

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

**Instituto de Biologia**

**Curso de Ciências Biológicas**



Trabalho Acadêmico

**Perfil de sensibilidade de *Salmonella* spp. isoladas de ovos de galinha frente a antibióticos**

**Juliana Zaffalon Rodrigues**

Pelotas, 2014

**JULIANA ZAFFALON RODRIGUES**

**Perfil de sensibilidade de *Salmonella* spp. isoladas de ovos de galinha frente a antibióticos**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gladis Aver Ribeiro

Pelotas, 2014

Dados de catalogação na fonte:  
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901  
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

R696p Rodrigues, Juliana Zaffalon  
Perfil de sensibilidade de *Salmonella spp.* isoladas de ovos de galinha frente a antibióticos / Juliana Zaffalon Rodrigues. – 32f. – Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2014. – Orientadora Gládis Aver Ribeiro.

1.Biologia. 2.Ovos. 3.*Salmonella spp.* 4.Antibióticos.  
5.Gastroenterite. 6.Contaminação alimentar. I.Ribeiro, Gládis Aver. II.Título.

CDD:579.344

JULIANA ZAFFALON RODRIGUES

Perfil de sensibilidade de *Salmonella* spp. isoladas de ovos de galinha frente a antibióticos

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 11 de novembro de 2014

Banca examinadora:

Prof. Dr<sup>a</sup>. Gladis Aver Ribeiro (Orientador)  
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr<sup>a</sup>. Anelise Vicentini Kuss  
Doutora em Ciência do Solo pela Universidade Federal de Santa Maria.

Prof.<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Kelly Lameiro Rodrigues  
Doutora em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas.

Dedico aos meus pais.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente aos meus pais. Obrigada pai por ter me ensinado a fazer o que é certo, a ser uma pessoa íntegra e por me incentivar a fazer o que eu gosto, sei que de onde estás sentirás meu abraço, meu eterno amor e minha gratidão. Obrigada mãe por ser meu maior exemplo, por me apoiar, me incentivar, por ser minha base e meu chão, obrigada por estar presente em todos os momentos, és a pessoa mais importante da minha vida e eu não tenho palavras pra descrever o quanto é grande o meu amor por ti. Obrigada por tudo!!

Aos meus irmãos, Rafael e Raquel, por serem tão carinhosos e atenciosos comigo, obrigada por estarem presentes, por me incentivarem a estudar e muito obrigada por sempre torcerem por mim, amo vocês.

Ao Igor, meu namorado. Por sempre me incentivar a fazer o que gosto, por aturar minhas crises, por conversar mil vezes comigo sobre o mesmo assunto, obrigada pelos puxões de orelha, pelos mates, por estar sempre torcendo por mim, obrigada por me tranquilizar quanto ao futuro e por me incentivar a ir atrás dos meus sonhos. Obrigada por acreditar em mim, muitas vezes até mais do que eu acredito. Obrigada pelo carinho, companheirismo e amor. Te amo.

Aos meus amados colegas e companheiros de jornada, Cris, Fabiano, Dani, Luquinhas e Felipe, obrigada por todos os momentos que tivemos juntos, sentirei saudades das nossas risadas e até das nossas “briguinhas”, vocês fizeram com que a faculdade valesse a pena. levarei vocês sempre comigo, no meu coração e pensamento.

Agradeço também as “Gladisettes”, Cris, Kamila e Marcelle, por serem parceironas de laboratório, por sempre ajudarem quando foi preciso, pelas risadas, pelas bobagens faladas, pelos incentivos e por tornarem o laboratório um lugar agradável e alegre. Valeu gurias!

Por fim, agradeço a minha orientadora Gladis, por ser uma verdadeira mãezona. Pela oportunidade, por ser compreensiva, pelos puxões de orelha e incentivos, sem o teu auxílio este trabalho não seria possível. Obrigada!!!

## Resumo

RODRIGUES, Juliana Zaffalon. **Perfil de sensibilidade de *Salmonella* spp. isoladas de ovos de galinha frente a antibióticos.** 2014, 31f. Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Ciências Biológicas – Bacharelado, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

A alimentação dentro dos padrões higiênicos satisfatórios é uma das condições essenciais para a promoção e manutenção da saúde. Alimentos potencialmente perigosos são aqueles nos quais os micro-organismos crescem com rapidez e muitas vezes tem histórico de envolvimento em surtos de doenças transmitidas por alimentos. As bactérias pertencentes ao gênero *Salmonella* spp. são um exemplo desses micro-organismos, são conhecidas por causarem gastroenterites e estão tradicionalmente associadas ao consumo de ovos, a presença deste patógeno consiste em um risco potencial à saúde do consumidor. O objetivo deste trabalho foi isolar *Salmonella* spp. de ovos produzidos em granja e em propriedades rurais e determinar a suscetibilidade das cepas isoladas aos antibióticos. As análises foram feitas no período de março a agosto de 2014 no laboratório de Bacteriologia, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, os ovos destinados às análises foram adquiridos na cidade de Pelotas-RS. O estudo foi feito, primeiramente, usando metodologia para o isolamento de *Salmonella* spp., e os isolados bacterianos foram testados quanto ao perfil de sensibilidade frente os antibióticos Ácido Nalidíxico (30µg), Gentamicina (10µg), Sulfazotrim (25µg), Cloranfenicol (30µg), Estreptomicina (10µg), Nitrofurantoina (30µg), Tetraciclina (30µg), Norfloxacin (10µg), utilizando o teste de antibiograma pela técnica de Kirby e Bauer. Das 50 amostras analisadas, quatro apresentaram contaminação por *Salmonella* spp., e destas, duas, provenientes de propriedades rurais, apresentaram resistência a Nitrofurantoína (30µg), as outras foram sensíveis a todos os antibióticos.

Palavras-chaves: ovos; *Salmonella* spp.; antibióticos; contaminação alimentar; gastroenterite.

