

Detecção de *Salmonella* spp. a partir de carcaças de bovinos obtidas durante o processamento em abatedouros-frigoríficos em Mato Grosso do Sul: resultados preliminares

Flávio Ribeiro de Araújo¹

Daniele Bier²

Newton Valério Verbisck³

Carlos Alberto do Nascimento Ramos⁴

Dália dos Prazeres Rodrigues⁵

Luiza Mendes Valsoni⁶

Jalusa Deon Kich⁷

Sabrina Castilho Duarte⁸

Resumo

A carne é um dos alimentos mais importantes da dieta da população e possui alto impacto na economia do Brasil. Atualmente o Brasil é o maior exportador de carne bovina do mundo e está nessa liderança desde 2008. Porém, a carne e seus derivados são considerados um dos principais responsáveis pela veiculação de patógenos aos seres humanos (RHOADES et al., 2009), ocasionando as chamadas Enfermidades Transmitidas por Alimentos (ETAs).

A contaminação microbiológica das carcaças bovinas ocorre principalmente durante o processamento e manipulação, como esfolagem, evisceração, cortes, embalagem, estocagem e distribuição (JAY, 2000; BORCH; ARINDER, 2002). A esfolagem é considerada um ponto crítico do abate, devido à possibilidade de contaminação da superfície da carcaça com microrganismos presentes na pele, pelos e cascos

dos animais (LAMBERT et al., 1991). As fezes são consideradas uma das principais fontes de contaminação da carcaça, que pode ocorrer por deposição direta pela pele ou por contato indireto (BORCH; ARINDER, 2002).

Outra forma de contaminação é a infecção cruzada de bactérias patogênicas por meio de utensílios utilizados na manipulação dos alimentos, reconhecidos como importantes veículos de contaminação ao longo da cadeia produtiva da carne e fator importante para o desenvolvimento das doenças de origem alimentar. A contaminação sequencial dos produtos cárneos por meio da transferência de bactérias patogênicas após a contaminação inicial com diferentes níveis de inóculos bacterianos entre diferentes utensílios e equipamentos de processamento (PEREZ-RODRIGUEZ et al., 2010; PAPADOPOULOU et al., 2012).

¹ Médico-Veterinário, Doutor em Imunologia, Pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande – MS

² Médica-Veterinária, Mestre em Ciências Veterinárias, Doutoranda em Ciência Animal pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande – MS

³ Biomédico, Doutor em Ciências, Pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande – MS

⁴ Médico-Veterinário, Doutor em Ciências Veterinárias, Docente da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de

Mato Grosso do Sul, Campo Grande – MS

⁵ Médica, Doutora em Ciências, Chefe do Laboratório de Enterobactérias, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro – RJ

⁶ Graduanda de Medicina Veterinária pela Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande – MS

⁷ Médica-Veterinária, Doutora em Ciências Veterinárias, Pesquisador da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia – SC

⁸ Médica-Veterinária, Doutora em Ciência Animal, Pesquisadora da Embrapa Suínos e Aves, Concórdia – SC

Segundo a Organização Mundial da Saúde, *Salmonella* sp. é um dos microrganismos patogênicos de maior relevância na carne bovina, sendo sua presença indicativa de risco ao consumidor (WHO, 2005). De acordo com a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos, *Salmonella* ser. Typhimurium foi o sorovar mais frequentemente associado ao consumo de carne de aves, suínos e bovinos contaminada (EFSA, 2006).

Para produção e exportação de produtos cárneos de qualidade, é fundamental o desenvolvimento de estudos quantitativos e qualitativos relacionados à segurança microbiológica. A identificação da presença de microrganismos potencialmente patogênicos, como *Salmonella*, nas carcaças de bovinos durante as operações de abate e nos produtos cárneos, vem contribuir de forma significativa com a implantação de programas de monitoramento da qualidade e de medidas preventivas e consequentemente, com a redução de riscos à saúde do consumidor.

Os mercados importadores dos produtos cárneos brasileiros são bastante exigentes quanto à qualidade e segurança microbiológica dos produtos. Os Estados Unidos exigem a realização diária de testes microbiológicos para pesquisa de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp., enquanto a União Europeia exige a enumeração de microrganismos mesófilos aeróbios e enterobactérias, além da pesquisa de *Salmonella* spp. (COMMISSION REGULATION – EU, 2007).

