

PESQUISA DE *SALMONELLA* E DAS CONDIÇÕES HIGIÊNICO-SANITÁRIAS EM FRANGOS E LINGÜIÇAS COMERCIALIZADOS NA CIDADE DE BOTUCATU.

José Guilherme Prado Martin, Vera L. M. Rall, Cíntia Satie. Gushiken, Marcos das Neves Gusmão Homem, João Manuel Grisi Candeias, João Pessoa Araújo Júnior. – Microbiologia – Ciências Biológicas – Departamento de Microbiologia - Instituto de Biociências – Campus de Botucatu.

Nos últimos 30 anos, o hábito de consumo de carne de frango por parte dos brasileiros vem mudando, devido à queda gradual de preço, à boa qualidade e a praticidade dos produtos oferecidos. Hoje, o consumo praticamente se equiparou com o de carne bovina, até então, a preferida. Aves criadas para consumo humano podem ser hospedeiras naturais de microrganismos prejudiciais à saúde, como *Campylobacter* sp, *Salmonella* sp. e *E. coli*, sendo os principais causadores de gastroenterites. *Salmonella* apresenta amplo espectro de hospedeiros, dentre os quais as aves e os suínos são destaque. Esse gênero compreende bacilos Gram-negativos não produtores de esporos, anaeróbios facultativos e a maioria são móveis (exceção de *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*).

Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar as condições higiênico-sanitárias de carne de frango e diversos tipos de lingüiças, pela determinação do Número Mais Provável (NMP) de coliformes fecais (CF), além da pesquisa de *Salmonella*.

Na técnica de tubos múltiplos, 25 g foram homogeneizados com 225 ml de água tamponada, seguida de diluições decimais seriadas. Foi inoculado 1 ml de cada diluição, em uma série de três tubos por diluição, com 10ml de caldo lauril sulfato com um tubo de Durham invertido. Os tubos foram incubados a 35°C, por 24-48 horas. Os inóculos positivos apresentaram gás no tubo de Durham. A seguir, três alçadas de cada tubo positivo foram repicadas para 5 ml de caldo E.C., para a confirmação de CF, que foram incubados a 45°C, por 24 horas. A seguir, foi realizada a leitura pela observação da presença de gás no tubo de Durham invertido. O NMP de CF por grama de amostra analisada foi calculado com a tabela de NMP.

Para o isolamento de *Salmonella*, 25 g foram homogeneizados com 225 ml de água tamponada peptonada, incubado a 35°C/24 horas. Em seguida, foi transferido 1 mL do homogeneizado para 10 mL de caldo tetrationato com iodeto de potássio, incubado a 35°C/24 horas. Outra alíquota de 0,1 mL foi transferida para 10 mL de caldo Rapaport, incubado a 42°C/24 horas. Após este período, uma alçada de cada tubo foi semeada ágar XLD (xilose-lisina-desoxicolato) e ágar SS (*Salmonella-Shigella*), com incubação a 35°C/24 horas. A seguir, as colônias características foram submetidas ao API 20 E (Biomérieux). Com a confirmação dos testes, as cepas foram testadas frente aos soros polivalente somático e flagelar.