## Abstract

RODRIGUES, Juliana Zaffalon. **Perfil de sensibilidade de *Salmonella* spp. isoladas de ovos de galinha frente a antibióticos.** 2014, 31f. Trabalho de Conclusão de Curso – Graduação em Ciências Biológicas – Bacharelado, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

Feeding in satisfactory hygienic standards is an essential condition for the promotion and maintenance of health. Potentially hazardous foods are those in which microorganisms grow quickly and often have involvement in outbreaks of foodborne illness. Bacteria belonging to the genus *Salmonella* are an example of these microorganisms known to cause gastroenteritis and are traditionally associated with egg consumption, the presence of this pathogen is a potential risk to consumer's health. The aim of this study was to isolate *Salmonella* spp. of eggs produced in the farm and in rural properties and determine the susceptibility of isolates to antibiotics. The analyzes were carried out between March and August 2014 in the laboratory of Bacteriology, Department of Microbiology and Parasitology, Institute of Biology, Federal University of Pelotas, eggs for the analyzes were purchased in the city of Pelotas-RS. The study was conducted primarily using methodology for the isolation of *Salmonella* spp. The bacterial isolates were tested for sensitivity to the antibiotics nalidixic acid (30µg), gentamicin (10mg) sulphazotrin (25 mcg), chloramphenicol (30µg), streptomycin (10mg), nitrofurantoin (30µg), tetracycline (30µg), Norfloxacin (10mg) using the test of antibiotic sensitivity by Kirby and Bauer technique. Of the 50 samples analyzed, four were contaminated by *Salmonella* spp., And these two, from farms, showed resistance to nitrofurantoin (30µg), the others were sensitive to all antibiotics.

Keywords: eggs; *Salmonella* spp. antibiotics; food contamination; gastroenteritis.



## Lista de Figuras

- Figura 1 Teste de Antibiograma em Ágar Mueller Hinton dos isolados de *Salmonella* spp. obtidos a partir de amostras de ovos de galinha provenientes de propriedade rural..... 24
- Figura 2 Teste de Antibiograma em Ágar Mueller Hinton de um isolado de *Salmonella* spp. obtido a partir de amostras de ovos de galinha provenientes de propriedade rural..... 24

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Número de isolados identificados como <i>Salmonella</i> spp. obtidos de 50 amostras de ovos de galinha no período de março a agosto de 2014, em Pelotas - RS.....	22
Tabela 2	Perfil de sensibilidade de isolados de <i>Salmonella</i> spp. obtidos a partir de ovos de galinha provenientes de propriedades rurais frente a antibióticos.....	23

## Sumário

<b>1</b>	<b>Introdução.....</b>	<b>11</b>
<b>1.2</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>13</b>
<b>1.2.1</b>	<b>Objetivos gerais.....</b>	<b>13</b>
<b>1.2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>Revisão de literatura.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs).....</b>	<b>14</b>
<b>2.2</b>	<b>Contaminação microbiana dos alimentos.....</b>	<b>15</b>
<b>2.3</b>	<b><i>Salmonella</i> spp.....</b>	<b>15</b>
<b>2.4</b>	<b>Ovos.....</b>	<b>16</b>
<b>2.5</b>	<b>Antibióticos.....</b>	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>Metodologia.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1</b>	<b>Isolamento de cepas de <i>Salmonella</i> spp.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1.1</b>	<b>Local de coleta.....</b>	<b>19</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Obtenção e análise das amostras.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Isolamento e identificação de <i>Salmonella</i> spp .....</b>	<b>20</b>
<b>3.2</b>	<b>Teste de sensibilidade a antibacterianos.....</b>	<b>21</b>
<b>4</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>22</b>
<b>4.1</b>	<b>Isolamento e Identificação bacteriana.....</b>	<b>22</b>
<b>4.2</b>	<b>Teste de Antibiograma.....</b>	<b>23</b>
<b>5</b>	<b>Discussão.....</b>	<b>25</b>
<b>5.1</b>	<b>Isolamento e Identificação bacteriana.....</b>	<b>25</b>
<b>5.2</b>	<b>Teste de Antibiograma.....</b>	<b>27</b>
<b>6</b>	<b>Conclusão.....</b>	<b>28</b>
	<b>Referências.....</b>	<b>29</b>

## 1 Introdução

A alimentação dentro dos padrões higiênicos satisfatórios é uma das condições essenciais para a promoção e manutenção da saúde; quando há deficiência deste controle ocorrem os chamados surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs), que são doenças provocadas pelo consumo de alimentos que ocorrem quando micróbios prejudiciais à saúde, parasitas ou substâncias tóxicas estão presentes no alimento. (ANVISA, 2004).

Alimentos potencialmente perigosos são aqueles nos quais os micro-organismos crescem com rapidez e muitas vezes têm histórico de envolvimento em surto de DTAs, possuem o potencial para contaminação devido aos métodos utilizados na sua produção ou processamento, e possuem características que em geral, permitem o desenvolvimento microbiano. São, com frequência, úmidos, ricos em proteínas, quimicamente neutros ou ligeiramente ácidos (SERVSAFE, 2003).

As bactérias pertencentes ao gênero *Salmonella*, conhecidas por causarem doença, quer em animais quer em humanos, estão tradicionalmente associadas ao consumo de ovos (CORREA; SANTOS; ASSUNÇÃO, 2012). As salmoneloses transmitidas por aves são doenças provocadas por estas e a infecção humana geralmente ocorre pela ingestão de alimentos contaminados especialmente por *Salmonella enterica* sorotipo Enteritidis. Ovos consumidos crus ou em alimentos sem tratamento adequado foram identificados como os principais responsáveis por surtos de infecção humana por *Salmonella* spp. A contaminação bacteriana de ovos pode ocorrer antes, via ovariana ou na passagem do ovo pelo oviduto; ou após a postura, por deficiências na higiene, presença de rachaduras ou defeitos na casca (KATAYAMA et al, 2012).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde - OMS (2013), os antibióticos são fármacos empregados no tratamento de infecções ocasionadas por bactérias, fungos, parasitas e vírus. A resistência de bactérias a antimicrobianos é um fenômeno que tende a crescer muito, tanto pelo uso dessas drogas de forma descontrolada em hospitais ou no meio agropecuário, ou ainda pela utilização de

drogas de amplo espectro para combater infecções de forma empírica e impulsiva, quando escolhas de menor espectro seriam suficientes (MEIRELES, 2008).

A aplicação de antibióticos além de suprimir a microbiota intestinal normal, rompendo o efeito protetor, aumenta a vantagem competitiva das *Salmonella* spp. antibiótico-resistente, favorecendo a ocorrência de salmoneloses (CARVALHO et al, 2009).