No Brasil, segundo os padrões microbiológicos atuais da ANVISA, a exigência é apenas para carnes resfriadas, ou congeladas, *in natura*, de bovinos (carcaças inteiras ou fracionadas, quartos ou cortes), devendo apresentar ausência de *Salmonella* spp. (BRASIL, 2001)

O objetivo desta pesquisa foi investigar a presença de *Salmonella* spp. em carcaças de bovinos em dois abatedouros-frigoríficos em Mato Grosso do Sul.

Métodos de detecção de *Salmonella* em carcaças

A metodologia oficial disponível para detecção de enterobactérias em carcaças de bovinos pelo método microbiológico tradicional envolve etapas de cultura onerosas e bastante trabalhosas, e necessitam de até sete dias para a confirmação dos resultados.

Atualmente, países importadores estão impondo restrições a mercados que não realizam controle e diagnóstico efetivo de *Salmonella* em carcaças bovinas. E, por isso, a detecção rápida e direta de *Salmonella* spp. em carcaças bovinas é uma demanda do sistema oficial de defesa, que já vem solicitando, com instituições governamentais, novas tecnologias de controle.

Nos últimos anos, a validação e padronização de protocolos de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) pelo método convencional ou em tempo real (qPCR) têm sido relatados, a fim de facilitar a aplicação de métodos mais rápidos para a detecção de patógenos de origem alimentar (DELIBATO et al., 2014).

A utilização da qPCR para a pesquisa de microrganismos em alimentos tem obtido muito sucesso na identificação rápida e de vários patógenos, simultaneamente (CHEN et al., 2012). O uso de qPCR oferece vantagens, quando comparada com a bacteriologia clássica, em termos de acurácia, velocidade, limite de detecção, automatização e, algumas vezes, custo. Entretanto, existem desafios associados com o uso de PCR, como a detecção de baixos níveis de patógenos contaminantes, a baixa habilidade para diferenciar células mortas de viáveis e a ocorrência de componentes inibitórios da reação (IBRAHIM et al., 2014). Esses desafios podem ser superados utilizando caldos de enriquecimentos (CHEN et al., 2012).

A utilização de sequências características dos microrganismos alvos revela a alta especificidade desses testes. Os genes mais frequentemente utilizados para a detecção específica de *Salmonella* incluem: *invA* (gene da invasão proteica), *fimA* (gene que codifica a maior subunidade fimbrial), *spv* (gene da virulência), *stn* (gene da enterotoxina), *fliC* (gene da flagelina) e *hilA* (ativador transcricional do gene da invasão) (IBRAHIM et al., 2014).

Outro grande avanço na detecção de patógenos em alimentos pode ser o uso de estudos proteômicos para diagnóstico rápido, através da utilização da espectrometria de massa para caracterizar o microrganismo característico. A técnica de espectrometria de massas com fonte de ionização e dessorção a laser assistida por matriz –MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization*) e analisador de massas do tipo tempo-de- voo (TOF) permite a reprodutibilidade de espectros, podendo comparar o espectro

de massas, obtido em poucos segundos, com os de referência de cepas conhecidas, podendo proporcionar a detecção do patógeno com mais rapidez do que os métodos convencionais (SIUZDAK, 2006).

Detecção de *Salmonella* spp. em carcaças de bovinos durante o processamento em abatedouros-frigoríficos

Foram realizadas, até o momento, coletas em dois abatedouros-frigoríficos de Campo Grande, sendo coletadas amostras de cinco carcaças por semana durante seis semanas consecutivas, conforme estabelecido pela União Europeia para testes microbiológicos em carcaças (COMMISSION REGULATION – EU, 2007).

As amostras foram coletadas em três pontos diferentes da linha de abate: após a esfolagem, após a lavagem e após a refrigeração. Para a coleta foram utilizadas esponjas hidratadas com água peptonada tamponada (APT) a 1%. As esponjas foram friccionadas no peito, no vazio e na região próxima ao lagarto, utilizando um molde de aço inox esterilizado (Figura 1), com 10 x 10 cm, totalizando 400 cm² de superfície amostrada, e armazenadas em bolsas plásticas esterilizadas.

