver parâmetros específicos para avaliar a qualidade higiênico-sanitária de alimentação para cães, bem como pela pouca investigação epidemiológica de doenças de transmissão alimentar em cães. Enquanto a ciência se desenvolve nesse tema e até haja critérios de julgamento específicos, talvez seja razoável adotar o conceito do FDA (2013) de que os alimentos destinados aos animais devam ter condições sanitárias adequadas, não ter substâncias nocivas ou microrganismos patogênicos, e assim, por analogia, julgá-los com base na legislação adotada para alimentação humana.

Desta forma, foi utilizada para fins de discussão dos resultados a RDC 12 (BRASIL, 2001), que no item: 22-PRATOS PRONTOS PARA O CONSUMO (ALIMENTOS PRONTOS DE COZINHAS, RESTAURANTES E SIMILARES) estabelece que produtos "à base de carnes, pescados, ovos e similares cozidos", o valor máximo para coliformes fecais é 20/g (1,3 Log/g) e para estafilococos coagulase positivo, 1000/g (3,0 Log/g). Já para o grupo de alimentos "à base de cereais, farinhas, grãos e similares; saladas mistas, temperadas ou não, com ou sem molho, exceção das adicionadas de molho de maionese e similares", o valor máximo para coliformes fecais é de 100/g (2,0 Log/g) e para estafilococos coagulase positivo, 1000/g (3,0 Log/g).

Os parâmetros da RDC para coliformes fecais são mais baixos que os valores médios encontrados nesta pesquisa para tanto para "produtos cárneos" quanto para "outros", evidenciando a baixa qualidade sanitária do alimento. Pela RDC 12 de 2001, resultados acima dos limites estabelecidos classificam o

produto como “em condições sanitárias insatisfatórias”. Estão nessa condição, quanto aos coliformes fecais, 94,1% (16/17) das amostras do grupo "Produtos Cárneos" e 76,9% (10/13) das amostras do grupo "Outros".

Ressalta-se que quanto maior a carga desses agentes, maior a chance de ter alguma cepa de *E. coli* patogênica, bem como de outros enteropatógenos (WEESE; ROUSSEAU; ARROYO, 2005; JAY, 2009).

Já a carga de coliformes totais média sugere baixa condição higiênica geral do alimento (JAY, 2009), mas não há parâmetro para esse grupo de microrganismos na RDC 12 porque não apresenta relação direta com potencial comprometimento à saúde.

Quanto ao *Staphylococcus* coagulase positiva, observa-se que a maioria das amostras apresentaram contagens abaixo do limite de detecção da técnica, o que é surpreendente, considerando que os alimentos provêm de sobras de *Buffet* e restos de comensais. Seria esperada uma alta contaminação devido ao hábito das pessoas conversarem sobre os alimentos enquanto se servem e comem, o que possibilita a contaminação através de gotículas de saliva, espirros etc. Foram classificados como produtos em condições sanitárias insatisfatórias quanto à esse agente, 17,6% (3/17) das amostras do grupo "Produtos Cárneos" e 23,1% (3/13) das amostras do grupo "Outros".

A ausência de *Salmonella* spp. pode ser explicada pela combinação dos fatos de que os alimentos eram na sua maioria cozidos, o que causaria uma redução do número de células viáveis que eventualmente estivessem presentes nas matérias primas empregadas na produção desses alimentos.

A detecção de *Listeria monocytogenes* em 33% das amostras é preocupante e pode estar contribuindo para a manutenção da população estável desses cães no campus da CUASO, conforme observado por Dias et al. (2013), já que os principais sintomas quando acomete fêmeas grávidas, pelo menos em seres humanos, é aborto, nascimento prematuro ou natimortalidade (JAY, 2009).