A emergência de organismos resistentes a múltiplos antibióticos, incluindo *Salmonella* spp., constitui problema crescente para a saúde pública, por isso a determinação do perfil de sensibilidade a antimicrobianos de *Salmonella* spp. isolados de alimentos em determinada região, além de ser importante como marcador epidemiológico, serve para orientar procedimentos terapêuticos em medicina humana e veterinária (BAÚ; CARVALHAL; ALEIXO, 2001).

## **1.2 Objetivos**

### **1.2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a atividade antibacteriana de antibióticos frente a cepas de *Salmonella* spp. isoladas de ovos de galinha de granja e de propriedades rurais comercializados na cidade de Pelotas, RS, Brasil.

### **1.2.2 Objetivo Específico**

- Isolar *Salmonella* spp. em ovos de galinha produzidos em granja e em propriedades rurais.

- Determinar a suscetibilidade das cepas isoladas frente aos antibacterianos Ácido Nalidíxico (30µg), Gentamicina (10µg), Sulfazotrim (25µg), Cloranfenicol (30µg), Estreptomicina (10µg), Nitrofurantoina (30µg), Tetraciclina (30µg), Norfloxacin (10µg).

## **2 Revisão de Literatura**

### **2.1 Doenças Transmitidas por Alimentos**

Segundo dados da Vigilância Sanitária (2014), doenças transmitidas por alimento (DTAs) são todas ocorrências clínicas consequentes à ingestão de alimentos que possam estar contaminados com micro-organismos patogênicos (infecciosos, toxinogênicos ou infestantes), toxinas de microrganismos, substâncias químicas, objetos lesivos ou que contenham em sua constituição estruturas naturalmente tóxicas, ou seja, são doenças consequentes da ingestão de perigos biológicos, químicos ou físicos presentes nos alimentos. Para que uma DTA ocorra, o patógeno ou sua(s) toxina(s) deve(m) estar presente(s) no alimento ou água. Entretanto, apenas a presença do patógeno não significa que a enfermidade ocorrerá.

Os sintomas mais comuns de DTA são vômitos e diarreias, podendo também apresentar dores abdominais, dor de cabeça, febre, alteração da visão, olhos inchados, dentre outros. Para adultos saudáveis, a maioria das DTAs dura poucos dias e não deixa sequelas, porém, para as crianças, grávidas, idosos e pessoas doentes, as consequências podem ser mais graves, e se não forem tratadas podem levar até a morte (ANVISA, 2004).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que, a cada ano, mais de dois milhões de pessoas morram por doenças diarreicas, muitas das quais adquiriram ao ingerir alimentos contaminados. Estima-se que as DTA causem, anualmente, nos Estados Unidos (EUA), aproximadamente 76 milhões de casos, 325.000 hospitalizações e 5 mil mortes. No Brasil, faz-se a vigilância epidemiológica de surtos de DTA e não de casos individuais, com exceção da cólera, febre tifoide e botulismo. Essa vigilância teve início em 1999 e há registro médio de 665 surtos por ano, com 13 mil doentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

## 2.2 Contaminação microbiana dos alimentos

A utilização de programas de controle de qualidade microbiológica está cada vez mais sistemática e eficaz. Há também, a existência de processos cada vez mais seguros do ponto de vista de saúde pública que são utilizados durante o processamento, transporte, armazenamento e distribuição dos alimentos. Apesar disso existe sempre uma probabilidade de um alimento sofrer contaminações por agentes patógenos, resultantes de eventuais deficiências no processamento ou incorreções na sua manipulação e utilização (PINTO, 2006).

A qualidade higiênico-sanitária dos alimentos enquanto fator de segurança alimentar e nutricional é um aspecto muito estudado e discutido, uma vez que a incidência de doenças transmitidas por alimentos tem aumentado progressivamente em âmbito mundial (AKUTSU et al, 2005).

As bactérias, os fungos, os vírus, os parasitas, os agentes químicos e as substâncias tóxicas de origens animal e vegetal atuam como agentes etiológicos de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs). Não há dúvidas, no entanto, da importância das bactérias como agentes das doenças de origem alimentar. Em várias pesquisas, tem-se demonstrado a relação existente entre manipuladores de alimentos e doenças bacterianas de origem alimentar. Podem ser manipuladores doentes, ou portadores assintomáticos, ou que apresentem hábitos de higiene pessoal inadequados, ou ainda que usam métodos anti-higiênicos na preparação de alimentos (ANDRADE; SILVA; BRABES, 2003).

## 2.3 *Salmonella* spp.

As bactérias do gênero *Salmonella* spp. são bastonetes gram-negativos, anaeróbicos facultativos e não formadores de esporos. Seu habitat natural é o trato intestinal dos animais. Todas as salmonelas são consideradas patogênicas em algum grau, causando salmonelose, gastroenterite, febre tifoide ou febre entérica (TORTORA; BERDELL; CHRISTINE, 2012).

A precária qualidade dos alimentos remete a riscos de veiculação de patógenos para o consumidor e perdas econômicas para os produtores (SANTOS et al, 2001). A *Salmonella* spp. é o micro-organismo mais envolvido em casos e surtos



de doenças de origem alimentar em diversos países, inclusive no Brasil. A sua patogenicidade varia de acordo com o tipo sorológico, idade e condições de saúde do hospedeiro e tipo de alimento envolvido (FRANCO; LANDGRAF, 2006).

A salmonelose é uma infecção cujos sintomas são febre, dores abdominais, vômito e diarreia, e se manifestam de 12 a 36 horas após o consumo de alimentos ou bebidas contaminados, com duração de 1 a 4 dias. A recuperação ocorre geralmente sem o uso de antibióticos, porém, em crianças, recém-nascidos e indivíduos imunocomprometidos, a *Salmonella* spp. pode causar complicações mais graves como bacteremia, lesões em órgãos e meningite; nestes casos a antibioticoterapia é imprescindível (BARANCELLI; MARTIN; PORTO, 2012).

