

Área: Ciência de alimentos

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE ISOLADOS DE *Salmonella* spp. DE OVOS COMERCIALIZADOS EM SUPERMERCADOS E FEIRAS LIVRES DO MUNICÍPIO DE PELOTAS, RS

Louise Haubert*, Cristiane Vaniel, Simone Rauber Würfel, Wladimir Padilha da Silva

Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS

*E-mail: louisehaubert@hotmail.com

RESUMO – O ovo é um alimento de elevado valor biológico e, com aumento de sua produção, surgem preocupações para que esteja disponível ao consumidor com um bom padrão de qualidade e que não seja fonte de infecções alimentares. O principal patógeno envolvido em surtos de origem alimentar cujo veículo foram ovos ou alimentos a base de ovos é *Salmonella* spp.. Esse micro-organismo representa uma ameaça na produção avícola pelo risco da transmissão vertical de alguns sorotipos para novas gerações de aves, bem como é um perigo importante através da contaminação da carne de frango e de ovos de consumo, podendo causar casos/surtos de salmonelose. O objetivo do estudo foi avaliar a presença de *Salmonella* spp. em ovos comercializados em supermercados e feiras livres no município de Pelotas, RS e, a partir dos isolados, realizar a caracterização molecular e avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos preconizados para essa bactéria. Foram realizadas análises microbiológicas de 40 amostras provenientes de 4 supermercados e de 4 feiras livres do município de Pelotas, RS. Após o isolamento foram realizadas a confirmação molecular e a avaliação de genes de virulência dos isolados. Duas amostras comercializadas em supermercados apresentaram *Salmonella* spp.. Verificou-se que os isolados portavam diferentes genes de virulência e apresentaram sensibilidade aos antimicrobianos avaliados, entretanto, um isolado apresentou resistência ao ácido nalidíxico. Conclui-se que há ocorrência de *Salmonella* spp. em ovos comercializados em supermercados do município de Pelotas, RS, os quais portam genes de virulência importantes na patogenicidade desse micro-organismo. A resistência a antimicrobianos dos isolados é baixa, observou-se resistência ao ácido nalidíxico em um isolado.

Palavras-chave: alimentos, contaminação, salmonelose.

1 INTRODUÇÃO

O ovo é um dos alimentos mais completos para alimentação humana, apresentando na sua composição, proteínas de elevado valor biológico, tornando-se uma alternativa à proteína da carne por apresentar custos mais acessíveis para a população.

A produção de ovos para o consumo tem se desenvolvido de forma expressiva no Brasil sendo que nos dois primeiros trimestres de 2012, o país produziu, aproximadamente, 16 bilhões de unidades de ovos (IBGE, 2012). Por se tratar de um produto rico em nutrientes e de alta digestibilidade, são necessários alguns cuidados para que chegue ao consumidor com um bom padrão de qualidade sem ser fonte de infecção alimentar (FIGUEIREDO, 2008).

Considerando, ainda, que cada vez mais o consumidor exige padrões higiênico-sanitários elevados para os alimentos, medidas de controle microbiológico são necessárias na obtenção de ovos de qualidade para garantir competitividade no mercado (FRANCO, 2002). Os principais patógenos associados à contaminação de ovos são *Salmonella* spp., *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli* (JORDAN; PATTISON, 1998).

Segundo Barancelli (2012), *Salmonella* spp. é o principal agente causador de doenças de origem alimentar em várias partes do mundo, inclusive no Brasil. Na produção avícola, *Salmonella* spp. representa uma ameaça, tanto pelo risco da transmissão vertical de alguns sorotipos para novas gerações de aves quanto pela contaminação da carne de frango e de ovos de consumo, podendo resultar em surtos de salmonelose.

No país, são escassos os estudos sobre a presença de *Salmonella* spp. em ovos comerciais e em aves de postura, existindo diferenças regionais de prevalência (BARANCELLI, 2012). Geralmente, a contaminação da casca ou do conteúdo de ovos é baixa, ao redor de 1%, a não ser que sejam provenientes de lotes de aves infectadas com *Salmonella* spp. (BAÚ; CARVALHAL; ALEIXO, 2001).