Com relação à pesquisa de *Mycobacterium* spp., houve elevada presença de microrganismos contaminantes, com uma perda significativa das amostras. Os

meios seletivos não foram suficientes para impedir o crescimento desses outros microrganismos indesejáveis. Isso também foi observado por Agunso (2013) que testou meios de enriquecimento seletivo para o isolamento de *Mycobacterium bovis* em lácteos. Existem diversos protocolos de descontaminação de amostras, mas a utilização desses métodos pode diminuir a viabilidade de *Mycobacterium* spp. e dificultar sua detecção, razão pela qual não foi empregado nesta pesquisa, já que é esperado que o microrganismo esteja em números bastante reduzidos em alimentos (COLLINS; GRANGE, 1983; CORNER; TRAJSTMAN, 1988).

Apenas uma amostra do grupo de produtos cárneos apresentou *Mycobacterium* spp., mas não do complexo *M. tuberculosis*, o que era esperado. À luz do conhecimento atual, o achado de micobactérias não tuberculosas em alimentos não tem importância epidemiológica. É importante considerar, no entanto, que as infecções por micobactérias não tuberculosas causam morbidade e mortalidade em pessoas (e talvez os animais) que possuem o sistema imunológico comprometido e a potencial contribuição dos alimentos como fonte de infecção tem ganhado importância (YODER et al., 1999; KONUK et al., 2007).

Existem poucos artigos sobre a qualidade microbiológica dos alimentos fornecidos a cães. No entanto, não foram achados trabalhos que avaliem a condição de alimentos provenientes de das sobras e restos da alimentação humana.

No estudo de Girio et al. (2012), realizado em Jaboticabal – São Paulo, comparou a qualidade microbiológica de rações de embalagem fechada e rações vendidas a granel. Em sua pesquisa, foram colhidas amostras de 15 marcas de ração para cães comercializadas no comércio varejista. De cada marca foram colhidas 2 embalagens fechadas de ração e 2 amostras de 1 kg da mesma ração comercializada a granel, totalizando 60 amostras. Em 7% das amostras de ração fechada foram achados 3-100 (NMP/g) coliformes termotolerantes e em 93% <3 (NMP/g). E para as rações comercializadas a granel em 94% das amostras foi <3 (NMP/g), em 3% 3-100 (NPG/g) e em 3% foi >100 (NPG/g). Nas embalagens vendidas a granel a contaminação por esse grupo de microrganismos foi maior. Além disso, não foram isolados microrganismos do gênero *Salmonella* nas rações

comercializadas tanto para embalagens fechadas quanto para as rações comercializadas a granel. Possivelmente, o processo de industrialização desses produtos dificulta a sobrevivência por bactérias ambientais além da baixa atividade de água, que também limita o crescimento desses microrganismos.

Já o trabalho de Weese, Rousseau e Arroyo (2005), realizado em Ontário – Canadá - se propôs a analisar dietas comerciais com carne crua. Nesse estudo foram encontrados coliformes totais (NMP/g) variando de $3,5 \times 10^3$ até $9,4 \times 10^6$, *Salmonella* spp. foi identificada em 20% (5/25) e *Staphylococcus aureus* foi isolado em 4% (1/25) das amostras. O autor discutiu que não se sabe ao certo o risco que esses microrganismos podem causar aos animais, mas que a sua presença indica níveis de sanitários inadequados e a presença de *Salmonella* spp. pode indicar um risco da infecção subclínica com a eliminação do agente pelas fezes dos animais e também pelo risco de contaminação do ser humano ao manipular esses alimentos.

Sumarizando, se a qualidade dos produtos destinados à alimentação animal fosse regulamentada, e tivesse o mesmo critério de aceitabilidade estabelecido para a alimentação humana (usando a RDC 12 como referência), apenas 13% (4/30) das amostras atenderiam os requisitos legais, 5,9% (1/17) do grupo “Produtos Cárneos” e 23,1% (3/13) do grupo “outros”. Nesse cenário, constatou-se a frequente exposição dos animais à alimentos em condições insatisfatórias de consumo.