## 2.4 Ovos

A contaminação dos ovos por salmonela se dá, inicialmente e na maioria das vezes, através da casca. Tempo e temperatura de armazenagem são fatores fundamentais para que as salmonelas passem da superfície da casca para as estruturas internas do ovo. A desinfecção e o resfriamento do ovo logo após a postura são procedimentos adotados em vários países como medidas para reduzir a contaminação e a multiplicação bacteriana. Os ovos podem também se contaminar via transovariana e neste caso, a contaminação está localizada na gema e os processos convencionais de desinfecção dos ovos não são eficientes. A clara, em geral, apresenta-se com baixa contaminação por salmonelas, pois ela contém elementos naturais que dificultam o desenvolvimento bacteriano, como a presença de enzimas antibacterianas (lisozima) e a deficiência em ferro, elemento essencial para a multiplicação bacteriana. Contudo, a manipulação da clara no preparo de determinados pratos pode romper esse equilíbrio e favorecer a multiplicação de salmonelas (OLIVEIRA; SILVA, 2000).

Dependendo da qualidade da casca, condições de higiene, tempo e temperatura de estocagem, bactérias como *Salmonella* spp. presentes na superfície da casca de ovos podem penetrar em seu interior. Podem inclusive invadir o conteúdo de ovos de casca íntegra. Outros fatores também facilitam esta invasão, como o esfriamento natural do ovo após a postura, umidade do ar e tratamentos da superfície da casca (KATAYAMA et al, 2012).

Os principais fatores que fazem do ovo um potencial causador de salmoneloses são hábitos inadequados de preparo e consumo – cru ou mal cozido, principalmente em pratos a base de ovos sem cocção. Um único ovo com *Salmonella* pode contaminar grande quantidade de alimentos e expor um elevado número de consumidores ao patógeno. A manutenção de ovos sob refrigeração previne que *Salmonella* contaminante se multiplique e atinja altas populações, portanto, ovos devem se manter refrigerados até sua utilização (BARANCELLI; MARTIN; PORTO, 2012).

## 2.5 Antibióticos

Segundo a Organização Mundial da Saúde – OMS (2013), a descoberta dos antimicrobianos foi um dos mais importantes desenvolvimentos na história da humanidade. Porém, com o uso abusivo dos antibióticos na medicina humana e na criação de animais, nos últimos anos houve um aumento no número e tipo de micro-organismos resistentes a esses medicamentos.

Desde 1950, doses sub-terapêuticas de antibióticos tem sido adicionadas à alimentação de frangos, bovinos e suínos. Esses antibióticos são usados em terapias e na prevenção contra infecções bacterianas, e são também adicionados continuamente à ração animal para promover crescimento, aumentar a eficácia da ração e diminuir a produção de dejetos. O uso extensivo de antibióticos como agentes terapêuticos e promotores de crescimento é considerado um importante fator na resistência das bactérias de origem animal a antibióticos. Isto foi associado ao aumento da resistência a antibióticos em gêneros bacterianos da família Enterobacteriaceae. Evidências clínicas indicam que bactérias resistentes podem ser transmitidas de animais para humanos resultando em doenças de difícil tratamento, a transferência pode se dar através da alimentação. Bactérias não patogênicas podem ser reservatórios de genes de resistência, os quais podem ser transferidos para bactérias patogênicas, o que é um risco potencial para a saúde pública (MOREIRA; MORAES, 2002).

Segundo Carvalho et al (2009), as infecções por *Salmonella* sp. geralmente são tratadas com drogas como as cefalosporinas de terceira geração e as

fluoroquinolonas. Entretanto ao levar em consideração a transferência plasmidial que ocorre entre os microrganismos, a resistência apresentada à tetraciclina é grave, uma vez que em casos de surtos como o de cólera estirpes resistentes irão comprometer o tratamento clínico, visto que tetraciclina ou doxaciclina são as drogas de escolha para a terapia da doença.

Para Silva e Duarte (2002) o extensivo uso das quinolonas em aves tem sido facilitado por uma legislação de prescrição muito flexível, pelo aparecimento de genéricos para uso em ração e água que apresentam menor custo quando comparados aos primeiros produtos aprovados e, sem dúvida, pela eficácia contra as salmonelas.

Segundo trabalho de Zamora, Chaves e Arias (2006), o uso indiscriminado de antibióticos em várias práticas, incluindo as médicas, veterinárias e agrícolas resulta em uma pressão seletiva sobre as bactérias, contribuindo para a seleção de microrganismos com padrões de resistência a antibióticos. A presença e a persistência de bactérias resistentes a antibióticos têm sido descrita em diferentes ambientes, incluindo solo, superfície de água, água potável e alimentos o que representa um problema de saúde pública crescente. Para *Salmonella* spp., tem sido descrita uma rápida e crescente emergência de cepas multirresistentes provenientes de animais e humanos, no qual, incide um crescente número de fracassos terapêuticos. A resistência a alguns antibióticos, incluindo  $\beta$ -lactâmicos, tetraciclinas, cloranfenicol e sulfametoxazol-trimetoprim está aumentando. Além disso, nos últimos tempos tem sido observado em todo o mundo, o aparecimento de estirpes multirresistentes de *S. typhimurium*, a partir de animais e humanos.

### **3 Metodologia**

#### **3.1 Isolamento de cepas de *Salmonella* spp.**

##### **3.1.1 Local de coleta**

As amostras foram coletadas em feiras livres, fruteiras e supermercados, localizados na cidade de Pelotas, RS, Brasil. Foram coletadas cinquenta (50) amostras de ovos, sendo vinte e cinco (25) provenientes de propriedades rurais e vinte e cinco (25) provenientes de granjas. Das vinte e cinco amostras provenientes de propriedades rurais, quinze foram compradas em fruteiras e as outras dez em feira livre. As vinte e cinco amostras provenientes de granja foram compradas em diferentes supermercados.

##### **3.1.2 Obtenção e análise das amostras**

As coletas foram realizadas no período de março a agosto de 2014, sendo 25 ovos de galinha produzidos em granja e 25 produzidos em propriedades rurais, totalizando 50 amostras de ovos, as quais foram submetidas à pesquisa de *Salmonella* spp.

Logo após a coleta, as amostras foram encaminhadas ao laboratório de Bacteriologia, do Departamento de Microbiologia e Parasitologia, do Instituto de Biologia (IB) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), para o isolamento das cepas de *Salmonella* spp. e verificação do perfil de sensibilidade aos antibióticos.