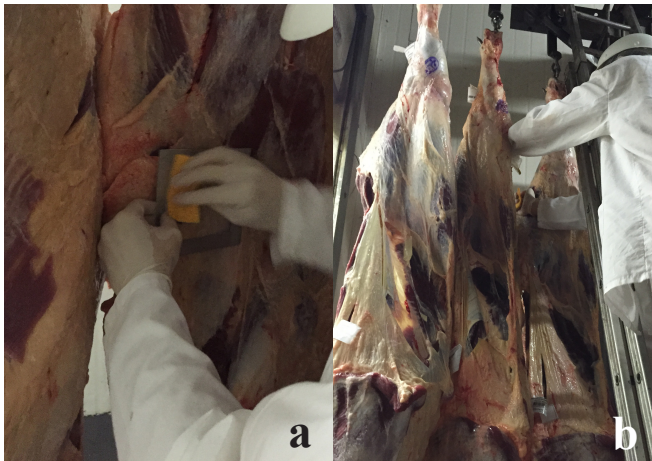


Figura 1. Coleta de amostra de carcaça na região do peito (a) e do lagarto (b), utilizando esponja estéril hidratada e molde de aço inox esterilizado.

Para detecção de *Salmonella* spp. nas amostras de carcaça, foi utilizada a metodologia descrita no *International Organization for Standardization* (ISO 6579:2002) com modificações.

As colônias suspeitas isoladas dos meios de cultivos padrão (Figura 2) foram submetidas às provas bioquímicas complementares, compostas pelas

provas de Indol, ureia, motilidade, produção de H₂S, vermelho de metila, Voges-Proskauer, citrato e β-galactosidase. Foram consideradas como reações típicas para *Salmonella* spp. as seguintes características: urease negativa, indol negativo, H₂S positivo, vermelho de metila positivo, Voges-Proskauer negativo, citrato positivo, motilidade positiva e β-galactosidase negativa.

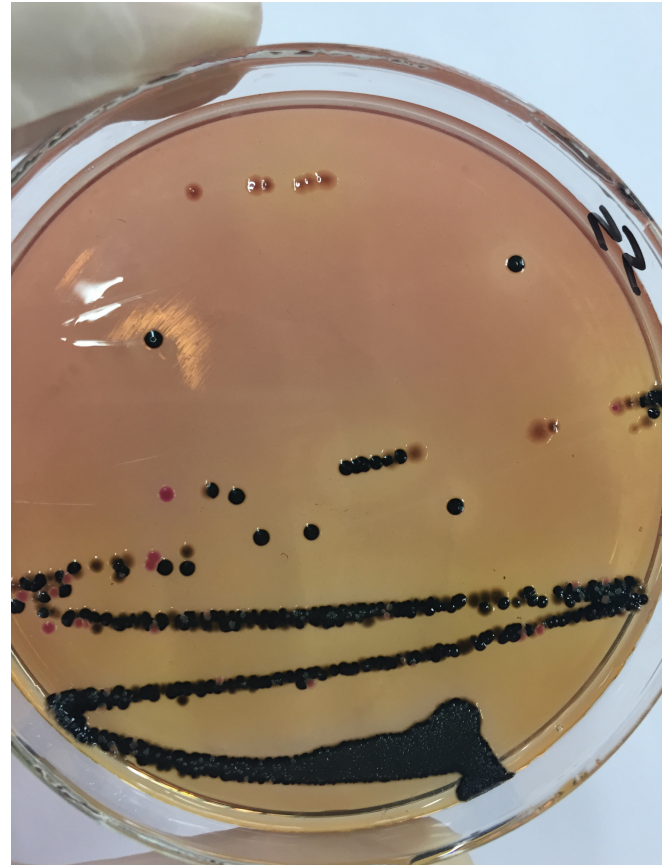


Figura 2. Colônias características de *Salmonella* spp. em ágar *Salmonella-Shigella* (SS), isoladas de amostra de carcaça bovina.

Por meio das provas bioquímicas, das 90 amostras, provenientes de 30 carcaças analisadas no frigorífico I, sete (7,7%) apresentaram *Salmonella* spp, sendo uma após a esfolagem, duas após a lavagem e quatro após a refrigeração. Em relação as 105 amostras, provenientes de 35 carcaças analisadas no frigorífico II, nenhuma foi positiva para *Salmonella* spp (Quadro 1).

