

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

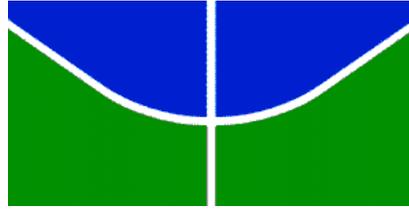
**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE OVOS INSPECIONADOS
COMERCIALIZADOS NA REGIÃO DO DISTRITO FEDERAL**

NARA RÚBIA SOUZA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

BRASÍLIA

2017



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE OVOS INSPECIONADOS
COMERCIALIZADOS NA REGIÃO DO DISTRITO FEDERAL**

NARA RÚBIA SOUZA

ORIENTADOR(A): Prof^a Dr^a ÂNGELA PATRÍCIA SANTANA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM SAÚDE ANIMAL

PUBLICAÇÃO: 141/2017

BRASÍLIA/DF, 17 DE ABRIL DE 2017



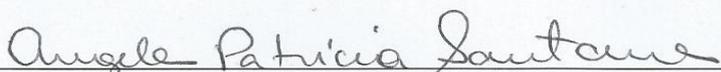
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DE OVOS INSPECIONADOS
COMERCIALIZADOS NA REGIÃO DO DISTRITO FEDERAL**

NARA RÚBIA SOUZA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL, COMO PARTE
DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO
DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE ANIMAL.**

APROVADO POR:



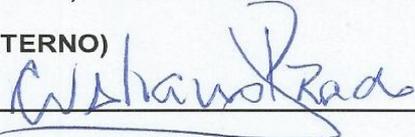
ANGELA PATRICIA SANTANA, PROF. DR. UNIVERSIDADE DE BRASILIA

(ORIENTADOR)



SIMONE PERECMANIS, PROF. DR. UNIVERSIDADE DE BRASILIA

(EXAMINADOR INTERNO)



CRISTIANO SALES PRADO, PROF. DR. UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

(EXAMINADOR EXTERNO)

BRASÍLIA/DF, 17 DE ABRIL DE 2017

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

SOUZA, N.R. **Caracterização Microbiológica de Ovos Inspeccionados Comercializados no Distrito Federal**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2017, p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de

Mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Souza, Nara Rúbia

Caracterização microbiológica de ovos inspeccionados comercializados no Distrito Federal / Nara Rúbia Souza; orientação de Ângela Patrícia Santana, 2017.p.: il.

Dissertação de Mestrado (M) – Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2015.

1. *Salmonella* spp. 2. Caracterização microbiológica. 3. Resistência antimicrobiana.
I. SOUZA, N.R. II.Caracterização microbiológica de ovos inspeccionados comercializados no Distrito Federal.

CDD ou CDU

Agris / FAO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que nos deu o dom da vida e que sempre esteve ao meu lado me dando forças quando já não havia e principalmente me dando saúde.

A meu esposo amado Iran, que me aturou nos instantes em que sacrifiquei o nosso convívio para a realização deste objetivo, sempre me ajudando em todas as etapas e me incentivando. Obrigado amor pela ajuda, pela paciência e pela força. Sem você eu não conseguiria!

A meus pais, Hélio e Cleomarta, pois de nada adiantaria minha caminhada se vocês não tivessem me ensinado os primeiros passos. Em toda minha vida vocês estiveram presentes, mostrando-me a importância da família e do estudo para ser um excelente profissional.

A minha querida filha Laura que mesmo ainda sem entender o motivo de tantas ausências, sempre me recebia com beijos e abraços apertados e que me abastecia com sua alegria para nunca desistir!

As minhas queridas irmãs e companheiras Glaucia, Andrea e Claudiane, pela força, pelos conselhos e por acreditarem em mim.

A minha orientadora e amiga de tantos anos, Ângela Patrícia Santana, por ter me acolhido, por ter confiado e acreditado em mim. Você foi e sempre será um exemplo de força e de generosidade.

Ao meu grande amigo Hudson, que me recebeu na UnB com toda paciência e pelo incentivo na LS, você foi essencial nessa nova etapa da minha vida.

Aos meus amigos Henrique, Luciene, Welton, Marlene, Lu e Du, que tornaram esses momentos mais leves me fazendo sorrir.

Aos meus colegas de laboratório que ajudaram de todas as formas com empenho nas pesquisas: Lailah, Margareth, Milena, André, Viviane, Virgílio e Emilia. Em Especial a Joana pela contribuição e pela paciência.

Agradeço a todos aqueles que de uma forma ou outra contribuíram nestes dois anos de mestrado.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.- Resultado da PCR para detecção do gene da Integrase *Int1*. 1) Marcador DNA *ladder*100bp; 2) reação negativa para o *primer Int1*; 3,4,5) reação positiva para o *prime Int1* (280pb). Visualização em gel de agarose a 1,5% com concentração de 1% de brometo de etídio..

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultado dos microrganismos isolados em 38 ovos de um total de 140 amostras analisadas comercializados na região do Distrito Federal.....24

Tabela 2 – Resultado do teste de susceptibilidade antimicrobiana realizado em microrganismos isolados de ovos inspecionados comercializados na região do Distrito Federal..... 29

SUMÁRIO

RESUMO.....	X
ABSTRACT	Xi
CAPITULO I	1
I INTRODUÇÃO	1
II REFERENCIAL TEÓRICO	3
1. Caracterização do gênero	5
2. Patogenia	6
3. Legislação para <i>Salmonella</i> spp.....	7
4. Métodos de detecção de <i>Salmonella</i> spp.....	8
5. Resistências antimicrobiana.....	9
III OBJETIVOS	12
IV REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	13
CAPITULO II	18
I INTRODUÇÃO	18
II MATERIAIS E MÉTODOS	21
1. Origens das amostras e isolamento microbiológico	21
2. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	21
3. Caracterização microbiológica	22
4. Teste de susceptibilidade antimicrobiana.....	22
5. Detecção de genes de resistência através da reação em cadeia de polimerase	22
6. Análise estatística.....	23
III RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
1. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	24

2	Caracterização de gema e clara de ovos	25
3	Teste de susceptibilidade antimicrobiana e detecção de genes de resistência antimicrobiana por PCR	28
IV	CONCLUSÃO.....	34
V	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35