Para a realização das análises, a metodologia utilizada foi baseada em (SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA, 1997) e antes dos procedimentos foram aplicados métodos de assepsia, como desinfecção da bancada e antissepsia das mãos com álcool 70%, além do uso de vidrarias estéreis.

### 3.1.3 Isolamento e identificação de *Salmonella* spp (SILVA et al, 1997)

Foram adicionados 25mL de amostra (gema e clara) gradualmente e com constante agitação a 225mL de Caldo Lactosado (Lactose, Synth®; Peptona e Extrato de carne, Himedia®). A mistura foi agitada com a utilização de um agitador magnético com barra magnética estéril, para facilitar a homogeneização. A agitação continuou até se obter uma suspensão livre de grumos, essa mistura ficou em descanso por uma hora a temperatura ambiente. Após esse descanso o pH foi verificado e, quando necessário, foi ajustado com ácido clorídrico 1N ou hidróxido de sódio 1N para 6,8. A mistura então foi incubada a 36°C/24h com a tampa levemente frouxa. Após, a amostra foi inoculada em tubos contendo os meios de enriquecimento seletivo Caldo Rapaport (RP, Acumedia®), e Caldo Tetrionato (TT, Acumedia®) e novamente incubados a 36°C/24h. Após este período, uma alçada de cada tubo foi semeada pelo método de esgotamento em placas de Ágar Hektoen-Enteric (HE, Acumedia®) e Ágar Xilose Lisina Desoxilato (XLD, Himedia®), e incubadas a 36°C/24h. As colônias características em HE (azuis averdeadas com ou sem centro negro) e em XLD (rosas com ou sem centro negro) foram submetidas a testes bioquímicos em meios Ágar Lisina Ferro (LIA, Vetec®), Ágar Tríplice de Ferro (TSI, Himedia®) e Caldo de Uréia (Vetec®) (KONEMAN; ALLEN; JANDA, 2001). Havendo resultados positivos para estes testes, as colônias foram submetidas à confirmação através de sorologia utilizando soro anti-salmonela polivalente somático (Probac do Brasil®).

### 3.2 Teste de sensibilidade a antibacterianos

Após o isolamento e confirmação dos isolados, os mesmos foram repicados em Ágar BHI inclinado e incubados a 36°C/24h para a obtenção de massa bacteriana e realizadas colorações de Gram para avaliar a pureza dos inóculos.

Para os testes de sensibilidade a antibióticos foi utilizado o teste de antibiograma por difusão em disco, pela técnica de Kirby e Bauer descrito por KONEMAN; ALLEN; JANDA (2001). Para a realização deste teste foi preparado um inóculo de acordo com a escala 0,5 de MacFarland, o que corresponde a  $1,5 \times 10^8$  UFC. mL<sup>-1</sup>, a partir de cultivos recentes dos isolados. Com auxílio de *swab* estéril, foi semeado em placa de Ágar Mueller Hinton (MH, Merck®) e, a seguir, foram adicionados com pinça estéril, os seguintes discos de antibióticos: Ácido Nalidíxico (30µg), Gentamicina (10µg), Sulfazotrim (25µg), Cloranfenicol (30µg), Estreptomicina (10µg), Nitrofurantoina (30µg), Tetraciclina (30µg), Norfloxacin (10µg), (Laborclin®). As placas foram incubadas a 36°C/24h e após, com o auxílio de régua milimetrada, foi medido o tamanho do halo de inibição ao redor de cada disco e a partir disto, os valores foram comparados aos da tabela de classificação segundo Vermelho et al (2006) e a bactéria foi classificada como sensível, intermediária ou resistente ao antibacteriano testado.

## 4 Resultados

### 4.1 Isolamento e Identificação Bacteriana

Os resultados referentes aos isolados encontrados nestas amostras estão demonstrados na tabela 1.

Tabela1 – Número de isolados identificados como *Salmonella* spp. obtidos de 50 amostras de ovos de galinha no período de março a agosto de 2014, em Pelotas - RS.

Origem da amostra	<i>Salmonella</i> spp.
Propriedade Rural	4/25 (16%)
Granja	0/25 (0%)
TOTAL	4/50 (8%)

Das 50 amostras analisadas podemos observar que quatro (8%) estavam contaminadas por *Salmonella* spp. e que estas são provenientes de propriedades rurais da cidade de Pelotas. Nenhuma amostra proveniente de granja apresentou contaminação por este micro-organismo.

## 4.2 Teste de Antibiograma

Os isolados obtidos a partir dos ovos de galinha contaminados foram submetidos aos testes de antibiograma. Os resultados estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 - Perfil de sensibilidade de isolados de *Salmonella* spp. obtidos a partir de ovos de galinha provenientes de propriedades rurais frente a antibióticos.

Antibiótico	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3	Cepa 4
Ácido Nalidíxico (30µg)	S	S	S	S
Gentamicina (10µg)	S	S	S	S
Sulfazotrim (25µg)	S	S	S	S
Cloranfenicol (30µg)	S	S	S	S
Estreptomicina (10µg)	S	S	S	S
Tetraciclina (30µg)	S	S	S	S
Norfloxacin (10µg)	S	S	S	S
Nitrofurantoina (30µg)	R	R	S	S

S: sensível

R: resistente

As cepas 1 e 2 se mostraram sensíveis a todos antibióticos, exceto à Nitrofurantoína (30 µg). Na figura 1 está representado o teste de antibiograma realizado com o isolado 1 onde se pode observar o perfil de resistência à Nitrofurantoína.