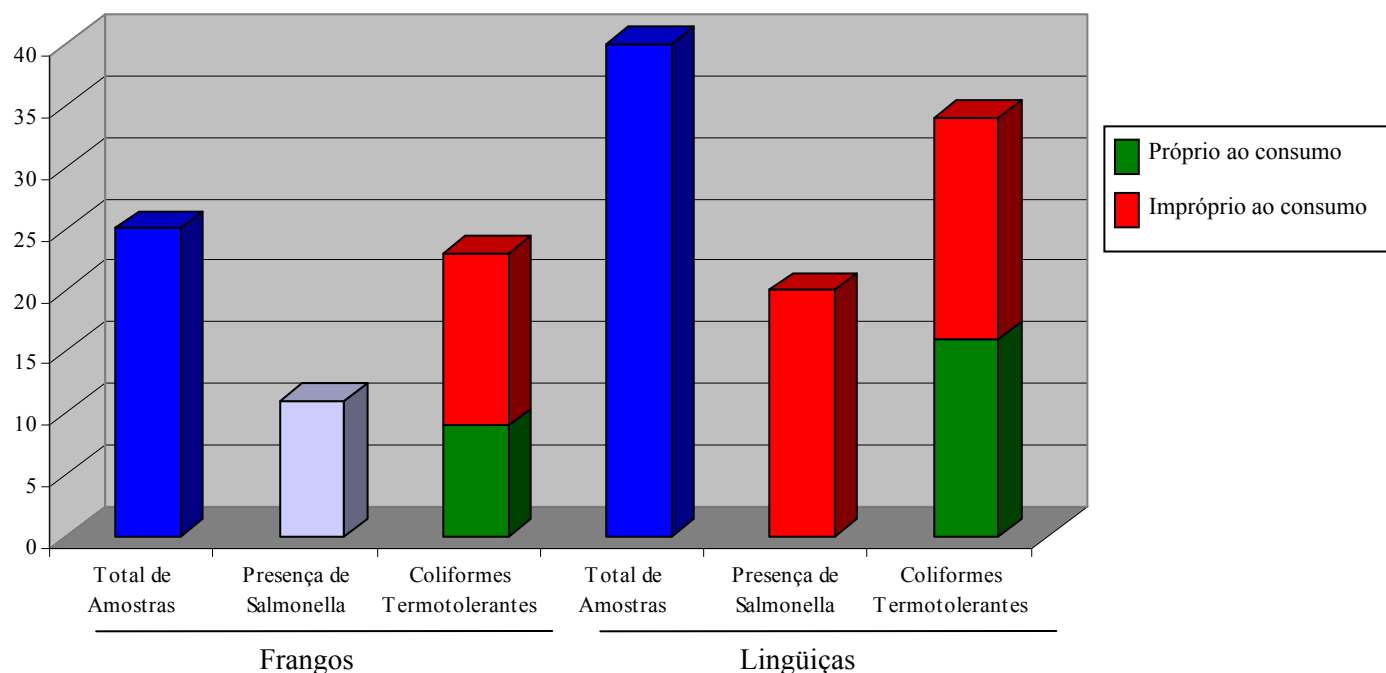
Paralelamente, a partir dos caldos de enriquecimento, ocorreu a pesquisa da presença de *Salmonella* pela PCR. Para tal, 1 ml de cada caldo foi centrifugado a 10.000g/10 minutos, o sobrenadante era desprezado e o sedimento era ressuspensão em 1 ml de PBS. Esse passo foi repetido mais duas vezes, com tempo de centrifugação de 5 minutos. A seguir, o sedimento foi ressuspensão em 200 µl de tampão de lise, incubado em banho-maria a 56°C/1 hora e a 95°C/10 minutos. Ocorreu nova centrifugação a 13.000g/5 minutos e o sobrenadante foi usado para a reação da PCR.

Para essas reações, o volume total foi de 25 µL, composto por 2,5 µL de PCR Buffer 10x, 0,75 µM de Cloreto de Magnésio, 200 µM de cada dNTP, 1 U de Taq DNA Polimerase, 10 picomoles de cada *primer*, água ultrapura autoclavada e 3 µL da amostra de DNA. A incubação foi realizada em termociclador PTC-100 (MJ Research, Inc.) com os parâmetros de um ciclo inicial a 94°C durante 5 minutos para desnaturação inicial, seguidos por 35 ciclos com 94°C/30s, 60°C/30s e 72°C/30s. A temperatura de extensão final foi de 72°C por 4 minutos. Como controle positivo, foi utilizada uma cepa padrão de *Salmonella* ATCC 13076.

Segundo a Figura 1, foram analisadas 25 amostras de carne de frango, onde 14 (56%) estavam fora dos parâmetros microbiológicos, segundo a RDC nº12 da ANVISA (2001) ($>10^4$ coliformes termotolerantes/g). Embora a presença de *Salmonella* não esteja mencionada nesse parâmetro, 2 (8%) entre as 25 também apresentaram o patógeno pela metodologia tradicional. Essa presença foi confirmada pela PCR, que também foi positiva para mais 9 (36%) amostras, num total de

11 positivas (44%) nessa metodologia (Figura 2). Na enumeração de coliformes termotolerantes, CARDOSO et al. (2005) relatam somente 26% de amostras impróprias para consumo entre as 35 analisadas e encontraram *Salmonella* em 4 (11,4%). BAÚ et al. (2001) e CARVALHO et al. (2005) relatam a presença desse patógeno em, respectivamente, 10,5% e 20% das amostras analisadas, números inferiores aos encontrados nesta pesquisa.

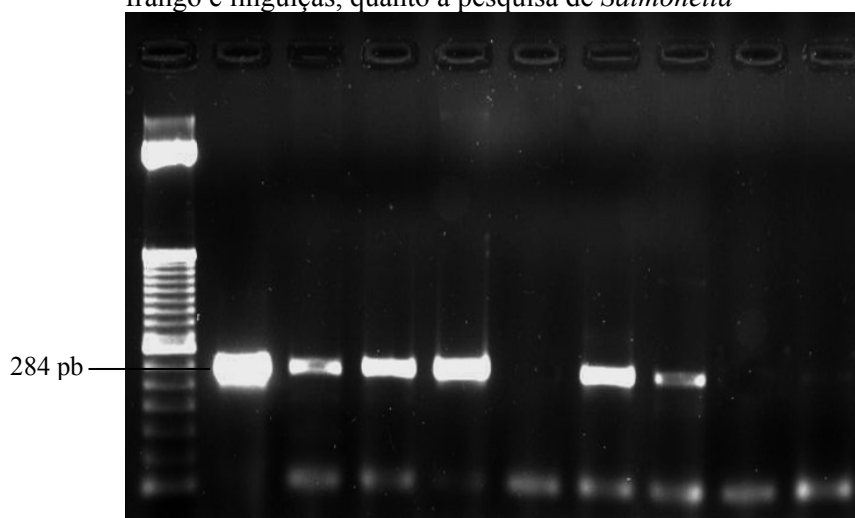
Figura 1: Perfil microbiológico das amostras de frango e lingüiças, quanto à presença de *Salmonella* e enumeração do Número Mais Provável de coliformes termotolerantes, segundo a RDC N° 12, 2001 (ANVISA).