RESUMO

Os objetivos deste trabalho foram pesquisar *Salmonella* spp., promover a caracterização microbiológica em amostras de ovos inspecionados comercializados na região do Distrito Federal, realizar antibiograma e detectar genes de resistência antimicrobiana nos isolados. Nas 140 amostras de ovos analisadas, não foi encontrada presença do microrganismo *Salmonella* spp.. Na caracterização microbiológica das 140 amostras de ovos foram isolados 42 microrganismos em 38 ovos, sendo 24/140 (17,1%) de *Staphylococcus* coagulase negativa, 4/140 (2,8%) de *Enterobacter* spp., 4/140 (2,8%) de *Escherichia coli*, 3/14 (2,14%) de *Hafnia alvei*, 2/140 (1,42%) de *Pseudomonas* spp., 1/140 (0,71%) de *Corynebacterium* spp., 1/140 (0,71%) de *Proteus mirabilis*, 1/140 (0,71%) de *Providencia* spp., 1/140 (0,71%) de *Yersinia* spp., 1/140 (0,71%) de *Acinetobacter* spp. O perfil de susceptibilidade antimicrobiana demonstrou que os 42 microrganismos apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano sendo o maior índice de resistência, 14/42 (58,3%), dos microrganismos isolados foram para Tetraciclina e Vancomicina. Não foram detectados os genes de resistência antimicrobiana para Sulfonamidas, Beta-lactâmicos, Clorafenicol, Aminoglicosídeos e Tetraciclina nos isolados. Foi detectado o gene da integrase *Int1* em 3/42 microrganismos. Não foi detectada a presença de *Salmonella* spp. nas amostras analisadas e vários diferentes microrganismos foram isolados na caracterização microbiológica. Foram detectados ainda a presença fenotípica de resistência antimicrobiana e o gene da integrase 1. No entanto maiores estudos devem ser realizados para pesquisa de *Salmonella* spp em ovos e a verificação da origem da resistência antimicrobiana nos microrganismos isolados de ovos inspecionados comercializados na região do Distrito Federal.

Palavras-Chave: *Salmonella* spp., resistência antimicrobiana, Integrase.

MICROBIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF INSPECTED EGGS MARKETED IN THE REGION OF THE FEDERAL DISTRICT

ABSTRACT

The objectives of this work were to investigate *Salmonella* spp., to promote the microbiological characterization in samples of inspected eggs commercialized in the Federal District, to perform antibiogram and to detect antimicrobial resistance genes in the isolates. In the 140 samples of eggs analyzed, no microorganism was found *Salmonella* spp. In the microbiological characterization of the 140 egg samples, 42 microorganisms were isolated in 38 eggs, 24/140 (17.1%) of coagulase negative *Staphylococcus*, 4/140 (2.8%) *Enterobacter* spp., 4 / 140 (2.8%) of *Escherichia coli*, 3/14 (2.14%) of *Hafnia alvei*, 2/140 (1.42%) of *Pseudomonas* spp., 1/140 (0.71%) of *Corynebacterium* spp., 1/140 (0,71%) *Protein mirabilis*, 1/140 (0.71%) *Providencia* spp., 1/140 (0.71%) *Yersinia* spp., 1/140 (0, 71%) of *Acinetobacter* spp. The antimicrobial susceptibility profile showed that the 42 microorganisms showed resistance to at least one antimicrobial being the highest resistance index, 14/42 (58.3%), of the isolated microorganisms were for Tetracycline and Vancomycin. No antimicrobial resistance genes were detected for Sulfonamides, Beta-lactams, Chlorphenicol, Aminoglycosides and Tetracycline in the isolates. IntI1 integrase gene was detected in 3/42 microorganisms. No evidence of *Salmonella* spp. In the analyzed samples and several different microorganisms were isolated in the microbiological characterization. The phenotypic presence of antimicrobial resistance and the integrase 1 gene were also detected. However, further studies should be carried out to investigate *Salmonella* spp in eggs and verify the origin of antimicrobial resistance in isolated microorganisms from inspected eggs marketed in the Federal District .

Key words: *Salmonella* spp., antimicrobial resistance, Integrase.

CAPÍTULO I

I. INTRODUÇÃO

Verificações feitas pela Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA) mostram que a produção brasileira de ovos totalizou no ano de 2015 39,5 bilhões de unidades, recorde histórico que superou em 6,1% a produção registrada no ano anterior.

Segundo Welker e colaboradores (2010) ovo está dentro dos produtos avícolas que apresentam maior suscetibilidade à contaminação microbiológica, pois possuem diversos nutrientes que auxiliam no desenvolvimento de microrganismos. Alterkruse e colaboradores (1997) ressaltam ainda que o consumo direto ou de produtos contendo ovos crus podem ser responsáveis por toxinfecções alimentares em várias partes do mundo.

A família *Enterobacteriaceae* inclui um grupo de bactérias que habitam o trato intestinal dos homens e animais (TORTORA, et al., 2000). Inúmeras bactérias patogênicas representantes desta família são normalmente detectadas nas carcaças de frango e nos ovos e, entre elas, merecem atenção especial a *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* (BUTZLER, 2004, JAY et al., 2005).

A *Salmonella* spp. é uma bactéria enterica responsável por graves intoxicações alimentares, sendo um dos principais agentes envolvidos em surtos alimentares registrados em vários países (MAIJALA et al., 2005). *Salmonella* Enteritidis é responsável por significativos prejuízos à avicultura, sendo o sorotipo mais frequentemente isolado em alimentos destinados ao consumo humano tendo consequências para a saúde pública (OKAMURA et al., 2001).

A presença de *Salmonella* spp. em alimentos não é tolerada e a legislação estabelecida pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) enfatiza as medidas gerais necessárias face aos fatores que direta ou indiretamente possam afetar a qualidade dos alimentos de origem animal em geral (Brasil, 2001). Assim, a contaminação dos ovos, seja na casca ou no conteúdo, deve ser inspecionada na tentativa de garantir a segurança alimentar do consumidor (ANDRADE et al., 2004).

Bactérias patogênicas resistentes à antimicrobianos oriundas de humanos e animais têm sido uma questão de preocupação para a saúde pública, devido ao risco da exposição humana no consumo de ovos (SILVA et al., 2016). Fuller (1989) ressalta tal preocupação global e crescente desde a década de 50, em que o uso indiscriminado de antimicrobianos na alimentação animal proporcionou o desenvolvimento de populações bacterianas resistentes, as quais, posteriormente, dificultariam um possível tratamento terapêutico.

Sabendo que a qualidade do ovo é uma das características desejadas e valorizadas pelos consumidores, sendo percebida pelos atributos sensoriais, nutricionais, tecnológicos e, principalmente, a condição sanitária (ALCANTARA, 2012). Portanto, os objetivos deste trabalho foram verificar a presença de *Salmonella* spp., fazer a caracterização microbiológica em ovos inspecionados comercializados na região do Distrito Federal, efetuar o antibiograma e promover a detecção de genes de resistência dos isolados através da reação em cadeia da polimerase (PCR).

II. REFERENCIAL TEÓRICO

Os ovos apresentam uma alta qualidade nutricional em sua composição. Apresentam gorduras, carboidratos, minerais e vitaminas, além de ser completo e equilibrado em nutrientes. Também é uma fonte de proteínas sendo acessível a todas as classes sociais (LEANDRO et al., 2005; NEPA, 2006).