Verificamos na literatura que os agentes pesquisados e encontrados têm potencial para causar doença nos cães (SCHROEDER; VAN RENSBURG, 1993; BEUTIN, 1999; ERWIN et al., 2004; WEESE; ROUSSEAU; ARROYO, 2005; FINLEY; REID-SMITH; WEESE, 2006) que habitam na reserva florestal. Na situação observada, é difícil estimar o risco que esses alimentos trazem a esses animais, mas nessas condições, nas quais os alimentos ficam a disposição a temperatura ambiente por horas até o consumo esporádico pelos animais, há o favorecimento da multiplicação dos agentes encontrados (JAY, 2009).

Assim, mais estudos são necessários sobre o assunto, visto a escassez de informações sobre parâmetros de qualidade para alimentos destinado ao

consumo animal (GIRIO et al., 2012). Seria de interesse verificar se esses animais são portadores e excretam os patógenos encontrados pelas fezes (LENZ et al., 2009).

Vale ressaltar que o voluntário que traz os alimentos em questão do presente trabalho, crê que sem essa intervenção os animais podem morrer de fome, adoecer ou competir por alimentos encontrados, o que poderia causar brigas, e por isso, ele mantém sua rotina diária de alimentá-los há 10 anos. Seu comportamento parece estar reforçado na crença de que alimentar os animais de estimação com restos de alimentação humana é uma forma de dar afeto e uma maneira de dar tratamento especial ao animal (CASE et al., 2011).

De qualquer modo, é fundamental orientar a comunidade, inclusive voluntários e protetores de animais para trabalhar sobre a questão de alimentação adequadas aos animais (DIAS et al., 2013). Do ponto de vista nutricional, restos de alimentação humana não oferecem os nutrientes de forma equilibrada para um cão ou gato. Se animais forem alimentados com restos de alimentação humana, essas sobras não devem ultrapassar de 5 a 10% da ingestão calórica diária, pois altas proporções desses alimentos podem causar danos à saúde dos animais (CASE et al., 2011) e do ponto de vista de saúde animal, podem transmitir patógenos. Esse aspecto é pouco estudado, mas não é pouco relevante.

Finalmente, é de interesse fazer a captura dos cães para realização da castração e verificar as condições de saúde desses animais e, além disso, é de suma importância trabalhar a posse responsável, para evitar o abandono de cães no campus.

7 CONCLUSÃO

Nas condições do estudo, de modo geral os alimentos ofertados aos cães apresentaram características microbiológicas insatisfatórias, se analisadas sob a perspectiva de que os animais têm direito a uma alimentação segura, e utilizando-se os padrões microbiológicos da legislação para alimentação humana.

De todo modo, a ausência de padrões microbiológicos para a alimentação em animais de estimação dificulta a interpretação dos resultados obtidos.

REFERÊNCIAS

AMAKU, M.; DIAS, R. A.; FERREIRA, F. Dinâmica populacional canina: potenciais efeitos de campanhas de esterilização. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 25, n. 4, p. 300–304, 2009.

AGUNSO, C. N. **Enriquecimento seletivo para pesquisa de Mycobacterium bovis em leite e queijo**. 2013. 41 f. Dissertação. (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2013.

BECK, A. M. **The ecology of stray dogs**: a study of free-ranging urban animals. West Lafayette: Purdue University Press, 1973. 98p.

BEMER-MELCHIOR, P.; DRUGEON, H. B. Inactivation of Mycobacterium tuberculosis for DNA typing analysis. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 7, p. 2350-2351, 1999.

BEUTIN, L. Escherichia coli as a pathogen in dogs and cats. **Veterinary Research**, v. 30, p. 285–298, 1999.

BORDER, P. M.; HOWARD, J. J.; PLASTROW, G. S.; SIGGENS, K. W. Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, v. 11, p. 158-162, 1990.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para o Controle de produtos de Origem Animal e Água. **Diário Oficial da União** [República Federativa do Brasil], Brasília DF, 18 set. 2003. Seção 1, p. 14. Disponível em: <sislegis.action.detalhaAto.do?method=consultarLegislacaoFederal>. Acesso em: 16 jun. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. RDC n. 12 de 02 de janeiro de 2001. Aprova regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União** [República Federativa do Brasil], Brasília DF, 10 jan. 2001. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis/>>. Acesso em: 16 jun. 2013.