Quadro 1. Amostras de carne bovina contaminadas por *Salmonella* após a esfolagem, lavagem e refrigeração, nos frigoríficos I e II.

	Animais positivos	Amostras positivas	Esfola	Lavagem	Refrigeração
Frigorífico I	20% (6/30)	7,7% (7/90)	2,2% (2/90)	1,1% (1/90)	4,4% (4/90)
Frigorífico II	0% (0/35)	0% (0/105)	0% (0/105)	0% (0/105)	0% (0/105)

Em relação às carcaças positivas, apenas uma delas foi positiva em dois locais, sendo a esfola e a refrigeração (Quadro 2).

As cepas isoladas com características bioquímicas compatíveis com *Salmonella* foram testadas por PCR convencional e qPCR para o gene *invA*, associado à virulência, conservado em bactérias do gênero *Salmonella*; e pela técnica de MALDI-TOF.

A extração do DNA bacteriano foi realizado utilizando o “kit” comercial DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN, Valencia, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

A PCR convencional foi realizada segundo Myint et al. (2006), utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores para verificar a presença dos genes de virulência *invA* descritos por Skyberg et al. (2006). Os produtos da amplificação foram separados em gel de agarose 1,5% em TBE 0,5X (tampão borato EDTA – pH 8,2) e realizada a eletroforese. Após, o gel foi corado e a imagem registrada.

Para a qPCR, iniciadores e sondas de DNA para sistema TaqMan MGB foram desenhados com o programa Primer Express (Applied Biosystems) e a detecção de DNA foi realizada em aparelho StepOne Plus (Applied Biosystems).

Para a técnica de MALDI-TOF, foi utilizado o protocolo de lise bacteriana com etanol 70% visando à inativação de bactérias. O preparo das amostras foi realizado com solução de ácido fórmico e acetonitrila. Os espectros foram obtidos pelo espectrômetro de massa MALDI-TOF LT Microflex Bruker (Bruker Daltonics, EUA). Os espectros obtidos foram analisados pelo programa MALDI Biotyper 2.0 (Bruker Daltonics, EUA) com as configurações padrão para obtenção da identificação bacteriana. O algoritmo utilizado pelo MALDI Biotyper confronta os espectros da amostra desconhecida com amostras de referência contidas em um banco de dados de referência.

Cepas da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária-CRMVS, FIOCRUZ-INCQS, Rio de Janeiro, RJ, foram utilizadas como controles negativos e positivos para todas as técnicas: *Escherichia coli* INCQS 00033 (ATCC 25922), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* se-

rovar *Enteritidis* INCQS 00258 (ATCC 13076) e *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* INCQS 00150 (ATCC 14028).

As sete cepas (100%) identificadas bioquimicamente como *Salmonella* spp. também foram confirmadas em ambas as técnicas de PCR e no MALDI-TOF. No entanto, as metodologias alternativas permitiram a identificação do gênero em três dias, em contraste com a metodologia tradicional, que consumiu cinco dias, além de ser mais laboriosa (Figura 3).

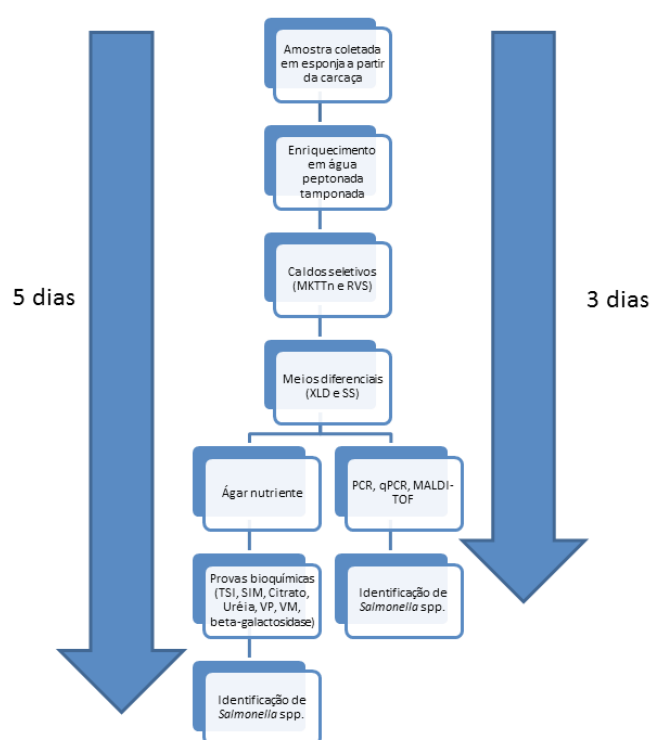


Figura 3. Fluxograma da identificação de *Salmonella* spp., a partir de carcaças de bovinos, utilizando diferentes métodos de diagnóstico.