O albúmen, em geral, apresenta-se com baixa contaminação microbiana, pois contém elementos naturais que dificultam o desenvolvimento bacteriano, como a presença de enzimas antibacterianas tais como a lisozima, coanoalbumina, ovomucóide, avidina e riboflavina, entretanto apresenta-se com deficiência em ferro, elemento essencial para a multiplicação bacteriana (OLIVEIRA e SILVA, 2000).

Segundo Menezes (2013) o controle da presença de microrganismos patogênicos nos ovos é bastante difícil, pois a ocorrência de contaminações pode ocorrer de várias formas, uma vez que alguns microrganismos fazem parte da microbiota das aves.

Existem explicações para a presença de microrganismos em ovos considerados frescos, que pode ser devido à incorporação de bactérias durante a formação do ovo no ovário ou oviduto, podendo ser considerada de origem congênita (vertical) e também quando há penetração de microrganismos pela casca, após a postura, sendo chamada de contaminação extragenital (horizontal). A contaminação interna de ovos, a partir da contaminação ambiental, como material de cama de poedeiras foi comprovada e, provavelmente, é dependente da qualidade da casca (OLIVEIRA e SILVA, 2000).

De acordo com Lacerda e colaboradores (2010), o ovo está exposto a uma série de fatores que implicam na sua contaminação com capacidade de alterar a sua qualidade nutricional e determinar toxinfecções alimentares. Diante do exposto, as bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *Escherichia*, *Serratia*, *Enterobacter* e *Staphylococcus* estão entre os principais microrganismos responsáveis por essa contaminação determinando alterações

físicas e químicas observadas nos ovos tornando-os impróprios para consumo (PATRICIO, 2003).

As Enterobactérias têm atividade proteolítica destruindo algumas estruturas da casca do ovo, o que poderia facilitar a penetração de outras bactérias, as quais se multiplicam no conteúdo do ovo, provocando sua deterioração. Dentre os microrganismos envolvidos na deterioração dos ovos, e que possuem grande capacidade de atravessar a casca e suas membranas, destaca-se o *Pseudomonas aeruginosa*, que está amplamente distribuído na natureza, sendo considerado um patógeno humano oportunista (DE REU et al., 2006).

A presença de *Escherichia coli* em alimentos crus é considerada um indicador de contaminação fecal e essa contaminação pode ocorrer durante o processamento do alimento e devido à falta de higiene pessoal dos manipuladores, no caso de ovos, o manejo incorreto em relação a coleta de ovos diariamente ou na preparação de algum prato que inclui este alimento cru (SILVA, 2002).

A intoxicação alimentar causada pelo microrganismo *Staphylococcus* spp é resultante da ingestão de alimentos contaminados por enterotoxinas estafilocócicas termoestáveis pré-formadas, produzidas por linhagens enterotoxigênicas de estafilococos coagulase positivo, principalmente *S. aureus*, durante sua multiplicação no substrato e, também, relatos de estafilococos coagulase negativo produtores de enterotoxinas (FREITAS et al., 2004).

Os procedimentos estabelecidos pelo RIISPOA MAPA (BRASIL, 2017) nem sempre são eficazes na eliminação dos microrganismos, e ovos frescos mantidos em estabelecimentos comerciais permanecem estocados por longos períodos, podendo ter sua qualidade interna alterada, favorecendo assim a multiplicação bacteriana.

Segundo Olsen et al (2001) surtos de doenças transmitidas por ovos e seus derivados tem sido fonte de preocupação, sendo o principal problema em saúde pública encontrado em alimentos à base de ovos crus ou mal cozidos, a presença de *Salmonella* spp.

O microrganismo *Salmonella* spp.

1. Caracterização do gênero

Segundo Franco e Landgraf (2004), o gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, e compreendem Bacilos Gram negativos não produtores de esporos. Apresenta-se na forma de Bastonetes de 0,5 a 0,7 por 1 a 3 micrômetros, possui um crescimento em pH ótimo de 6,5 a 7,5 e temperatura de 35 a 37°C, porém estes valores podem variar de pH 4,5 a 9,0 e temperatura de 5 a 47°C, a sua parede celular possui quatro camadas: lipopolissacarídea (LPS), fosfolipídica, lipoprotéica e proteoglicano.

A Classificação do gênero *Salmonella*, segundo Holt et al (1994) baseado no Bergey's Manual of Systematic Bacteriology é dividido em duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* (GRIMONT & WEILL, 2007). *Salmonella bongori* com 23 sorovares conhecidos e *Salmonella enterica*, subdividida em seis subespécies denominadas por: *Salmonella enterica* subespécie *enterica*, *Salmonella enterica* subespécie *salamae*, *Salmonella enterica* subespécie *arizonae*, *Salmonella enterica* subespécie *diarizonae*, *Salmonella enterica* subespécie *houtenae*, *Salmonella enterica* subespécie *indica*, tendo sido descritos ao todo 2.587 sorovares (GUIBOURDENCHE et al., 2010). Os sorovares isolados com maior frequência em doença humana pertencem à *Salmonella enterica* subespécie *enterica*, com 1547 sorovares conhecidos (SILVA et al., 2007; GUIBOURDENCHE et al., 2010).

A denominação dos diferentes sorotipos deve ser realizada levando-se em consideração a fórmula antigênica (antígenos O, H e K) dos microrganismos ou pela determinação de um nome característico, usualmente adotado para diferenciar os sorotipos apenas pela descrição do gênero *Salmonella*, seguido diretamente de sua denominação antigênica (fórmula ou nome característico). *S. Typhi* e *S. Paratyphi*, portanto, são sorotipos causadores de salmoneloses em mamíferos incluindo a espécie humana (POPOFF et al., 2001; BRASIL 2001).

Segundo CASON et al. (1994) a transmissão de *Salmonella* spp. em galinhas poedeiras comerciais pode ocorrer durante a incubação de ovos férteis, ou seja, quando ovos livres (sem a presença de *Salmonella* spp.) são incubados junto com ovos ou máquinas e equipamentos contaminados. A bactéria se espalha rapidamente entre as aves, pelo contato com pintos mortos contaminados, mecônio, ou pela alta taxa de contaminação do ar dentro da máquina de incubação. Em aves adultas também ocorre esse tipo de transmissão. Quando órgãos do trato reprodutivo como ovário, oviduto e folículos ovarianos são colonizados por *Salmonella* spp., a transmissão vertical pode ocorrer, ou seja, o ovo pode ser contaminado antes da oviposição (POPPE, 2000).

2. Patogenia

Segundo Rose et. al (2000), mais de 99% dos sorotipos de salmonelas podem causar doenças subclínicas em aves, no entanto, sua maior importância e fonte de preocupação é em relação à saúde pública.