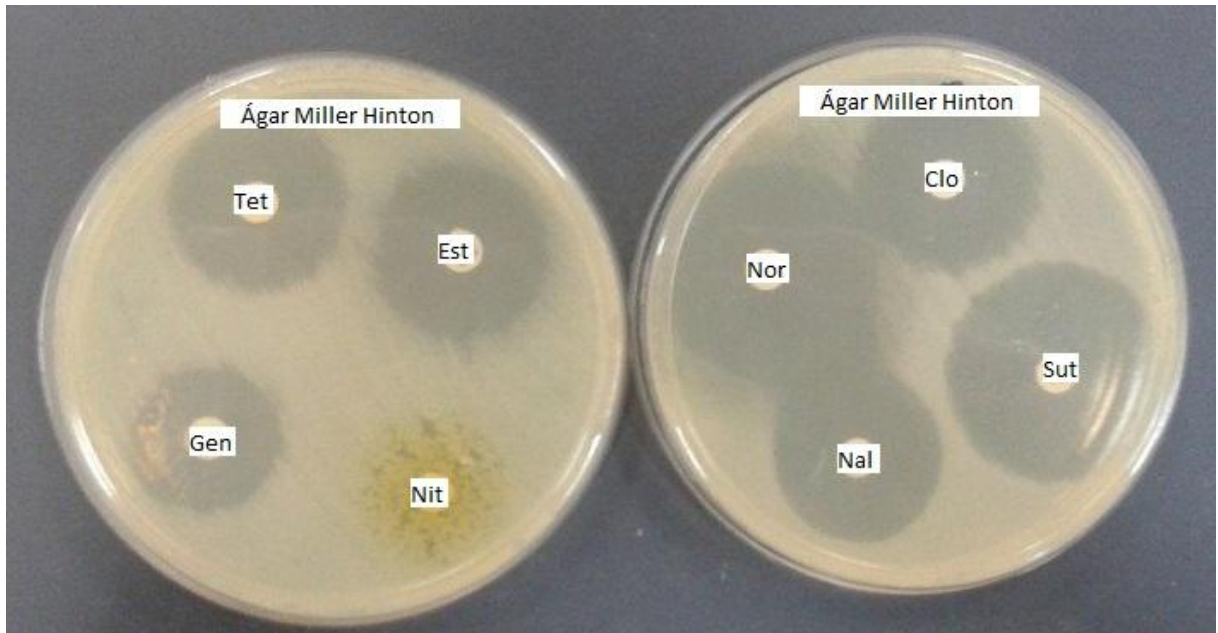


Figura 1- Teste de Antibiograma em Ágar Mueller Hinton de um isolado de *Salmonella* spp. obtido a partir de amostras de ovos de galinha provenientes de propriedade rural.

Legenda Tet – Tetraciclina; Est – Estreptomicina; Gen – Gentamicina; Nit – Nitrofurantoína; Clo – Cloranfenicol; Nor – Norfloxacin; Sut – Sulfazotrim; Nal – Ácido Nalidíxico.

As cepas 3 e 4 se mostraram sensíveis a todos antibióticos testados. Na figura 2 está representado o teste de antibiograma realizado com o isolado 3 onde se pode observar o perfil de sensibilidade a todos os antibióticos testados.

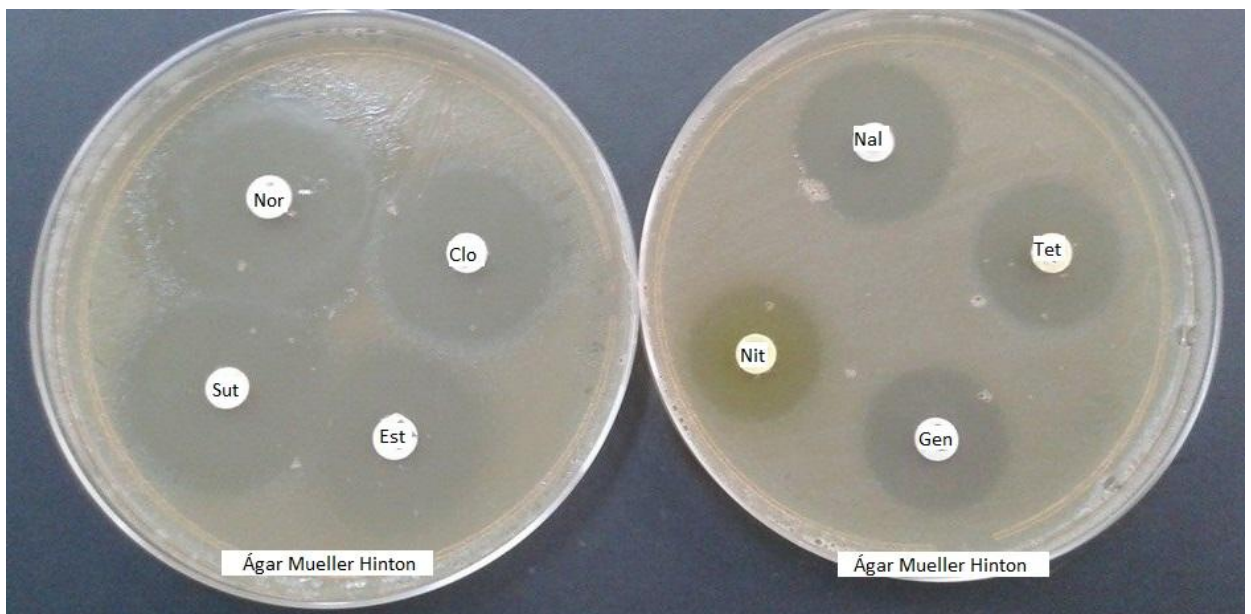


Figura 2- Teste de Antibiograma em Agar Mueller Hinton de um isolado de *Salmonella* spp. obtido a partir de amostras de ovos de galinha provenientes de propriedade rural.

## 5 Discussão

### 5.1 Isolamento e identificação bacteriana

O resultado deste trabalho é semelhante ao de Kottwitz et al (2008), que avaliou a contaminação por *Salmonella* spp. em uma cadeia de produção de ovos no estado do Paraná, onde nenhum ovo contaminado com *Salmonella* spp foi encontrado. Este fato pode ser devido ao maior cuidado com a saúde e higiene das galinhas e ovos que são mantidas nos aviários, o que causa uma diminuição na contaminação ou mesmo ausência de transmissão vertical do patógeno.

No trabalho de Peresi et al (1998) realizado em São Paulo, foram investigadas doze amostras de ovos de galinha produzidos em granja, e destes, cinco (41,7%) estavam contaminadas por *Salmonella* spp.. Estes resultados foram superiores aos dados encontrados em nosso estudo, uma vez que não encontramos amostras contaminadas oriundas de granjas. Estes índices de contaminação podem ser atribuídos à manutenção dos ovos em temperatura ambiente, o que favorece a contaminação dos mesmos por bactérias como a *Salmonella* spp.

