Capítulo 21

DOI: 10.53934/agronfy-2025-02-21

PESQUISA E CARACTERIZAÇÃO DE *Salmonella* spp. E *E. coli* EM CARNE DE FRANGO CRUA REFRIGERADA COMERCIALIZADA EM SÃO PAULO

Lucas Rodrigues de Lima[1]*; Christiane Asturiano Ristori[2]; Cecília Geraldes Martins[2]; Ruth Estela Gravato Rowlands[2]

[1]Estudante do Curso de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – IAL Central; E-mail: lucasl@alumni.usp.br
[2]Pesquisadora do Núcleo de Microbiologia do Instituto Adolfo Lutz

Resumo: O presente estudo teve como objetivo avaliar os padrões microbiológicos de amostras de peito de frango cru refrigerado, com osso e pele, segundo os parâmetros estabelecidos na Instrução Normativa nº 161, de 1º de julho de 2022, da ANVISA e realizar a caracterização genotípica dos isolados de *Salmonella* spp. e *E. coli* pela pesquisa de genes de virulência. Foram analisadas 63 amostras, coletadas em estabelecimentos comerciais de 16 municípios do estado de São Paulo. Do total de amostras analisadas, oito (12,7%) foram consideradas em desacordo com a legislação por apresentarem bactérias aeróbias mesófilas acima do limite tolerado na legislação. A população de bactérias aeróbias mesófilas variou de 1,0 x10^3 a > 2,5 x 10^7 UFC/g, enquanto as contagens de *E. coli* variaram de < 10 a 7,0 x 10 UFC/g. Dentre as 51 cepas de *E. coli* isoladas, duas foram identificadas como EPEC atípica pela presença do gene *eae*. *Salmonella* spp. foi detectada em sete (11,1%) amostras, sendo identificados os seguintes sorotipos: *S.* Schwarzengrund (2), *S.* Minnesota (2), *S.* Heidelberg (2) e *S.* Soerenga (1). Todas as cepas de *Salmonella* spp. foram positivas para o gene *invA* e apenas duas cepas, pertencente ao sorotipo Soerenga, foram positivas para o gene *fliC*. Os resultados do presente estudo reforçam a importância da educação contínua do consumidor quanto à manipulação adequada de produtos cárneos crus, evitando, principalmente, a contaminação cruzada e, consequentemente, a ocorrência de casos e surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos.

Palavras–chave: *E. coli*, Produtos avícolas, *Salmonella* spp., virulência.

[1] Estudante do Curso de Vigilância Laboratorial em Saúde Pública – IAL/CALI/NMA; E-mail: lucasl@alumni.usp.br
[2] Núcleo de Microbiologia, Centro de Alimentos, Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, Cerqueira César, São Paulo, SP, CEP: 01246-000.

INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor de carne de frango do mundo e o maior exportador, atingindo cerca de 150 países. Com um consumo médio de 45,1 kg/hab, em 2023, a carne de frango é um dos alimentos mais consumidos da dieta brasileira (ABPA, 2024).

Diante desse cenário, é fundamental o emprego de medidas que garantam a qualidade higiênico-sanitária da carne e seus derivados em todas as etapas de produção, visando diminuir o risco de transmissão de doenças (HACHIYA *et al.*, 2020). O não cumprimento das Boas Práticas de Fabricação (BPF) pode favorecer a presença de microrganismos patogênicos provenientes do ambiente de processamento, dos manipuladores e de outras aves contaminadas, com potencial de causar gastroenterites, como *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Listeria* spp., *Escherichia coli e S. aureus* (GONÇALVES-TENÓRIO *et al*., 2018; MASHAYEKH et al., 2022).

Dentre esses microrganismos, *Salmonela* spp., destaca-se como um dos principais microrganismos associado com casos e surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA) em diversos países (BRASIL, 2024; CHANAMÉ *et al*., 2022). A maioria dos sorotipos desse gênero é nociva ao homem, levando a manifestações clínicas que variam de acordo com os mecanismos de patogenicidade do microrganismo e das condições do hospedeiro como resposta imune e idade (SHINOHARA *et al*., 2008).

E. coli está presente, predominantemente, no trato intestinal dos humanos e de animais de sangue quente. Em alimentos é considerada indicadora de contaminação de origem fecal e está associada a práticas de higiene inadequadas (BARCO *et al*., 2015). A maioria das cepas são comensais, no entanto algumas podem ser patogênicas e causar doenças intestinais e extra-intestinais tanto em indivíduos saudáveis e imunocomprometidos (XU *et al*., 2022).