As doenças causadas pelo consumo de alimentos contaminados por *Salmonella* se subdividem em três grupos: febre tifóide, causada por *Salmonella typhi*; as febres entéricas causadas por *Salmonella paratyphi* e as enterocolites, também conhecidas por salmoneloses, causadas pelas demais salmonelas (FRANCO e LANDGRAF, 2010). As salmoneloses aviárias são doenças agudas ou crônicas causadas por bactérias do gênero *Salmonella*, incluída na família Enterobacteriaceae (SANTOS et al., 2009)

No Brasil e no mundo a salmonelose é um desafio para a saúde pública. O primeiro caso de salmonelose em humanos foi relatado em 1880, quando predominava os casos da intoxicação por *Salmonella Typhi*. A partir de 1940 tem-se registrado um rápido aumento de salmonelas não específicas de humanos e animais, particularmente *S. Typhimurium*. Atualmente a *S. Enteritidis* é o sorovar mais isolado em casos de toxinfecções alimentares em humanos, devido a sua alta capacidade de transmissão vertical e horizontal (CARDOSO & TESSARI, 2008). A carcaça do frango, os ovos e seus derivados

são consideradas a maior fonte de infecção desses patógenos para o homem (CARDOSO & TESSARI, 2008)

O microrganismo *Salmonella* spp. pode a partir do trato gastrointestinal das aves invadir a corrente sanguínea e atingir órgãos importantes como o fígado, coração e ovário, proporcionando a transmissão transovariana e possibilitando amplas condições de contaminação das carcaças, bem como contaminação dos ovos, impulsionadas pelo seu manuseio inadequado e por condições inapropriadas de armazenamento (ANDREATTI FILHO, 2009).

Segundo Von Rückert (2006), existem dados diversificados em vários países a respeito de infecções em humanos, originadas pelo consumo de alimentos contaminados por *Salmonella* spp.. Considerando que a maioria dos quadros de gastroenterite transcorre sem a necessidade de hospitalizações e sem o isolamento do agente causal no alimento incriminado, a ocorrência das salmoneloses na população humana transmitida por alimentos é provavelmente subestimada, principalmente pela falta de notificações e confirmações da causa desses quadros clínicos (SHINOHARA et al., 2006).

3. Legislação para *Salmonella* spp.

Os atuais elementos de inspeção sanitária instruídos no controle de riscos na indústria, aliado ao monitoramento, realizado por programa do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), atestam a segurança no sistema de criação da cadeia produtiva de carnes de aves, inclusive no controle da presença de resíduos de medicamentos veterinário e contaminantes nos limites máximos estabelecidos (BRASIL, 2010).

Com o avanço do comércio internacional de alimentos, a aplicação de medidas de controle para segurança alimentar passou a ser implantada tanto em produtos que abastecem o mercado interno, quanto para os de exportação, seguindo os critérios de controle presentes em documentos internacionais como *Codex Alimentarius* e legislações governamentais (SILVA, 2007).

O Brasil como grande exportador viu-se obrigado a criar um programa que reduzisse a incidência de *Salmonella*, conhecido como Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* spp. em Carcaças de Frangos e Perus, pela Instrução Normativa nº 70, de 10 de outubro de 2003 que visa à realização de análises microbiológicas em carcaças de aves coletadas nos estabelecimentos de abate sob Serviço de Inspeção Federal -SIF (GOUVÊA et al., 2012).

A principal função do programa de redução de patógenos é construir um sistema de informações para avaliação da contaminação dos produtos examinados, viabilizando a determinação do nível adequado de proteção ao agente, o que permite a melhor eficiência das medidas de controle, como componente importante da Análise de Risco Microbiológico (BRASIL, 2003a).

4. Métodos de detecção de *Salmonella* spp.

Para o controle da qualidade microbiológica de produtos de origem animal, o método de isolamento bacteriológico convencional de *Salmonella* spp. é amplamente empregado e prescrito em legislações específicas (BRASIL, 1995; 2003b). Segundo o BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL (1992), as técnicas convencionais para detecção de *Salmonella* em alimentos geralmente envolvem as seguintes etapas: pré-enriquecimento, enriquecimento seletivo, isolamento em meios seletivos sólidos e identificação completa das colônias por meio de testes bioquímicos e sorológicos.

O método convencional de detecção de *Salmonella* spp. em alimentos envolve etapas de cultura dispendiosas e trabalhosas, consome longo tempo, necessitando-se normalmente de 4 a 5 dias para a confirmação dos resultados (BEUMER et al., 1991). Portanto, o emprego de métodos rápidos, simples e confiáveis, é importante tanto no diagnóstico de toxinfecção, como também, e principalmente, no controle de qualidade de alimentos.

Métodos para detecção rápida de *Salmonella* spp. têm sido desenvolvidos e utilizados na indústria de alimentos e se baseiam em métodos

de hibridização de ácidos nucleicos, métodos imunológicos e métodos moleculares, como PCR (BENETTI, 2009).

Dentre elas, destacam-se as técnicas imunológicas, baseadas em reações antígeno anticorpo, a imunoenzimáticas que empregam anticorpos marcados com uma enzima cromogênica (SCHUURS et al., 1997). A técnica imunoenzimática é totalmente dependente da especificidade da reação antígeno-anticorpo e tentativas anteriores de planejar métodos imunoenzimáticos específicos para *Salmonella* usando misturas de anticorpos policlonais produziram muitos resultados falso-positivos devido à presença de componentes comuns em enterobactérias que reagem de forma cruzada (KRYNSKI et al., 1977).

OYARZÁBAL (1996) observou que dentre as possíveis metodologias a serem empregadas, destacou-se o uso dos métodos moleculares, como a reação em cadeia pela polimerase (polymerasechainreaction - PCR) que foi a técnica de maior aceitação entre as demais técnicas moleculares desenvolvidas recentemente, podendo ser empregada como ferramenta de diagnóstico em laboratórios clínicos.

Este método é baseado na amplificação de uma sequência alvo de DNA específica e análise do produto de amplificação. As principais vantagens são: aumento de sensibilidade e menor tempo requerido para processar as amostras no laboratório, quando comparado ao método tradicional de cultivo (WHYTE et al., 2002), além de não depender da utilização de um substrato ou da expressão de antígenos, o que evita variações fenotípicas em padrões bioquímicos e falta de antígenos detectáveis (HOORFAR et al., 1999).

5. Resistência antimicrobiana

A resistência antimicrobiana é um fenômeno bastante complexo em que envolve uma vasta variedade de agentes antimicrobianos, espécies de bactérias, genes de resistência e mecanismos de resistências (Aarestrup, 2006).

O surgimento de cepas resistentes de *Salmonella* spp. é comum e este fato é agravado com a ampla utilização de antibiótico em rações animais, principalmente como promotores de crescimento. Portanto, rações avícolas têm sido relatadas como um elo de grande importância no ciclo epidemiológico da salmonelose aviária (REIS et al., 1995). REIS e colaboradores (1995) relatam ainda que o emprego de antibióticos em rações para promover o crescimento, tem contribuído para potencializar a distribuição de salmonelas resistentes presentes nas aves, havendo assim um risco maior nas doenças transmissíveis por alimentos (DTAs) em humanos causadas por estas bactérias.