Considerando o complexo controle do gênero *Salmonella* na produção avícola industrial, este patógeno torna-se motivo de preocupação na indústria de alimentos em termos de segurança alimentar. Dessa forma, o objetivo do estudo foi avaliar a presença de *Salmonella* spp. em ovos comercializados em supermercados e feiras livres no município de Pelotas, RS e, a partir dos isolados, realizar a caracterização molecular e avaliar a suscetibilidade aos antimicrobianos preconizados para esse micro-organismo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

a) Pesquisa de *Salmonella* spp.

Foram realizadas cinco coletas processando-se um total de 240 ovos divididos em *pool* de 6 ovos, totalizando 40 amostras, provenientes de 4 supermercados e 4 feiras livres do município de Pelotas, RS. As amostras foram encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos/DCTA/FAEM/UFPel, onde foram realizadas as análises microbiológicas da casca e gema, separadamente. As amostras foram submetidas ao isolamento de *Salmonella* spp., segundo a metodologia preconizada pela Instrução Normativa nº 62, do

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003). Foram pesados 25g da casca e da gema, que foram incubadas a 37°C por 24 horas em água peptonada tamponada. Após, foram inoculadas em caldo Rappaport-Vassiliadis e caldo Selenito Cistina e incubadas a 42°C por 24 horas. Em seguida, foram semeadas em ágar Xilose Lisina Desoxicolado (XLD) e ágar Verde Brilhante Modificado (BPLS) para visualização de colônias características. Os isolados característicos foram submetidos a testes fenotípicos de produção de oxidase, indol e H₂S, motilidade, TSI (Triple Sugar Iron ágar), LIA (Lysine Iron ágar) e ureia. As colônias que apresentaram perfil fenotípico característico para o gênero *Salmonella* foram submetidas aos testes de sorologia frente aos antígenos somático e flagelar (Probac®).

b) Confirmação molecular

As colônias características nos testes descritos anteriormente foram repicadas para TSB (Tryptic Soy Broth) e incubadas a 37°C por 24 horas para realização da extração de DNA pela técnica de pérolas de vidro. Após a quantificação do DNA, as amostras foram submetidas à técnica de PCR convencional em termociclador utilizando o *primer hila* (CRACIUNAS et al., 2012), que é específico para o gênero *Salmonella* e apresenta um produto de amplificação de 413pb. Em cada tubo tipo eppendorf foram adicionados 2,5µL de buffer 10x, 25pmol de cada *primer*, 200µM de cada DNTP, 2Mm de MgCl₂, 0,75U de Taq polimerase, 5ng.µL⁻¹ de DNA e água ultrapura, totalizando um volume final de 25µL. A PCR foi realizada com os seguintes ciclos: 94°C/4 minutos para desnaturação inicial seguidos de 30 ciclos de 94°C/1 minuto, 63°C/1 minuto, 72°C/1 minuto e 72°C/10 minutos para a extensão final. Os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose 1,5% onde amostras que apresentaram bandas com 413pb foram consideradas positivas para o gênero *Salmonella*.

c) Detecção dos genes de virulência

Foi avaliada a presença de genes de virulência através da técnica de PCR de isolados de *Salmonella* spp. obtidos de amostras de ovos. Os genes pesquisados na PCR foram *sefA*, *pefA*, *invA* e *spvC* que amplificam produtos de 330pb (WOODWARD; KIRWAN, 1996), 497pb (HANEDA et al., 2001), 521pb (SWAMY et al., 1996) e 669pb (SWAMY et al., 1996), respectivamente. A PCR foi realizada contendo Go Taq® Green Master Mix, 10µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 2µL do DNA genômico e água ultrapura para um volume final de 25µL. A amplificação ocorreu nas seguintes condições: 94°C por 2 minutos, seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 53°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos da amplificação foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

d) Avaliação da suscetibilidade antimicrobiana

Os isolados foram submetidos ao teste de suscetibilidade antimicrobiana por meio da técnica de difusão em ágar, de acordo com as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2003). Foram testados 11 antimicrobianos: cefoxitina (30µg), cefalotina (30µg), cefotaxima (30µg), imipenem (10µg),

amicacina (30µg), estreptomicina (10µg), ácido nalidíxico (30µg), tetraciclina (30µg), minociclina (30µg), trimetoprim-sulfametoxazol (23,75/1,25µg) e sulfonamida (250-300µg) adquiridos na Laborclin®, e canamicina (30µg), adquirido da Oxoid®.