CASE, L. P.; DARISTOTLE, L.; HAYEK, M. G.; RAASCH, M. F. **Canine and Feline Nutrition**. 3 ed. Saint Louis, Mosby Elsevier, 2011, p. 277–294.

CHAPMAN, P. A.; ELLIN, M.; ASHTON, R.; SHAFIQUE, W. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. **International Journal of Food Microbiology**, n. 68, p. 11-20, 2001.

CHOUMAN, K.; PONSANO, E. H. G.; MICHELIN, A. F. Qualidade microbiológica de alimentos servidos em restaurantes self-service. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69 n. 2, p. 261-266, 2010.

CINQUEPALMI, V.; MONNO, R.; FUMAROLA, L.; VENTRELLA, G.; CALIA, C.; GRECO, M. F.; DE VITO, D.; SOLEO, L. Environmental contamination by dog's faeces: a public health problem? **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 10, n. 1, p. 72-84, 2013.

COLLINS, C. H.; GRANGE, J. M. The bovine tubercle bacillus. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 55, p. 13-29, 1983.

CORNER, A.; TRAJSTMAN, A. C. An evaluation of 1-hexadecylpyridinium chloride as a decontaminant in the primary isolation of mycobacterium boris from bovine lesions. **Veterinary Microbiology**, v. 18, p. 127-134, 1988.

DIAS, R. A.; GUILLOUX, A. G.; BORBA, M. R.; GUARNIERI, M. C.; PRIST, R.; FERREIRA, F.; AMAKU, M.; NETO, J. S.; STEVENSON, M. Size and spatial distribution of stray dog population in the University of São Paulo campus, Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 110, n. 2, p. 263-273, 2013.

DOUMITH, M.; CAZALET, C.; SIMOES, N.; FRANGEUL, L.; JACQUET, C.; KUNST, F.; MARTIN, P.; COSSART, P.; GLASER, P.; BUCHRIESER, C. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. **Infection and Immunity**, v. 72, p. 1072-1083, 2004.

ERWIN, P. C.; BEMIS, D. A.; MAWBY, D.; MCCOMBS, S. B.; SHEELER, L. L.; HIMELRIGHT, I. M.; HALFORD, S. K.; DIEM, L.; METCHOCK, B.; JONES, T. F.; SCHILLING, M. G.; THOMSEN, B. V. *Mycobacterium tuberculosis* transmission from human to canine. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 2, p. 2258-2259, 2004.

FAO/WHO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION FOR THE UNITED NATIONS / WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Codex alimentarius**: Code of Practice on Good Animal Feeding. Rome, 2004. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/012/i1379e/i1379e06.pdf>>. Acesso em: 24 jul. 2013.

FDA. U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Animal food**: pet food. Disponível em: <<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/Products/AnimalFoodFeeds/PetFood/default.htm>>. Acesso em: 06 jul. 2013.

FINLEY, R.; REID-SMITH, R.; WEESE, J. S. Human health implications of salmonella-contaminated natural pet treats and raw pet food. **Clinical Infectious Disease**, v. 42 n. 5, p. 686-69, 2006.

GEBRETSADIK, S.; KASSA, T.; ALEMAYEHU, H.; HURUY, K.; KEBEDE, N. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* and other *Listeria*

species in foods of animal origin in Addis Ababa, Ethiopia. **Journal of Infection and Public Health**, v. 4, n. 1, p. 22–29, 2011.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 3. ed. Barueri, SP: Manole, 2008.

GUERRA, M. M.; MCLAUCHLIN, J.; BERNARDO, F. A. *Listeria* in ready-to-eat and unprocessed foods produced in Portugal. **Food Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 423–429, 2001.