Para que um patógeno resistente tenha impacto na saúde pública, é importante tanto o aspecto da transferência da resistência, quanto o da disseminação dos microrganismos resistentes, o que ocorre após a colonização ou infecção do hospedeiro suscetível (ANGULO et al., 1999). Desta forma, infecções causadas por *Salmonella* resistente a antimicrobianos parecem resultar, predominantemente, da ingestão de alimentos contaminados com cepas já resistentes (ANGULO et al., 1999);

Diversas pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de avaliar o perfil de resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp. isolados de aves e seus produtos frente a agentes antimicrobianos e destacam-se estudos em que foram encontrados isolados de *Salmonella* spp. com elevadas taxas de resistência no Brasil (CORTEZ et al., 2006; SOUZA et al., 2010),

Durante décadas, ampicilina, cloranfenicol e trimetoprim-sulfametoxazol foram as drogas mais utilizadas para o tratamento de salmoneloses graves. Porém, o aumento na resistência a estes agentes reduziu significativamente o uso na clínica médica. Conseqüentemente, as fluoroquinolonas (FQs) passaram a ser os principais antimicrobianos empregados para o tratamento de infecções humanas (SOUZA et al., 2010). O aumento da incidência de cepas resistentes às quinolonas de primeira geração, como ácido nalidíxico, é preocupante, considerando que esse fato pode estar relacionado à redução da suscetibilidade às FQs, como a ciprofloxacina, e ao possível surgimento de resistência a esses antimicrobianos (HOOPER, 2001).

A vigilância da resistência antimicrobiana é essencial para disponibilizar informações sobre sua magnitude e tendências, e para monitorar o efeito das intervenções, pois a prevalência de resistência pode variar nas diferentes regiões ou épocas (WHO, 2006)

III. OBJETIVOS

Objetivo geral

- Realizar a pesquisa de *Salmonella* spp. e fazer o isolamento e caracterização microbiológica em ovos inspecionados e comercializados na região do Distrito Federal.

Objetivos específicos

- Realizar o teste de susceptibilidade antimicrobiana nos isolados
- Avaliar a presença de genes de resistência aos antimicrobianos sul1 para Sulfonamidas; SHV para Beta-lactâmicos; cat1 para Clorafenicol; aac(3)-I para Aminoglicosídeos; tet(M) para Tetraciclina e o int1 para Integrase nos isolados através reação em cadeia da polimerase (PCR).

IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA. **Relatório anual da Sociedade Brasileira de Proteína Animal**, em 2015. Disponível em: < <http://abpa-br.com.br>>. Acesso em: 20 de dez. 2016.

AERESTRUP, F.M. **Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin**. Washington DC: ASM Press, 2006. 442p.

ALCÂNTARA, J.B.; **Qualidade físico-química de ovos comerciais: avaliação e manutenção da qualidade**. Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2012.

ALTERKRUSE, S.F.; COHEN, M.L.; SWERDLOW, D.L. Emerging foodborne diseases. **Emerging Infectious Diseases**, v. 3, n.3, p.285-293, 1997.

ANDRADE, M.A.; CAFÉ, M.B.; SÁ JAYME, V.; ROCHA, P.T.; LEANDRO, N.S.M.; STRINGHINI, J.H. Avaliação da qualidade bacteriológica de ovos de galinha comercializados em Goiânia, Goiás, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v.5, n.4, p.221-228, 2004.

ANDREATTI FILHO, L.R. Doenças Aviárias e Saúde Pública. In: REVOLLEDO, L & FERREIRA, A.J.P. **Patologia aviária**. E.d.Manole,2009. cap.3, p.18-33.

ANGULO, F. J. et al. Significance and sources of antimicrobial-resistant nontyphoidal *Salmonella* infections in humans in the United States: the need for prudent use of antimicrobial agents, including restricted use of fluoroquinolones, in food animals. In: **AGRICULTURE'S ROLE IN MANAGING ANTIMICROBIAL RESISTANCE CONFERENCE**, 1999, Canada. In. ANNALS OF THE AGRICULTURE'S ROLE IN MANAGING ANTIMICROBIAL RESISTANCE CONFERENCE, Canada, p. 14-28. 1999.

BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL – United States Food and Drug Administration and Association of Official Analytical Chemists International. 7. th. Arlington. 529p, 1992.

BARTON, M.D. Antibiotic use in animal feed and its impact in human health. **Nutrition Research Reviews**, v. 13, p. 279-299, 2000.

BENETTI, T. M. **Métodos de detecção e incidência de *Listeria spp.* e *Salmonella spp.* em lingüiças resfriadas comercializadas no estado do Paraná**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia) - Universidade Federal do Paraná, 134f, 2009.

BEUMER, R.R.; BRINKMAN, E.; ROMBOUTS, F.M. Enzyme-linked immunoassays for the detection of *Salmonella* spp. : a comparison with other methods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 12, p. 363-374, 1991.

BRASIL1995.Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.**Portaria nº8, de 23 jan. 1995**. Aprova as alterações introduzidas no método analítico de carcaças de aves e pesquisa de *Salmonella* conforme normas anexas. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, p.1182, 27 jan. 1995, Seção 1, 1995.

BRASIL 2001. Ministério da Saúde. **Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001**. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF,. Seção 1, p. 46-53, 10 jan. 2001.

BRASIL 2003a. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 70, de 06 de outubro de 2003**. Programa de Redução de Patógenos – Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* ssp. em Carcaças de Frangos e Perus, 2003. Diário Oficial da União de 10 out. 2003, seção 1, p. 9, 2003.

BRASIL2003b. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº62, de 26 ago. 2003**. Aprova os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, p.14, 18 set. 2003, Seção 1, 2003.

BRASIL, 2010. **A força da agricultura 1860 – 2010**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília, 2010.

BRASIL, 2017. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA)**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/noticias/diario-oficial-publica-decreto-do-novo-regulamento-de-inspecao-industrial-e-sanitaria>. Acesso em 30 março 2017.'

BUTZLER, J.P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. **Clinical Microbiology and Infection**, v.10, n.10, p.868-876, 2004.

CARDOSO A.L.S.P. & TESSARI E.N.C. **Salmonella na segurança dos alimentos**. Arquivos do Instituto Biológico, São Paulo, v.70, n.1, p.11-13, 2008.

CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C. *Salmonella* na Segurança dos Alimentos e na Avicultura. **Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola**. São Paulo, SP. n. 80. 27/08/2008.

CASON, J. A.; COX, N. A.; BAILEY, J. S. Transmission of *Salmonella* Typhimurium during hatching of broiler chicks. **AvianDiseases**, Kennett Square, v. 38, n. 3, p. 583- 588,1994.