Assim como no trabalho de Oliveira e Silva (2000), em que foram analisadas 124 amostras de ovos de galinha produzidos em granjas e comercializados em diferentes estabelecimentos da cidade de Campinas-SP, 3,2% dos ovos analisados estavam contaminados, resultado que difere daquele encontrado em nosso estudo, onde nenhum ovo produzido em granja se encontrava contaminado por *Salmonella* spp.

Já no trabalho de Baú, Carvalhal e Aleixo (2001), realizado na cidade de Pelotas – RS foram analisados 288 ovos provenientes de propriedades rurais e 276 ovos provenientes de granjas, sendo que nenhum destes apresentou contaminação por *Salmonella* spp. Resultados estes semelhantes aos encontrados neste estudo, uma vez que, analisando ovos provenientes de granja, também não isolamos esta bactéria, pois estes são locais onde há maior inspeção sanitária e higiene na linha de produção, diminuindo as chances de contaminação por micro-organismos. Porém, quando se trata de ovos provenientes de propriedades rurais há uma

diferença nos resultados, pois no nosso trabalho 8% das amostras estavam contaminadas. A presença da salmonela dentro do ovo pode ser resultante da migração do micro-organismo a partir da casca contaminada e o armazenamento em locais com falta de higiene pode ser um fator que favorece esta contaminação.

Porém, no trabalho de Flôres et al (2003) realizado na cidade de Santa Maria – RS, 360 ovos obtidos diretamente de produtores rurais foram analisados, e destes, 10% estavam contaminados por *Salmonella* spp., resultado semelhante ao encontrado neste estudo, que apresentou 8% das amostras contaminadas. Este índice de contaminação pode se justificar pelo fato de que nas propriedades rurais, as galinhas poedeiras são criadas livres e muitas vezes sem o manejo e as normas sanitárias adequadas, em locais onde não há controle sanitário e que permitem o contato estreito de ovos e aves com os micro-organismos.

Estudos indicam que o armazenamento dos ovos em temperaturas baixas e constantes é eficaz no controle de *Salmonella* spp.. A manutenção dos ovos sob refrigeração previne que esta bactéria eventualmente contamine, se multiplique e atinja altas populações, portanto, ovos devem ser refrigerados até seu consumo.

Assim, para garantir uma maior qualidade sanitária do ovo, são necessárias técnicas adequadas de produção, coleta, armazenamento e comercialização, as quais reduzem a contaminação por *Salmonella* spp., minimizando riscos à saúde pública.

## 5.2 Teste de Antibiograma

O trabalho de Ribeiro et al (2006) testou a sensibilidade de *Salmonella* frente a diversos antibióticos, dentre eles Ácido Nalidíxico (30µg), Gentamicina (10µg), Sulfazotrim (25µg), Cloranfenicol (30µg), Estreptomicina (10µg), Nitrofurantoína (30µg), Tetraciclina (30µg), Norfloxacin (10µg). As cepas de *Salmonella* spp. se mostraram 100% resistentes à Tetraciclina, Estreptomicina e Sulfazotrim, se mostraram resistentes também a Ácido Nalidíxico (86,36%), Nitrofurantoína (18,18%) e Cloranfenicol (4,54%). No presente trabalho, das 4 amostras contaminadas por *Salmonella* spp. duas foram sensíveis a todos antibióticos testados e duas (50%) se mostraram resistentes somente a Nitrofurantoína. Estas distinções no perfil de sensibilidade dos antibióticos podem ocorrer devido aos diferentes mecanismos de ação dos antibióticos perante aos micro-organismos.

Moreira e Morais (2002) verificou a resistência a antibióticos em bactérias Gram-negativas isoladas de carcaças de frangos, onde foram testados 17 antibióticos diferentes e *Salmonella* spp se mostrou resistente à Nitrofurantoína, Cloranfenicol, Sulfazotrim e Ácido Nalidíxico. Em nosso trabalho, as cepas de *Salmonella* spp. isoladas se apresentaram resistentes somente à Nitrofurantoína.

Barroso (2011) realizou uma pesquisa de sensibilidade a antibióticos, utilizando Ampicilina, Sulfazotrim, Tetraciclina, Penicilina, Estreptomicina e Tetraciclina. *Salmonella* spp. se mostrou resistente a Estreptomicina e Tetraciclina, estes resultados diferem do deste trabalho, e isto pode ser explicado pelo fato de antibióticos serem misturados à ração como promotores de crescimento de frangos ou mesmo na terapia de prevenção de doenças, este fato pode aumentar o perfil de resistência das bactérias frente aos antibióticos.

No trabalho de Cardoso et al (2006) foram realizados testes de sensibilidade de cepas de *Salmonella* spp. obtidas de carcaça de frango, onde os resultados obtidos concordam com os do presentes estudo. Dentre os antibióticos testados Gentamicina, Norfloxacin, Sulfazotrim foram eficientes contra a *Salmonella* spp., porém a mesma se mostrou resistente ao antibiótico Nitrofurantoína (em 90% das amostras), mostrando um resultado semelhante ao encontrado neste estudo que verificou resistência de 50% dos isolados a Nitrofurantoína.

## **6 Conclusão**

Após a análise de 50 ovos pôde-se constatar que 4 ovos (8%) de galinha apresentaram contaminação por *Salmonella* spp., sendo que destes todos eram provenientes de propriedades rurais.

Dos quatro isolados confirmados como *Salmonella* spp., dois se mostraram resistentes a Nitrofurantoína.

A presença de *Salmonella* spp. nos alimentos estudados constitui um risco potencial à saúde do consumidor, devendo estes, portanto serem conservados em locais com cuidados de higiene e sofrerem cocção adequada para prevenção de surtos por patógenos.

## Referências

AKUTSU, C.; BOTELHO, A.; CAMARGO, B.; SÁVIO, O.; ARAÚJO, C. Adequação das boas práticas de fabricação em serviços de alimentação. **Revista de Nutrição**, v.18, n.3, p. 419-427, 2005.

ANDRADE, N.; SILVA, R.; BRABES, K. Avaliação das condições microbiológicas em unidades de alimentação e nutrição. **Ciências Agrotécnicas**, v. 27, n. 3, p. 590-596, 2003.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RESOLUÇÃO – RDC Nº 216, DE 14 DE SETEMBRO DE 2004**. Brasília - DF, 2004.

BAÚ, C.; CARVALHAL, B.; ALEIXO, J. Prevalência de *Salmonella* em produtos de frango e ovos de galinha comercializados em Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 31, n. 2, p. 303-307, 2001.