Os padrões microbiológicos para lingüiças permitem até 5×10^3 de coliformes termotolerantes/g e não toleram a presença de *Salmonella* em 25 g do alimento. Ainda pela Figura 1, pode-se observar que, entre as 40 amostras de lingüiças, 19 (47,5%) estavam fora dos limites permitidos, com 3 amostras positivas para *Salmonella*, pela metodologia tradicional. Entretanto, se considerarmos a pesquisa por PCR, o número de amostras positivas aumenta para 20 e assim, 90% das lingüiças estavam impróprias para o consumo.

SALVATORI et al. (2003) relatam somente 7% de lingüiças frescas fora dos parâmetros permitidos para coliformes termotolerantes e ausência de *Salmonella* nas 14 amostras. Embora o presente trabalho tenha encontrado positividade para *Salmonella* em 50% das amostras, deve ser ressaltado que esse resultado foi obtido pelo uso da PCR. Se considerarmos somente a metodologia tradicional, também utilizada por SALVATORI et al. (2003), esse número cai para 3, correspondente a 7,5%, valor semelhante ao obtido pelos citados autores. LOGUÉRCIO et al. (2002), usando metodologia tradicional, encontraram o patógeno em 11,8% das amostras de lingüiças coletadas no comércio varejista de Pelotas e Santa Maria, RS. Outros estudos, porém, apresentam altas taxas de prevalência, tais como FUZIHARA & FRANCO (1993), com 33% de amostras contaminadas provenientes de Santo André, SP, e REIS et al. (1995), que detectaram *Salmonella* em 35,3% das amostras de lingüiça fresca pesquisadas em Cuiabá, MT, taxas próximas às detectadas no presente estudo.

Figura 2: Resultado nas análises de PCR, frente às amostras de frango e lingüiças, quanto a pesquisa de *Salmonella*



Poço 1: Peso molecular (50pb); poço 2: *Salmonella* Choleraesuis ATCC 13076; poços 3, 4, 5, 7 e 8: amostras positivas; poços 6 e 9: amostras negativas; poço 10: controle negativo.

Pelos resultados obtidos nesse trabalho, pode-se concluir que esses alimentos representam perigo à saúde dos consumidores, uma vez que *Salmonella* foi isolada em 44% e 50% das amostras de frango e lingüiças, respectivamente. Em relação às metodologias utilizadas, a de PCR se mostrou mais sensível do que a tradicional.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico de Padrões Microbiológicos para Alimentos, Resolução RDC Nº 12, 2001 (<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/index.htm> , acesso em 3/08/2006)

ANDREWS, W.H.; FLOWERS, J.S.; BAILEY, J.S. *Salmonella*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. American Public Health Association Washington, 4th edition. 2001. p.357-380.

ARNOLD, T.; SCHOLZ, H. C.; MARG, H.; ROSLER, U.; HENSEL, A. Impact of *invA*-PCR and culture detection methods on occurrence and survival of *Salmonella* in the flesh, internal organs and lymphoid tissues of experimentally infected pigs. Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, University of Leipzig, Germany. **J. Vet. Med.**,v. 51, p.459-463, 2004.

BAÚ, A. C., CARVALHO, J. B., ALEIXO, J. A. G. Prevalência de *Salmonella* em Produtos de Frangos e Ovos de Galinha Comercializados em Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.31, n. 2, p. 303-307, 2001.

CARDOSO, A. L. S. P., CASTRO, A. G. M., TESSARI, E. N. C., BALDASSI, L., PINHEIRO, E. S. Pesquisa de *Salmonella* spp, coliformes totais, coliformes fecais, mesófilos, em carcaças e cortes de frango. **Higiene. Alimentar**, v. 19, n. 128, p. 144-150, 2005.

CARVALHO, A. C. F. B., CORTEZ, A. L. L. *Salmonella* spp. em carcaças, carne mecanicamente separada, lingüiças e cortes comerciais de frango. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1465-1468, 2005.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. 1 ed. São Paulo, 1996. 182.

FUZHARA, T.O., FRANCO, B. D. G. M. Bactérias patogênicas e bactérias indicadoras de higiene em carne suína comercializada em Santo André – São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.13, n.1, p.77-88, 1993.

KORNACKI, J.L. & JOHNSON, J.L. *Enterobacteriaceae*, coliforms, and *Escherichia coli* as quality and safety indicators. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. American Public Health Association Washington, 4th edition. 2001. p.69-82.

Referências Bibliográficas