CORTEZ, A.L.L.; CARVALHO, A.C. F.B.; IKUNO, A.A.; BÜRGER, K.P.; VIDAL-MARTINS, A.M.C. Resistência antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de abatedouros de aves. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.73, n.2, p.157-163, 2006.

De Reu, k.; Grijspeerdt, K.; Messens, W.; Heyndrickx, M.; Uyttendaele, M.; Debevere, J.; Herman, L. Eggshell factors influencing eggshell penetration and whole egg contamination by different bacteria, including *Salmonella* Enteritidis. **Int. J. Food Microbiol.**; 113(3): 253-260, 2006.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **A review, Journal of Applied Bacteriology**, v.66, n.5, p.365-378, 1989.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 182 p.2010.

- FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2004.
- FREITAS, M. F. L. de; LEÃO, A. E. D. de S.; STAMFORD, T. L. M.; MOTA, R. A. Ocorrência de *Staphylococcus aureus* em carcaças de frango. **B.CEPA**. Curitiba, v.. 22, p. 227, 2004
- GERMANO, P. M. L., GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos**. Barueri, SP: Manole,. 229-230; 317p.2008.
- GOUVÊA, R.; SANTOS, F. F.; NASCIMENTO, E. R.; FRANCO, R. M.; PEREIRA, V. L. A., Isolamento Bacteriológico e PCR na Detecção de *Salmonella* spp. em Peito de Frango de Estabelecimento Varejista. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico do Saber**,Goiânia, v.8, n.15. p. 1129 – 1135.2012.
- GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X.. Antigenic formulae of the Salmonella serovars World Health Organization Collaborating. **Center for Reference and Research on Salmonella** (9th ed.): Institut Pasteur, Paris. 2007.
- GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P. I.; BOCKEÜHL, J.; GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. Supplement 2003 – 2007 (No. 47) to the White-Kauffmann –Le Minor scheme. **Research in Microbiology**. v. 161, p.26-29, 2010.
- HOLT, J.G.; KRIEG, R.N.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. Lippincott Williams & Wilkins, 1994. 787p.
- HOOPER, D. C. Emerging mechanism of fluoroquinolone resistance. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 7, n. 2, p. 337- 41, 2001.
- HOORFAR, J.; BAGGENSEN, D. L.; PORTING, P. H. A PCR-based strategy for simple and rapid identification of rough presumptive Salmonella isolates. **Journal of Microbiology- Journal of Microbiological Methods**, v. 35, p. 7-84, 1999.
- JAY, J. M.; LOESSNER, M. J.; GOLDEN, D. A. **Modern food microbiology**. 7. ed. New York: Springer, 790 p, 2005.
- KRYSINSKI, E.P.; HEIMSHC, R.C. Use of enzyme-labeled antibodies to detect Salmonella in foods. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 33, n. 4, p. 947-954, 1977.
- LACERDA, M.J.R. **Microbiologia de ovos comerciais**. Universidade Federal de Goiás, Goiânia-Go, 43p., 2011.
- LEANDRO, N.S.M.; DEUS, H.A.B.; STRINGHINI, J.H.; CAFÉ, M.B.; ANDRADE, M.A.; CARVALHO, F.B. Aspectos de qualidade interna e externa de ovos comercializados em diferentes estabelecimentos na região de Goiânia. **Ciência Animal Brasileira**, v.6, n.2, p.71-78, 2005.
- MAIJALA, R.; RANTA, J.; SEUNA,E.; The efficiency of the finnish *Salmonella* control programme. **Food Control**. V.16, n8, p.669-675, 2005.

MENEZES, L.D.M.; **Caracterização microbiológica de ovos de consumo e de carcaças de frango produzidos no Estado de Minas Gerais**. Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010, 104p. Tese Doutorado.

NEPA. **Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação**. TACO: Tabela brasileira de composição de alimentos. Versão II. Campinas:NEPA-UNICAMP, p. 105, 2006.

OKAMURA, M.; KAMIJIMA, Y.; MIYAMOTO, T.; TANI, H.; SASAI, K.; BABA, E. Differences among six salmonella serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. **Avian Diseases**, Atlanta. v. 45, n. 1, p. 61-69, 2001.

OLIVEIRA, D. D.; SILVA, E. N. Salmonela em ovos comerciais: ocorrência, condições de armazenamento e desinfecção da casca. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.52, n.6, p. 655-661, 2000.

OLSEN, S.J. et al. The changing epidemiology of Salmonella: trends in serotypes isolated from humans in the United States. 1987-1997. **The journal of Infectious Diseases**, v.183, p. 753-761, 2001.

OYARZÁBAL, O.A. Técnicas moleculares para o diagnóstico de patógenos aviários. **Avicultura Profissional**, v.14, n.16, p.19-21, 1996

PATRICIO, I.S. Manejo do ovo incubável da granja ao incubatório. In: MACARI, M.; GONZALES, E. **Manejo da incubação**, Campinas: FACTA, p.163-179, 2003.

POPOFF, M.Y.; BOCKEMÜHL, J.; BRENNER, F.W.; GHEESLING, L.L. Supplement 2000(n° 44) to the KauffmanWhite Scheme. **Research in Microbiology**, v. 152, n° 10, p. 907-909, 2001.

POPPE, C. *Salmonella* Infections in the Domestic Fowl. In: **WRAY, C.; WRAY, A. Salmonella in domestic animals**. New York: CABI Publishing, cap. 7, p. 107- 132, 2000.

REIS, R.B.; KRUGER, C.S., MACIEL, M.S. *Salmonella* spp. em produtos cárneos comercializados no município de Cuiabá-MT. Avaliação da metodologia de pesquisa. Modelos de resistência a drogas antimicrobianas. **Ciência e Tecnologia**, v.15, n.1, p.74-78, 1995.

ROSE, N.; BEAUDEAU, F.; DROUIN, P.; TOUX, J.Y.; ROSE, V. and COLIN, P. Risk factors for Salmonella persistence after cleansing and disinfection in French broiler-chicken houses. **Preventive Veterinary Medicine**, v.44, p. 9-20, 2000.

SANTOS, B.M; MOREIRA, M.A.S; DIAS, C.C.A. Doenças de etiologia bacterina. In: **Manual de Doenças Avícolas**.ed.UFV. cap.3, p. 107-116,2009.

SCHUURS, A.H.W.M.; VAN WEEMEN, B.K. Enzymeimmunoassay. **Clin. Chem.**, New York, v. 81, n. 1, p. 1- 40, 1977.