BARANCELLI, G.; MARTIN, J.; PORTO, E. *Salmonella* em ovos: relação entre produção e consumo seguro. **Segurança alimentar e nutricional**, v.19, n. 2, p. 73-82, 2012.

BARROSO, João Pedro Guedes. **Isolamento de *E. coli*, *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp. e susceptibilidade a antibióticos e desinfetante usados na indústria alimentar**. 2011. 30f. Monografia(Licenciatura em Engenharia Biológica e alimentar) – Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Castelo Branco, Portugal.

CARVALHO, F.; BARRETO, N.; REIS, C.; HOFER, E.; VIEIRA, R. Susceptibilidade antimicrobiana de *Salmonella* spp. isoladas de fazendas de carciniculturas no Estado do Ceará. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 40, n. 4, p. 549-556, 2009.

CORREA, C.; SANTOS, I.; ASSUNÇÃO, R. Salmonella e os ovos um perigo real? **Revista CERTUS**, v. 22, n. 6, p.12-13, 2011.

FLÔRES, M. L. et al. Análise da contaminação por Salmonella em ovos do tipo colonial através da reação em cadeia da polimerase. **Revista Ciência Rural**, v. 33, n. 3, p. 553-557, 2003.

FRANCO, B.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2006. 182p.

HAMMER, K.; CARSON, C.; RILEY, T. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**. v. 4, n. 86, p. 985-990, 1999.

KATAYAMA, E.; DONATO, T.; VERCESE, F.; GARCIA, E.; OKAMOTO, A.; FILHO, R. Detecção de *Salmonella* Enteritidis em ovos de codornas japonesas submetidas a estresse cíclico pelo calor. **Veterinária e Zootecnia**, v.2 n. 3, p. 373-380, 2012.

KONEMAN, E.; ALLEN, S.; JANDA, D. **Diagnóstico microbiológico**—texto e atlas colorido. 5.ed. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica, 2001. 1465p.

KOTTWITZ, L.; BACK, A.; LEÃO, J.; ALCOCER, I.; KARAN, M.; OLIVEIRA, I. Contaminação por *Salmonella* spp. Em uma cadeia de produção de ovos de uma integração de postura comercial. Revista **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 2, p. 496-498, 2008.

MEIRELES, Marlise Aparecida de Oliveira Martins. **Uso de antimicrobianos e resistência bacteriana: aspectos socioeconômicos e comportamentais e seu impacto clínico e ecológico**. 2008. 47f. Monografia (Especialista em Microbiologia) - Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MINISTÉRIO DA SAÚDE: Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs). Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/doencas-transmitidas-por-alimentos-dta> Acesso em 18 nov 2014.

MOREIRA, M.; MORAES, C. Resistência a antibióticos em bactérias Gram-negativas isoladas de carcaças de frangos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n.1, p.156-165, 2002.

OLIVEIRA, D.; SILVA, E. *Salmonella* em ovos comerciais ocorrência, condições de armazenamento e desinfecção da casca. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n.6, p. 310-322, 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE: Resistência a los antimicrobianos. Disponível em: <http://www.who.int/drugresistance/es/> Acesso em 29 abr 2013.

PINTO, A. Doenças de origem microbiana transmitidas pelos alimentos. **Millenium**, v. 4, n. 28, p. 91-100, 2006.

PIRAGINE, K. O. **Aspectos higiênicos e sanitários do preparo da merenda escolar na rede estadual de ensino de Curitiba**. 122f. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2005.

PERESI, J.; ALMEIDA, I.; LIMA, S.; MARQUES, D.; RODRIGUES, E.; FERNANDES, S.; GELLI, D.; IRINO, K. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos causados por *Salmonella* Enteritidis. **Revista de Saúde Pública**, v. 32, n. 5, p. 477-483, 1998.

RIBEIRO, A.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L.; FITTÉL, A.; NASCIMENTO, V. Resistência Antimicrobiana em *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Hadar isoladas de carcaças de frango. **Revista Arquivo Instituto de Biologia**, v. 73, n. 3, p. 357-360, 2006.

SANTOS, R.; NASCIMENTO, P.; OLIVEIRA, D.; FLORES, L.; PONTES, A.; PILOTTO, F.; NEVES, N.; SALLE, P.; LOPES, F. Identificação de *Salmonella* através da reação em cadeia pela polimerase (PCR). **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.29, n.2, p.87-92, 2001.

SERVSAFE, **Princípios Básicos de Segurança Alimentar**. Rio de Janeiro: Instituto de Hospitalidade, 2003. 400p.

SHELEF, L. A. Antimicrobial effects of spices. **Journal of Food Safety**, v.6, n.1, p.29-44, 1983.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Avícola**, v. 4, n. 2, p. 85-100, 2002.

SILVA, N; JUNQUEIRA, A.; SILVEIRA, A. **Deteção da *Salmonella***. In: SILVA, N; JUNQUEIRA, A.C.V; SILVEIRA, A.F. Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo: Livraria Valera, 1997. n.5, p. 41-52.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. São Paulo: Ed. Artmed, 10ª ed., 2012. 934p.



OLIVEIRA, D.; SILVA, E. Salmonela em ovos comerciais: ocorrência, condições de armazenamento e desinfecção da casca. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 6, p. 655-61, 2000.

VERMELHO, Alane B.; PEREIRA, Antônio F.; COELHO, Rosalie R.; PADRÓN, Thais S. **Práticas de Microbiologia**. 1, ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A, 2006. 204 p.

VIGILÂNCIA SANITÁRIA: Doença Transmitida por Alimento (DTA). Disponível em: <<http://www.vigilanciasanitaria.sc.gov.br/index.php/inspecao-de-produtos-e-servicos-de-saude/alimentos/91-area-de-atuacao/inspecao-de-produtos-e-servicos-de-saude/alimentos/415-doenca-transmitida-por-alimento-dta>> Acesso em 18 nov 2014.

ZAMORA, J.; CHAVES, C.; ARIAS, M. Comparación del perfil de sensibilidad a antibióticos de cepas de *Listeria monocytogenes* y *Salmonella* spp. aisladas a partir de alimentos con cepas de origen clínico. **Revista Caracas**, v. 56, n. 2, p.132-140, 2006.