Os isolados de *Salmonella* spp. confirmados pela PCR foram enviados ao Laboratório de Enterobactérias do Centro de Referência Nacional de Cólera e outras Enteroinfecções Bacterianas da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro – RJ, para sorotipagem completa. Das sete cepas sorotipadas, quatro foram classificadas como serovar *Typhimurium*, uma como serovar *Give* e uma como serovar *Heidelberg* (Quadro 2)

Quadro 2. Amostras de carne bovina contaminadas por *Salmonella* e os locais de positividade nos três pontos diferentes da linha de abate: após a esfolagem, após a lavagem e após a refrigeração. Sorotipagem das amostras confirmadas de *Salmonella* spp.

	Esfola	Lavagem	Refrigeração	Sorotipagem
Carcaça 387	Positiva	Negativo	Negativo	<i>Salmonella</i> ser. Heidelberg
Carcaça 423	Negativo	Negativo	Positiva	<i>Salmonella</i> ser. Give
Carcaça 424	Negativo	Negativo	Positiva	<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium
Carcaça 425	Negativo	Negativo	Positiva	<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium
Carcaça 455	Negativo	Positiva	Negativo	<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium
Carcaça 457	Positiva	Negativo	Positiva	<i>Salmonella</i> ser. Typhimurium

Conclusão

Em um dos abatedouros-frigoríficos testados, houve alta ocorrência de carcaças bovinas contaminadas com *Salmonella* spp., inclusive nas amostras testadas após a refrigeração, ou seja, quando o produto já está pronto para a desossa e distribuição para o consumidor. O sorotipo mais frequentemente identificado foi *Salmonella* Typhimurium, comumente associado com ETAs provocadas por consumo de carne bovina contaminada.

A identificação de *Salmonella* spp. a partir do cultivo em meios diferenciais foi feita por diferentes métodos diagnósticos, que incluem técnicas bioquímicas tradicionais, seguida por sorotipagem; como também por metodologias alternativas, como PCR, qPCR e espectrometria de massas. Nos isolados, todos os testes confirmaram *Salmonella* spp.

As metodologias de espectrometria de massa pelo sistema MALDI-TOF, e genotípica, por meio de PCR convencional e PCR em tempo real são de fácil execução e permitem a confirmação mais rápida da identidade de *Salmonella* spp., a partir dos isolados em meios diferenciais

Com a conclusão posterior deste projeto, podem ser gerados subsídios para um programa de controle de *Salmonella* spp. em carcaças de bovinos, implicando em uma melhor qualidade da carne bovina, mitigando os riscos de infecções humanas de origem alimentar.

Agradecimentos

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect), pelo suporte financeiro para a realização do estudo, processo número 23/200.479/2014.