Considerando que os alimentos de origem animal representam uma das fontes mais importantes de bactérias patogênicas responsáveis por DTA, a análise microbiológica de produtos cárneos é fundamental para determinar a qualidade e a inocuidade dos mesmos, averiguando se os padrões e especificações microbiológicas nacionais e internacionais estão sendo atendidos. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar os padrões microbiológicos de amostras de peito de frango cru refrigerado, com pele e osso, segundo os parâmetros estabelecidos na Instrução Normativa nº 161, de 1º de julho de 2022, da ANVISA e realizar a caracterização genotípica dos isolados de *Salmonella* spp. e *E. coli* pela pesquisa de genes de virulência.

MATERIAL E MÉTODOS

No período de abril a junho de 2024 foram analisadas 63 amostras de peito de frango cru refrigerado, com pele e osso, coletadas em estabelecimentos comerciais de 16 municípios do estado de São Paulo. As análises microbiológicas foram realizadas de acordo com os parâmetros estabelecidos na Instrução Normativa nº 161, de 1º de Julho de 2022, da ANVISA (BRASIL, 2022) que determina para essa categoria de produto a pesquisa de *Salmonella* spp., enumeração de *E. coli* e bactérias aeróbias mesófilas.

A pesquisa de *Salmonella spp.* foi realizada segundo metodologia descrita na ISO 6579-1:2017 (ISO, 2002) e a sorologia de acordo com o esquema de White-KauffamannLe Minor (GRIMONT & WEIL, 2007). A contagem de *E. coli* foi realizada pelo método de semeadura em profundidade conforme a ISO 16649-2:2001 (ISO, 2001) e de bactérias aeróbias mesófilas pela técnica de semeadura em profundidade de acordo com o

Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods (RYSER *et al*., 2015).

As cepas de *E. coli* e *Salmonella* spp., isoladas das amostras de peito de frango, foram submetidas a caracterização genotípica pela pesquisa de genes de virulência. A pesquisa de genes de virulência nas cepas de *Salmonella* spp e *E. coli* foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR). As cepas de *Salmonella* spp. foram submetidas a PCR multiplex para detecção dos *inv*A, *spv*C e *sef*A e a três PCR simplex para pesquisa dos genes *pef*A, *fli*C e *sdf*I. Como controles positivos foram utilizadas as cepas de referência *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. Com relação às cepas de *E. coli*, a pesquisa dos genes *stx1, stx2, eae e hly* foi realizada por PCR multiplex; dos genes *st* e *agg*R por PCR duplex e dos genes *lt, ipa*H e *bfp* por PCR simplex. Como controles positivos foram utilizadas as seguintes cepas: *E. coli* O157:H7, *E. coli* IAL ST/LT, *E. coli* IAL 2391, *E. coli* IAL 1893, *E. coli* IAL 307 (O124:K72) e *E. coli* O127:k6. Em todas as reações utilizou-se a água ultrapura livre de DNase/RNases como controle negativo.

Para extração do DNA genômico foi utilizando o kit de extração QIAamp® DNA Mini Kit, seguindo as instruções do fabricante. Todas as reações de PCR foram realizadas a partir de uma solução contendo 2 µL de DNA; 12,5 µL de GoTaq® Green Master Mix 200 µM de cada dNTP e 1,5 mM MgCl2 (pH 8,5); 1 µL do *primer* (10 pmoles) e água livre de DNAase e RNAase para um volume final de reação de 25 µL, exceto para a pesquisa dos genes *inv*A, *spv*C e *sef*A em que a quantidade do *primer* foi alterada para 0,5 µL (10 pmoles). Os produtos gerados na PCR foram analisados em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 1x (45 mM de Tris-Borato e 1 mM de-EDTA), contendo brometo de etídio a 0,5 µg/mL. Foi utilizado marcador de peso molecular de 100 bp. A corrida foi realizada a 120 Volts por 1 h e o gel visualizado sob transiluminação UV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as 63 amostras de peito de frango cru analisadas, verificou-se população de bactérias aeróbias mesófilas variando de 1,0 x10^3 a > 2,5 x 10^7 UFC/g, sendo que oito (12,7%) apresentaram contagens acima do limite tolerado pela IN nº 161, de 01/07/2022, da ANVISA, e 12 (19,0%) foram consideradas com qualidade intermediária para esse parâmetro. A presença de mesófilos em grande quantidade sugere falhas na limpeza e desinfecção das superfícies, práticas inadequadas de higiene durante a produção, além de condições inadequadas de tempo e temperatura no processo de produção, transporte e conservação dos alimentos (PENTEADO & ESMERINO, 2011).