A cepa padrão *Escherichia coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle da técnica. Os isolados foram incubados a 37°C por 24 horas em meio não seletivo e, após, foram repicados para água peptonada 0,1% até atingir a densidade da escala 0,5 na escala de McFarland. Em seguida, com o auxílio de *swab*, cada cultura foi semeada em ágar Mueller-Hinton onde foram adicionados os discos impregnados com diferentes tipos de antimicrobianos. Os diâmetros das zonas de inibição foram interpretados após 24 horas de incubação a 37°C.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 40 amostras analisadas, em duas amostras (5%) foi confirmada a presença de *Salmonella* spp., tanto pelos testes fenotípicos quanto pela PCR, sendo um isolado oriundo da gema e o outro, da casca de ovos provenientes de dois supermercados de Pelotas, RS.

No estado de São Paulo, detectou-se contaminação por *Salmonella* Enteritidis no conteúdo (3,2%) e na casca (9,6%) de ovos de consumo (OLIVEIRA; SILVA, 2000); em outra região do mesmo estado, entretanto, *Salmonella* não foi isolada em amostras ($n=60$) provenientes de fornecedores distintos (CARDOSO et al., 2002). Segundo a *European Food Safety Authority* (2010), em diversos países da União Europeia, a prevalência de *Salmonella* em ovos de mesa varia entre zero a 22,6%, com média de 0,4%.

Apesar da alta prevalência de *S. Enteritidis* em lotes de aves de postura, a ocorrência de ovos contaminados é considerada baixa (EBEL, 2000). A contaminação de ovos pode ocorrer de duas maneiras: internamente, durante sua formação, a partir do trato reprodutor infectado (contaminação vertical) ou pela penetração da bactéria através da casca (contaminação horizontal), contaminada pela passagem pela cloaca ou pelo contato com material fecal do ambiente e, eventualmente, com o sistema reprodutor após sua formação (GANTOIS et al., 2009). Segundo Braden (2006) e Quinn et al. (2005), a contaminação transovariana do ovo, durante a formação, é especialmente importante para *S. Enteritidis*, além dos sorotipos adaptados às aves, *Salmonella* Gallinarum e *Salmonella* Pullorum, entretanto, é importante ressaltar que qualquer sorovar pode contaminar a casca e a partir daí, o interior do ovo.

Tendo em vista que a contaminação ocorreu na casca e na gema de ovos inspecionados que passaram pelo processo de lavagem, a contaminação pode ter ocorrido durante a formação do ovo, pela contaminação vertical, ou através de contaminação horizontal durante a lavagem, pois em casos de lavagem inadequada, os micro-organismos podem ser “forçados” para seu interior por fatores como remoção da cutícula, por exemplo.

Ovos inspecionados e previamente higienizados podem oferecer riscos à saúde pública, porém ovos comercializados em feiras livres sem a higienização necessária e muitas vezes com a reutilização de embalagens, precisam também ser considerados para determinar de maneira mais conclusiva quais ovos têm maior participação na epidemiologia de salmonelose em Pelotas, RS.

Além da caracterização molecular, outro aspecto de grande relevância na avaliação dos isolados é a identificação de suas características de capacidade de virulência. Foram testados três isolados oriundos da amostra proveniente da gema e outro isolado oriundo da casca de ovos, e todos os isolados apresentaram fatores de virulência importantes para sua patogenicidade, sendo identificados pelo menos dois genes de virulência para cada isolado. O gene prevalente e presente em todos os isolados foi o *invA*, seguido do gene *spvC* e *sefA*, identificado em 3 isolados, e por último, presente em somente um isolado, foi identificado o gene *pefA*. O gene *sefA* está envolvido na expressão de fímbrias; *pefA* é localizado em um plasmídeo codificando fímbrias que auxiliam a adesão celular; *invA* é responsável pela internalização da bactéria através da estimulação de células não fagocíticas, e *spvC* localiza-se em um plasmídeo de virulência, sendo envolvido na infecção sistêmica (WOODWARD; KIRWAN, 1996; HANEDA et al., 2001; SWAMY et al., 1996).

De uma forma geral, os isolados apresentaram sensibilidade aos antimicrobianos avaliados, entretanto, o isolado oriundo da casca de ovos apresentou resistência ao ácido nalidíxico, demonstrando que existem diferenças na resistência a antimicrobianos entre isolados prevalentes nesta região para esse determinado alimento.