SHINOHARA, N.K.S; BARROS, V.B.B; JIMENEZ, S.M.C; MACHADO, E.C.L; DUTRA, R.A.F; FILHO, J.L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico

veiculado em alimentos. **Ciência Saúde Coletiva**. Rio de Janeiro.13 n.5, 2008.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A; SILVEIRA N.F.A; TANIWAKI, M.H. SANTOS. R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Salmonella** in: **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela,. cap.19, p.253-285,2007

SILVA, O. R. **Modelo Teórico de Estimativa de Risco de Salmonella Enteritidis em Sistema Integrado de Produção de Frango de Corte e Tipagem Molecular de Salmonella spp. Oriundas de Aves e Rações Submetidas a Diferentes Tratamentos com Ácidos Orgânicos**. Tese (Doutorado em Microbiologia), Universidade de São Paulo, 2007.

Silva, M. C. **Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos com a utilização de metodologias convencionais e do sistema simplate**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Piracicaba/SP: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo;. 87p, 2002.

SILVA, T.M.; MILBRADT, E.L.; ZAMAE, J.C.; FILHO, R.L.A.; OKAMOTO, A.S. Transferência de resistência antimicrobiana entre Enterobactérias patogênicas de importância aviária – Impactos em saúde pública. **Archives of Veterinary science**. v.21, n.2, p.09-20, 2016.

Souza, R. B. de; Magnani, M.; Oliveira, T. C. R. M. Mecanismos de resistência às quinolonas em *Salmonella* spp. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 2, p. 413-428, 2010.

SOUZA, R.B.; FERRARI, R.G.; MAGNANI, M.; KOTTWITZ, L.B.M.; ALCO CER, I.; TOGNIM, M.C.B.; OLIVEIRA, T.C.R.M. Ciprofloxacin susceptibility reduction of *Salmonella* strains isolated from outbreaks. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.41, n.1, p.497-500, 2010.

VON RUCKERT, D. A. S. Comparação dos métodos microbiológicos convencional, imunoanálise e reação polimerase em cadeia (PCR) no monitoramento de *Salmonella* spp. em frangos durante o abate. 70f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

WELKER C.AD.; BOTH, JMC, LONGARAY, S.M. et al.. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, **Brasil. Rev Bras Bioci**. v. 8, n. 1, p. 44-48, 2010.

WHO. Progress report (2000-2005): building capacity for laboratory-based foodborne disease surveillance and outbreak detection and response. **WHO GLOBAL SALMSURV**, 2006.

WHYTE, P. et al. The prevalence and PCR detection of *Salmonella* contamination in raw poultry. **Veterinary Microbiology**, v. 89, p. 53-60, 2002.

CAPÍTULO II

I. INTRODUÇÃO

Segundo o relatório anual da Sociedade Brasileira de Proteína Animal, em 2015 a produção brasileira de ovos foi de 39 bilhões de unidades, sendo o consumo *per capita* em torno de 191 ovos (ABPA, 2016).

Ovos frescos ou conservados só podem ser expostos ao consumo público interno ou internacional, quando previamente submetidos à exame e classificação previstos no Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (BRASIL, 2017), sendo este procedimento de extrema importância para à saúde pública.

O Distrito Federal contribui nacionalmente com uma produção de ovos de 4.830 mil dúzias, segundo dados do primeiro trimestre do IBGE de 2016, e o Estado de Goiás com uma produção de 42.749 mil dúzias, que por sua vez abastecem também o mercado desta região, e vice-versa (IBGE, 2016). Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2016), o Brasil teve um aumento na produção de ovos livres de patógenos com a finalidade de atender as exigências dos consumidores internos e externos, tanto no que se refere à sanidade avícola, quanto à qualidade dos alimentos (KOTTIWITZ et al., 2012).

As aves podem abrigar no trato intestinal bactérias patogênicas e passíveis de serem veiculadas por meio de alimentos, tais como a *Salmonella spp*, *Campylobacter spp.*, *Yersinia*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus spp.*, *Escherichia coli*, dentre outros, sendo desta forma potenciais reservatórios de doenças para o homem (WEI et al., 2013).

Conhecer a diversidade da microbiota das aves e seus derivados é uma relevante ferramenta para avaliar a importância das populações bacterianas individuais, e conhecer elementos de risco diretamente relacionados à saúde do homem (WEI et al., 2013). Os produtos avícolas são considerados os principais veículos de transmissão de *Salmonella spp* e a salmonelose tem se tornando uma preocupação crescente na saúde pública, tanto nos países

desenvolvidos como nos países em desenvolvimento, causando prejuízos na avicultura e no âmbito de zoonoses (RIBEIRO et al., 2007). A *Salmonella* spp. tem uma variedade de reservatórios animais e vias de transmissão que podem resultar na infecção humana e, no entanto, a maioria das infecções por *Salmonella* são causadas por exposições de origem alimentar (SCALLAN et al., 2011). Segundo Ohtsuka et al. (2005) vários sorotipos de *Salmonella* estão implicados em infecções de origem alimentar e o sorotipo Enteritidis especificamente após a década de 1980, tem causado infecção humana através de ovos contaminados em diversos países.

Pesquisas mostram que os ovos podem ser uma fonte potencial de transmissão de bactérias resistentes aos antimicrobianos ou de genes de resistência antimicrobiana (DIERIKXET al., 2013). A utilização de agentes antimicrobianos na prevenção e tratamento de muitas doenças infecciosas e como promotor de crescimento é bem conhecida na medicina veterinária, o seu uso indiscriminado, além de fornecer risco à população pela sua presença no alimento, levou a uma emergência de bactérias resistente à múltiplas drogas, e conseqüentemente, a uma preocupação em relação à transferência de genes resistentes para os seres humanos através dos alimentos (LUPO et al., 2012; GREESON et al., 2013; PANDE et al., 2015).

Na Índia, Márques et al. (2016) observaram que os isolados de *Salmonella*, a partir da casca de ovos de galinha que apresentavam múltipla resistência a antibióticos e a presença do gene da integrase intl1, merece ser investigados para conhecer os determinantes genéticos detectados. No Brasil, Rowlands et al. (2014) demonstraram o risco potencial associado ao consumo de produtos derivados de aves e a necessidade de assegurar boas práticas de higiene alimentar, a fim de reduzir a propagação de microrganismos resistentes a antibióticos de animais a humanos.

Considerando que são poucos os trabalhos no Brasil de pesquisa de microrganismos patogênicos e caracterização microbiológica em ovos, e tendo em vista a ausência de pesquisas com testes de susceptibilidade antimicrobiana e detecção de genes de resistência antimicrobiana neste alimento no Distrito Federal, este trabalho teve por objetivo pesquisar cepas de *Salmonella* spp., bem como a caracterização microbiológica em ovos

inspecionados comercializados na região do Distrito Federal e realizar antibiogramas e detectar genes de resistência antimicrobiana.