Quanto à contagem de *E. coli*, a população variou de < 10 a 7,0 x 10 UFC/g e dentre as amostras analisadas, 28,6% (18/63) foram positivas para *E. coli*, no entanto as contagens estavam abaixo do limite inferior especificado na legislação. Dentre as amostras positivas, 51 cepas foram isoladas e submetidas a pesquisa genes de virulência que caracterizam os patotipos de *E. coli* diarreiogênicas. Todas as cepas foram negativas para os genes *st, stx1, stx2, bfp, lt, hly, ipaH e aggR*. Apenas duas cepas, isoladas da mesma amostra de peito de frango, foram positivas para o gene *eae* que caracteriza o patotipo EPEC. Por sua vez, o gene *bfp* não foi detectado nas cepas de *E. coli* avaliadas, portanto as duas cepas positivas para o gene *eae* foram caracterizadas como EPEC atípica (aEPEC). A baixa frequência de *E. coli* diarreiogênica em carne de frango (1,6%), observada no presente estudo, tem sido descrita no Brasil. Cerutti *et al*. (2020) realizaram a pesquisa dos genes *stx1*, *stx2*, *eae* e *bfp* em 246 carcaças de frango congelada comercializadas no estado de Santa Catarina e detectaram

aEPEC em 4,9% das amostras. Em outro estudo, descrito por Tanabe *et al*. (2019), foram analisadas 103 amostras de peito de frango, coletadas em Botucatu, e 2,9% foram positivas para aEPEC.

Salmonella spp. foi detectada em sete (11,1%) amostras, sendo identificados os seguintes sorotipos: *S*. Schwarzengrund (2), *S*. Minnesota (2), *S*. Heidelberg (2) e *S*. Soerenga (1). Embora tenha sido detectada *Salmonella* nestas amostras, todas foram consideradas de acordo com a Instrução Normativa n°161, da ANVISA, que estabelece, para carnes de aves, ausência de *S*. Enteritidis e *S*. Typhimurium. No Brasil, estudos mostram prevalência de *Salmonella* spp. em carne de aves variando de 8,3% a 46% (GOMES *et al*., 2022; PAVELQUESI *et al*., 2023).

Dentre as amostras positivas para *Salmonella* spp. foram avaliadas 11 cepas quanto ao perfil de virulência. O gene de virulência *inv*A foi detectado em todas as cepas de *Salmonella* spp. Esses resultados corroboram com diversos estudos que detectaram o gene em 100% das cepas provenientes de fontes diversas (MASHAYEKH *et al*., 2022; MORASI *et al*., 2022;). A alta frequência observada entre os isolados sugere que o gene é conservado no gênero *Salmonella* spp., sendo comumente utilizado como marcador para detecção do patógeno (WHANG *et al*., 2009).

O gene *fliC*, que codifica a flagelina, parte estrutural do flagelo da bactéria, (HAIKO *et al*., 2013) foi identificada em duas cepas de *S*. Soerenga, provenientes da mesma amostra. Alegria-Moran *et al*. (2017) detectou o gene *fliC* em todas as 25 cepas de *Salmonella* spp., pertencentes aos sorotipos Typhimurium, Infantis, Enteritidis, Hadar,

Tenessee e Kentucky, isoladas de amostras aves e suínos no Chile. Em contrapartida, Vilela *et al*. (2020) analisou 113 cepas de *S*. Dublin isoladas de humanos e animais e todas foram negativas para o gene.