GIRIO, T. M. S.; NADER FILHO, A.; ROSSI JUNIOR, O. D.; AMARAL, L. A.; GIRIO, R. J. S. Qualidade microbiológica de rações para cães comercializadas no varejo em embalagens e a granel. **Ars Veterinaria**, v. 28, n. 1, p. 36-40, 2012.

HARDY, J.; MARGOLIS, J. J.; CONTAG, C. H. Induced biliary excretion of *Listeria monocytogenes*. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 3, p.1819-1827, 2006.

INSTITUTO PASTEUR. **Controle de populações de animais de estimação**. São Paulo: Instituto Pasteur, 2000. Manual técnico.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

KOCABIYIK, A. L.; ÇETIN, C.; ÖZAKIN, C. Faecal carriage of *Listeria monocytogenes* in stray dogs in bursa province, Turkey. **Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences**, v. 29, p. 1357-1359, 2005.

KOCANDRLE, V.; HOUTTUIN, E.; PROHASKA, J. V. Acute hemodynamic and gastrointestinal changes produced by staphylococcal exotoxin and enterotoxin in dogs. **Journal of Surgical Research**, v. 6, n. 2, p. 50–57, 1966.

KONUK, M.; KORCAN, E.; DULGERBAKI, S.; ALTINDIS, M. Isolation and Identification of Mycobacteria from raw milk samples in Afyonkarahisar district of Turkey. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, n. 3, p.343-347, 2007.

KREMER, K.; VAN SOOLINGEN, D.; FROTHINGHAM, R.; HAAS, W. H.; HERMANS P. W. M.; MARTÍN, C.; PALITTAPONGARNPIM, P.; PLIKAYTIS, B. B.; RILEY, L. W.; YAKRUS, M. A.; MUSSER, J. M.; VAN EMBDEN, J. D. A. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 37, n. 8, p. 2607-2618, 1999.

LÄIKKÖ, T.; BÅVERUD, V.; DANIELSSON-THAM, M.L.; FRIDÉN, S.; GRIP HANSSON, A.; THAM, W. Canine tonsillitis associated with *Listeria monocytogenes*. **Veterinary Record**, v. 154, p.732, 2004.

LENZ, J.; JOFFE, D.; KAUFFMAN, M.; ZHANG, Y.; LEJEUNE, J. Perceptions, practices, and consequences associated with foodborne pathogens and the

feeding of raw meat to dogs. **Canadian Veterinary Journal**, v. 50, n. 6, p. 637–643, 2009.

MARIEN, M.; DECOSTERE, A.; WERBROUCK, H.; VAN COILLIE, E.; PAEPE, D.; MOYAERT, H.; PASMANS, F.; DAMINET, S.; HAESEBROUCK, F. Isolation of *Listeria monocytogenes* from the gallbladder of a dog with liver insufficiency. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, v.76,n. 5, p. 352-354, 2007.

MARKS, S. L.; KATHER, E. J. Bacterial-associated diarrhea in the dog: a critical appraisal. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 33, n. 5, p. 1029–1060, 2003.

MARKS, S.L.; RANKIN, S.C.; BYRNE, B.A.; WEESE, J.S. Enteropathogenic bacteria in dogs and cats: diagnosis, epidemiology, treatment, and control. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n. 6, p. 1195–1208, 2011.

MCLAUCHLIN, J.; MITCHELL, R. T.; SMERDON, W. J.; JEWELL, K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 92, n. 1, p. 15–33, 2004.

MEGID, J.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; DOS REIS, A. C. F.; STURION, D. J.; MARTIN, L. M. M.; PINHEIRO, S. R. Tuberculose canina e sua importância em saúde pública. **Revista de Saúde Pública**, v. 28, n. 4, p. 309-310, 1994.