4 CONCLUSÃO

Há ocorrência de *Salmonella* spp. em ovos comercializados em supermercados do município de Pelotas, RS, os quais portam genes de virulência importantes na patogenicidade desse micro-organismo. A resistência a antimicrobianos dos isolados é baixa, entretanto, observou-se resistência ao ácido nalidíxico em um isolado.

5 AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão de bolsa de Mestrado.

6 REFERÊNCIAS

- BARANCELLI, G.V., MARTIN, J.G.P., PORTO, E. *Salmonella* em ovos: relação entre produção e consumo seguro. **Segurança Alimentar e Nutricional**. Campinas, 19(2): 73-82, 2012.
- BAÚ, A.C., CARVALHAL, J.B., ALEIXO, J.A.G. Prevalência de *Salmonella* em produtos de frangos e ovos de galinha comercializados em Pelotas, RS, Brasil. **Revista Ciência Rural**. Santa Maria, v.31, n. 2. P. 303-307, 2001.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62/2003. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Disponível em: www.agricultura.gov.br.

- BRADEN C.R. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and eggs: a national epidemic in the United States. **Clin Infect Dis**. 2006; 43(4): 512-17.
- CARDOSO A.L.S.P., TESSARI E.N.C., CASTRO A.G.M., KANASHIRO A.M.I., GAMA N.M.S.Q. Presence of *Salmonella* spp. in comercial eggs analysed at the Avian Patology labortory of Descalvado, SP. **Higiene Alimentar**. 2002; 16 (92/93): 76-9.
- CSLI/NCCLS, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests**; Approved Standard – 8. ed. CLSI/NCCLS documento M2-A8. Wayne, 2003.
- CRĂCIUNAS, C., KEUL, A. L., FLONTA, M., CRISTEA, M. (2012). DNA-based diagnostic tests for *Salmonella* strains targeting *hila*, *agfA*, *spvC* and *sef* genes. **Journal of Environmental Management**, 95, S15-S18.
- EBEL E., SCHLOSSER W. Estimating the anual fraction of eggs contaminated with *Salmonella* Enteritidis in the United States. **Int J Food Microbiol**. 2000; 61(1):51-62.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific Opinion on a quantitative estimation of the public health impacto of setting a new target for the reduction of *Salmonella* in laying hens. **EFSA Journal** [Portal EFSA] 2010; 8(4): 1546. [86 pp]. Disponível em : www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1546.pdf.
- FIGUEIREDO, T. C. Características físico-química e microbiológica e amins bioativas em ovos de consumo. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. 2008.
- FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2002, 182p.
- GANTOIS I., DUCATELLE R., PASMANS F., HAESEBROUCK F., GAST R., HUMPHREY T.J. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. **FEMS Microbiol. Rev**. 2009; 33(4): 718-38.
- HANEDA, T., OKADA, N., NAKAZAWA, N., KAWAKAMI, T., & DANBAR, H. (2001). Complete DNA sequence and comparative analysis of the 50-kilobase virulence plasmid of *Salmonella enteric* serovar Choleraesuis. **Infection and Immunity**, 69, 4, 2612 – 2620.
- INTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Indicadores IBGE: Estatística da Produção Pecuária – Setembro de 2012. www.ibge.gov.br.
- JORDAN, F.T.W.; PATTISON, M. **Poultry diseases**, 4 ed. London: W.B. Saunders Company Ltd, 1998. 546 p.
- OLIVEIRA D.D., SILVA E.N. *Salmonella* em ovos comerciais: ocorrência condições de armazenamento e desinfecção da casca. **Arq Bras Med Vet Zootec**. 2000; 52 (6):655-661.
- QUINN P.J., MARKEY B.K., CARTER M.E., DONNELLY W.J., LEONARD F.C (Org). Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Porto Alegre: Artmed; 2005.
- SWAMY, S. C., BARNHART, H. M., LEE, M. D., & DREESEN D. W. (1996). Virulence Determinants *invA* and *spvC* in *Salmonellae* isolated from Poultry Products, Wastewater, and Human Sources. **Applied and Environmental Microbiology**, 62, 10, 3768–3771.
- WOODWARD, M. J., & KIRWAN, S. E. (1996). Detection of *Salmonella* Enteritidis in eggs by the polymerase chain reaction. **Vet . Record**, 138, 411-4 13.