Para os demais genes pesquisados (*spv*C, *sef*A, *pef*A e *sdf*I), todas as cepas foram negativas. Fardsanei *et al*. (2017) avaliou 34 *S*. Enteritidis isoladas de ovos e produtos cárneos, identificando o gene *spvC* em 100% dessas cepas. O gene *sefA* é exclusivo dos sorotipos pertencentes ao grupo D, como *S*. Enteritidis e *S*. Dublin (MALORNY *et al*., 2007), portanto a ausência nas cepas avaliadas era esperada. Quanto ao gene *pefA*, Thung *et al*. (2018) identificaram o gene em três cepas isoladas em carne bovina, sendo uma *S*. Enteritidis e duas *S*. Typhimurium, enquanto Sever *et al*. (2019) detectaram o gene em *S*. Infantis, isoladas de frangos e perus. O gene *sdfI* é utilizado para confirmar a identificação do sorotipo Enteritidis, que não foi isolado entre as amostras de peito de frango analisadas (AGRON *et al*., 2001).

CONCLUSÕES

Os resultados do estudo demonstraram que, apesar do baixo número de amostras em desacordo com a legislação, foram identificados microrganismos potencialmente patogênicos, sugerindo a necessidade de maior fiscalização e controle de qualidade para garantir a conformidade com os padrões estabelecidos. A presença de patógenos nas amostras reforça, ainda, a importância da educação contínua do consumidor quanto à manipulação adequada de produtos cárneos crus, evitando, principalmente, a contaminação cruzada e, consequentemente, a ocorrência de casos e surtos de DTA.

AGRADECIMENTO

Ao Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais do Instituto Adolfo Lutz pela realização da sorologia de *Salmonella* spp.

REFERÊNCIAS

ABPA - Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório anual 2024**. Disponível em: <https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2024/04/ABPA-Relatorio-Anual-2024_capa_frango.pdf >. Acesso em: 15 mai. 2024.

AGRON, P. *et al*. Identification by Subtractive Hybridization of Sequences Specific for *Salmonella* enterica Serovar Enteritidis. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 67, p. 4984–4991, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.4984-4991.2001>. Acesso em: 15 mai. 2024.

ALEGRIA-MORAN, R. *et al*. First detection and characterization of *Salmonella* spp. In poultry and swine raised in backyard production systems in central Chile. **Epidemiology and infection**, v. 145, p. 3180-3190, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0950268817002175>. Acesso em: 15 mai. 2024.

BARCO, L. *et al*. A systematic review of studies on *Escherichia coli* and Enterobacteriaceae on beef carcasses at the slaughterhouse. ***International Journal of Food Microbiology***, v. 207, p. 3039, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.027>. Acesso em: 23 out. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. Surtos de doenças de transmissão hídrica e alimentar: Informe – 2024. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/dtha/publicacoes/surtos-de-doencas-de-transmissao-hidrica-e-alimentar-no-brasil-informe2024/view. Acesso em: 23 out. 2024.

BRASIL. *INSTRUÇÃO NORMATIVA - IN Nº 161, DE 1º DE JULHO DE 2022*. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CERUTTI, M. *et al*. *Escherichia coli* in Chicken Carcasses in Southern Brazil: Absence of Shigatoxigenic (STEC) and Isolation of Atypical Enteropathogenic (aEPEC). **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 22, n. 1, p. eRBCA-2019-1093, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2019-1093>. Acesso em: 21 mai. 2024.

CHANAMÉ P. L. *et al.* Sources and trends of human salmonellosis in Europe, 2015-2019: an analysis of outbreak data. ***International Journal of Food Microbiology***, v. 379, p. 109850, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2022.109850>. Acesso em: 22 out. 2024.

FARDSANEI, F. *et al*. Genetic diversity and virulence genes of *Salmonella enterica* subspecies enterica serotype Enteritidis isolated from meats and eggs. **Microbial Pathogenesis**, v. 107, p. 451456, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.04.026>. Acesso em: 21 mai. 2024

GOMES, V. T. M. *et al*. Characterization of *Salmonella enterica* Contamination in Pork and Poultry Meat from São Paulo/Brazil: Serotypes, Genotypes and Antimicrobial Resistance Profiles**.** **Pathogens**, v. 11, n. 3, p. 358, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/pathogens11030358>. Acesso em: 23 out. 2024.

GONÇALVES-TENÓRIO, A. *et al*. Prevalence of Pathogens in Poultry Meat: A Meta-Analysis of European Published Surveys. **Foods**. v. 7(5), n. 69, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods7050069>. Acesso em: 17 mai. 2024.

GRIMONT, P. A.; WEIL, F. X. Antigenic formulae of the Salmonella serovars. (9th ed.) Paris: WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella. **Institute Pasteur**, p. 1166, 2007. Disponível em: <https://www.pasteur.fr/sites/default/files/veng_0.pdf>. Acesso em: 22 out. 2024.