MORSE, E. V.; DUNCAN, M. A.; ESTEP, D. A.; RIGGS, W. A.; BLACKBURN, B. O. Canine salmonellosis: a review and report of dog to child transmission of *Salmonella enteritidis*. **American Journal of Public Health**, v. 66, n. 1, p. 82-84, 1976.

OIE. ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS. Stray dog population control. In: OIE. **Terrestrial animal health standards**. Paris: OIE, 2009. chap. 17, p. 313-332.

OLIVEIRA, G. F.; SOUZA, B. G.; OLIVEIRA, P. C.; AZEVEDO, F. D.; PEIXOTO, P. V.; VEIGA, C. C. P. Micobacteriose Generalizada em Cão - Relato De Caso. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 1, p. 101-103, 2012.

PORFIRIO, B. A.; MALIZIA, D. N.; TELLES, E. O.; GUARNIERI, M. C.L.; ABREU, R. A. F.; BATARQUINI, R. T.; PRIST, R.; BALIAN, S. C.; HANASILO, T. I.; OLIVEIRA, T. H. N. Programa práticas educativas em segurança dos alimentos na Cidade Universitária Armando de Salles Oliveira (CUASO-USP). **Revista de Cultura e Extensão**, v. 8, p. 69, 2012.

RIBEIRO, M. G.; FERNANDES, M. C.; PAES, A. C.; SIQUEIRA, A. K.; PINTO, J. P.A.N.; BORGES, A. S. Caracterização de sorotipos em linhagens do gênero *Salmonella* isoladas de diferentes afecções em animais domésticos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30,n. 2,p. 155-160,2010.

ROSSEN, L.; HOLMSTROM, K.; OLSEN, J. E.; RASMUSSEN, O. F. A rapid polymerase chain reaction (PCR)-based assay for the identification of *Listeria monocytogenes* in food samples. **International journal of food microbiology**, v. 14, n. 2, p.145-51, 1991.

SELMI, M.; STEFANELLI, S.; BILEI, S.; TOLLI, R.; BERTOLOTTI, L.; MARCONI, P.; GIURLANI, S.; DE LUCIA, P.G.; RUGGERI, G.; PAGANI, A. Contaminated commercial dehydrated food as source of multiple *Salmonella* serotypes outbreak in a municipal kennel in Tuscany. **Veterinaria Italiana**, v. 47, n. 2, p. 183-190, 2011.

SCHROEDER, H.; VAN RENSBURG, I.B. Generalised *Listeria monocytogenes* infection in a dog. **Journal of the South African Veterinary Association**, v. 64, n. 3, p. 133-136, 1993.

SYNE, S. M.; RAMSUBHAG, A.; ADESIYUN, A. A. Occurrence and genetic relatedness of *Listeria* spp. in two brands of locally processed ready-to-eat meats in Trinidad. **Epidemiology and Infection**, v. 139, n. 5, p. 718-727, 2011.

WEBER, A.; POTEL, J.; SCHÄFER-SCHMIDT, R.; PRELL, A.; DATZMANN, C. Studies on the occurrence of *Listeria monocytogenes* in fecal samples of domestic and companion animals. **Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin**, v. 198 n.2, p.117-23, 1995.

WEESE J. S.; ROUSSEAU, J.; ARROYO, L. Bacteriological evaluation of commercial canine and feline raw diets. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 46, n. 6, p. 513–516, 2005.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health topics: zoonoses**. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/zoonoses/en/>>. Acesso em: 09 jul. 2013.

WILTON, S.; COUSINS, D. Detection and identification of multiple mycobacterial pathogens by DNA amplification in a single tube. **PCR Methods and Applications**, Cold Spring Harbor, v. 1, n. 4, p. 269-273, 1992.

YODER, S.; ARGUETA, C.; HOLTZMAN, A.; AROSON, T.; BERLIN, O. G. W.; TOMASEK, P.; GLOVER, N.; FROMAN, S.; STELMA J. R. G. PCR comparison of *Mycobacterium avium* isolates obtained from patients and foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 6, p. 2650–2653, 1999.