Referências bibliográficas

- BORCH, E.; ARINDER, P. Bacteriological safety issues in red meat and ready-treat meat products, as well as control measures. *Meat Science*, v. 62, n. 3, p. 381- 390, 2002.
- BRASIL (2001). Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC 12 de 02 de janeiro de 2001. **Regulamento Teórico Sobre Padrões Microbiológicos Para Alimentos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasil, n. 7-E, p. 46-53, 10 de janeiro de 2001, seção 1.
- BRASIL (2011). Secretária de Vigilância em Saúde. **Vigilância epidemiológica das doenças de transmissão hídrica e alimentar- VEDTHA**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/10_passos_para_investigacao_surtos.pdf> Acesso em: 12 ago 2012.
- CHEN, J.; TANG, J.; LIU, Z.; CAI and BAI, X. Development and evaluation of a multiplex PCR for simultaneous detection of five foodborne pathogens. *Journal of Applied Microbiology*, v. 112, p. 823–830, 2012.
- COMMISSION REGULATION – EUROPEAN COMMISSION N° 1441/2007 (amending Regulation (EC) N° 2073/2005). **Microbiological criteria for foodstuffs**. Official Journal of the European Union, L322, p. 12 -29, 2007.
- DELIBATO, E., et al., European validation of Real-Time PCR method for detection of *Salmonella* spp. in porkmeat, *International Journal of Food Microbiology*, 2014 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.01.005>).
- EFSA – European Food Safety Authority. The Community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, antimicrobial resistance and foodborne outbreaks in the European Union in 2005. *The EFSA Journal*, v. 94, p. 3–288, 2006.
- IBRAHIM, W. A.; ABD EL-GHANY, W.A.; NASEF, S.A.; HATEM, M.E. A comparative study on the use of real time polymerase chain reaction (RT-PCR) and standard isolation techniques for the detection of *Salmonellae* in broiler chicks, *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 2014 (<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijvsm.2013.11.001>).
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 6579:2002**: microbiology of food and animal feeding stuffs: horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Switzerland: ISO, 2002. 20p.

JAY, J.M. Fresh meats and poultry. In J. M. Jay (Ed.), **Modern food microbiology**: Aspen Publishers, Inc, p. 59–85, 2000.

LAMBERT, A. D.; SMITH, J. P.; DODDS, K. L. Shelf life extension and microbiological safety of fresh meat. A review. **Food Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 267-97, 1991.

MYINT, M. S.; JOHNSON, Y. J.; TABLANTE, N. L.; HECKERT, R. A. The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated *Salmonella* in raw poultry compared to conventional culture. **Food Microbiology**, v. 23, p. 599-604, 2006.

PAPADOPOULOU, O. S.; CHORIANOPOULOS, N. G.; GKANA, E. N.; et al. Transfer of foodborne pathogenic bacteria to non-inoculated beef fillets through meat mincing machine. **Meat Science**, v. 90, p. 865–869, 2012.

PEREZ-RODRIGUEZ, F.; CASTRO, R.; POSADA-IZQUIERDO, G. D.; et al. Evaluation of hygiene practices and microbiological quality of cooked meat products during slicing and handling at retail. **Meat Science**, v. 86, n. 479–485, 2010.

RHOADES, J. R.; DUFFY, G.; KOUTSOUMANIS, K. Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmo-*

nella enterica and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: a review. **Food Microbiology**, v. 26, n. 4, 357-376, 2009.

SANT'ANA, A. S.; FRANCO, B. D. G. M. Revisão: Avaliação quantitativa de risco microbiológico em alimentos: conceitos, sistemática e aplicações. **Brasileian Journal Food Technology**, v.12, n.4, p. 266-276, 2009.

SIUZDAK, G. **The expanding role of mass spectrometry in biotechnology**. 2.ed. San Diego: MCC Press, 2006. 257p.

SKYBERG, J. A.; LOGUE, C. M.; KOLAN, L.K. 2005. Virulence Genotyping of *Salmonella* spp. with Multiplex PCR. **Avian Diseases**. v. 50, n. 1, p. 77-81, 2006.

WHO - WORD HEALTH ORGANIZATION. **Drug-resistant Salmonella**. **Food Safety Department**. Fact sheet n. 139, 2005. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>>. Acesso em: 06 out 2012.

ZEN, S. **A cadeia de carne bovina no Brasil**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, 2004. Disponível em: < <http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2000/artigo.2004-12-07.2530561427>>. Acesso em: 06 out 2012.

CGPE 12383

Comunicado Técnico 131

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:
Embrapa Gado de Corte
Endereço: Av. Rádio Maia, 830 - Vila Popular,
79106-550 Campo Grande MS
SAC: www.embrapa.br/fale-conosco

1ª edição
Versão online (2015)

**Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

Comitê de publicações

Presidente: Ronney Robson Mamede
Secretário-Executivo: Rodrigo Carvalho Alva
Membros: Elane de Souza Salles, Lucimara Chiari, Andréa Alves do Egito, Davi José Bungenstab, Guilherme Cunha Malafaia, Roberto Giolo de Almeida

Expediente

Supervisão editorial: Rodrigo Carvalho Alva
Revisão de texto e Editoração Eletrônica: Rodrigo Carvalho Alva
Normalização bibliográfica: Autores