HACHIYA, J. *et al*. Contaminação por *Salmonella* spp. durante o processamento de aves em abatedouros. ***Ars Veterinaria***, v. 36, p. 218-229, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.15361/2175-0106.2020v36n4p218-229>. Acesso em: 16 mai 2024.

HAIKO, J.; WESTERLUND-WIKSTRÖM, B. The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. ***Biology,*** v. 2, p. 1242–1267, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biology2041242>. Acesso em: 16 mai. 2024.

ISO 16649-2:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of positive *Escherichia coli*. **International Organization for Standartization**, ed. 1, 2001.

ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs–Horizontal method for the detection of Salmonella spp. **International Organization for Standadization**, ed. 4, 2002.
MALORNY, B. *et al*. A real-time PCR for the detection of ***Salmonella Enteritidis*** in poultry meat and consumption eggs. ***Journal of Microbiological Methods***, v. 70, n. 2, p. 245-251, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.04.013>. Acesso em: 16 mai. 2024.

MASHAYEKH, Z. *et al*. Detection of invA, sivH, and agfA virulence genes in ***Salmonella*** spp. isolated from broiler breeder farms in Alborz Province, Iran. ***Archives of Razi Institute***, v. 77, n. 2, p. 607-614, 2022. DOI: 10.22092/ARI.2021.353674.1607. Disponível em: <https://doi.org/10.22092/ARI.2021.353674.1607>. Acesso em: 16 mai. 2024.

MORASI, R. M. *et al*. Overview of antimicrobial resistance and virulence factors in ***Salmonella*** spp. isolated in the last two decades from chicken in Brazil**.** ***Food Research International***, v. 162, p. 111955, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111955>. Acesso em: 16 mai 2024.

PENTEADO, F.R.; ESMERINO, L.A. Avaliação da qualidade microbiológica da carne de frango comercializada no município de Ponta Grossa –Paraná. **Revista Publicatio UEPG - Ciências Biológicas**, v.17, n.1, p. 37-45, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.5212/publicatio%20uepg.v17i1.3446>. Acesso em: 17 mai. 2024.

PAVELQUESI, L. S. *et al*. Prevalence and Antimicrobial Resistance of S*almonella* spp. Isolated From Chilled Chicken Meat Commercialized at Retail in Federal District, Brazil. **Journal of Food Protection,** v. 86, n. 9, p. 100130, set. 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfp.2023.100130>. Acesso em: 23 out. 2024.

RYSER, E. T.; SCHUMAN, J. D**.** Mesophilic aerobic plate count**.** In: **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 5. ed. Washington, DC: APHA, 2015. cap. 2, p. 13-25.

SEVER, N.; AKAN, M. Molecular analysis of virulence genes of *Salmonella* Infantis isolated from chickens and turkeys**. Microbial Pathogenesis**, v. 126, p. 199-204, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.11.006>. Acesso em: 18 mai. 2024.

SHINOHARA, N. K. S. *et al*.. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, n. 5, p. 1675–1683, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1413-81232008000500031>. Acesso em: 18 mai. 2024.

TANABE, R. H. S. *et al*. Identification and characterization of atypical enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ground beef and poultry breast purchased in Botucatu, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1099-1103, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00101-6>. Acesso em: 23 out. 2024

THUNG, T. Y. et al. Prevalence, Virulence Genes and Antimicrobial Resistance Profiles of Salmonella Serovars from Retail Beef in Selangor, Malaysia. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 2697, 2018, Disponível em: Acesso em: 15 mai. 2024.

VILELA, F. *et al*. Virulence traits and expression of bstA, fliC and sopE2 in *Salmonella* Dublin strains isolated from humans and animals in Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 80, 2020. Disponivel em: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104193>. Acesso em: 22 out. 2024.

WHANG, Y. P. *et al*. Quinolone-resistance in *Salmonella* is associated with decreased mRNA expression of virulence genes invA and avrA, growth and intracellular invasion and survival. **Veterinary Microbiology**, v. 133, p. 328-334, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.07.012>. Acesso em: 22 out. 2024.

XU, X. *et al*. Using *E. coli* population to predict foodborne pathogens in pastured poultry farms. ***Food Microbiology***, v. 108, p. 104092, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104092>. Acesso em: 23 out. 2024.