II. MATERIAL E MÉTODOS

1. Origem das amostras e isolamento microbiológico

Foram adquiridas 140 amostras de ovos inspecionados todos com Selo de Inspeção Federal (S.I.F) de diversas marcas, comercializadas em 15 estabelecimentos comerciais localizados em diferentes regiões do Distrito Federal, entre o período de setembro de 2015 e agosto de 2016. As amostras foram adquiridas simulando uma situação real de compra pelo consumidor de uma caixa contendo uma dúzia de ovos, observando para embalagens íntegras, ovos sem trincas, dentro do prazo de validade e com selo de inspeção veterinária oficial.

As amostras foram transportadas em temperatura ambiente e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LAMAL) da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, para em seguida proceder ao isolamento microbiológico.

2. Pesquisa de *Salmonella* spp.

A pesquisa de *Salmonella* spp. foi realizada na casca do ovo e também na clara e gema, perfazendo um total de 280 amostras de ovos. A metodologia utilizada para a pesquisa de *Salmonella* spp. foi a descrita na Instrução Normativa nº 62, 26 de Agosto de 2003, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2003a), que oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água e também a descrita por Silva et al. (2010).

3. Caracterização Microbiológica

A metodologia de isolamento e caracterização microbiológica utilizada foram as descritas por Baron et al. (1994) e Koneman et al (2001), em que o material utilizado foi uma alíquota da clara e gema homogeneizadas e plaqueadas com *swab* em placas de Ágar da marca Acumedia® contendo 7% de sangue desfibrinado de carneiro e, em seguida incubados à 37° C em estufa bacteriológica (Quimis®) por 24h. Posteriormente as colônias isoladas foram plaqueadas em ágar Nutriente (Acumedia®) e submetidas às provas bioquímicas e sorológicas para os antígenos somáticos polivalentes flagelar para identificação (Probac do Brasil®).

4. Teste de susceptibilidade antimicrobiana

A susceptibilidade aos antimicrobianos foi avaliada através da técnica de disco-difusão de Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966) conforme recomendações do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI, 2016). Os agentes antimicrobianos testados foram: Amoxicilina (10µg), Ampicilina (10µg), Cefalexina (30µg), Cefalotina (30µg), Cefazolina (30µg), Ceftazidima (30µg), Ciprofloxacina (5µg), Clorafenicol (30µg), Doxiciclina (310µg), Enrofloxacina (5µg), Eritromicina (15µg), Estreptomicina (10µg), Gentamicina (10µg), Neomicina (30µg), Sulfonamidas (300µg), Tetraciclina (30µg), Vancomicina (30µg), todos da marca SENSIFAR®.

5. Detecção de genes de resistência antimicrobiana através da reação em cadeia da polimerase

A detecção dos genes de resistência por PCR foi realizada nas colônias isoladas e identificadas, e os *primers* utilizados foram: *sul1* para Sulfonamidas; *SHV* para Beta-lactâmicos; *cat1* para Clorafenicol; *aac(3)-I* para

Aminoglicosídeos; tet(M) para Tetraciclina e o int1 para Integrase, segundo o protocolo descrito por Van et al (2008) e Bass et al (1999). Tanto as condições para a realização da PCR-multiplex para a detecção dos genes de resistência à Sulfonamidas, à Beta-lactâmicos e à Clorafenicol, como as condições para a realização da PCR para a detecção do gene de resistência à Aminoglicosídeos, foram desnaturação inicial a 95°C por 15 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94° C por 30s, anelamento a 59°C por 30s e extensão a 72° C por 1 min e ciclo final de amplificação a 72° C por 10 min, segundo protocolo preconizado por Van et al (2008). Na reação da PCR para a detecção do gene aac(3)-I para aminoglicosídeo, foi utilizada a temperatura de anelamento de 55° C, sendo as demais temperaturas e tempos semelhantes aos descritos anteriormente. A detecção do gene de resistência para Tetraciclina foi realizada segundo protocolo descrito por Rahman et al (2008), composto por 30 ciclos de 94° C por 1 min, 56° C por 30s, 72° C por 1 min e uma extensão final de 72° C por 5 min. Para a detecção do gene da integraseInt1 foi utilizada o protocolo descrito por Siriken (2015).

6. Análise Estatística

A análise estatística empregada foi a de estudo descritivo, observacional, conforme descrito por Pereira (2000).

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Pesquisa de *Salmonella* spp.

Das 140 amostras analisadas de ovos inspecionados comercializados na região do Distrito Federal, tanto casca como gema e clara analisadas nesse trabalho, não foi detectada a presença de *Salmonella* spp., resultado este, tendo como referência a Resolução N^o 12, de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária que estabelece os padrões microbiológicos sanitários para alimentos, indica que as amostras estão dentro dos padrões microbiológicos e próprios para consumo humano (Brasil, 2001).

Resultados semelhantes, no que se refere à pesquisa deste microrganismo, foram observados por Stringhini et al. (2009) na casca de ovos lavados e não lavados de granjas de produção comercial da região metropolitana de Goiânia-GO.

Klein (2010), ao avaliar a qualidade microbiológica de ovos provenientes das três principais distribuidoras do Estado de Minas Gerais, também não foi detectada a presença de *Salmonella* spp.

No entanto, os resultados observados neste trabalho foram diferentes dos obtidos por Singh et al. (2010) na Índia realizou a pesquisa de *Samonella* spp em 150 ovos recolhidos de supermercados, os quais 4% das amostras apresentaram a presença de *Salmonella* spp.na casca e na gema. Segundo os autores, a incidência de contaminação por *Salmonella* spp na casca ovos pode ser proveniente do inadequado manuseio, armazenamento e transporte do alimento, enquanto a contaminação na gema do ovo aponta para uma infecção na galinha, ou seja, de origem congênita. A presença de *Salmonella* spp. também foi encontrada em 59,0% das 36 amostras de ovos não lavados no estudo conduzido por Costa et al. (2016) provenientes de supermercados localizados no município de Parintins-AM.

Os resultados de ausência de *Salmonella* spp. encontrados neste trabalho podem ser explicados pelo controle realizado pelo Programa de Redução de Patógenos, com o Monitoramento Microbiológico, Controle de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos e perus, presente na Instrução Normativa nº. 70, implantado no Brasil em 2003, pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2003b), que pode estar sendo efetivo na redução deste patógeno.

No entanto, mais pesquisas devem ser realizadas, com um número maior de amostras nesta região, tendo em vista o trabalho realizado por Oliveira et al. (2011) na região do Distrito Federal, em que os autores observaram a presença de *Salmonella* em 03 amostras de ovos de um total de 09 amostras.

Apesar do reduzido número de amostras, os resultados não podem ser desconsiderados por verificarem a presença do microrganismo na região. A ausência de *Salmonella* spp. observada neste estudo não permite afirmar que não exista a presença desse microrganismo em ovos inspecionados comercializados na região do Distrito Federal.

2 Caracterização microbiológica da gema e clara de ovos

Na caracterização microbiológica da gema e da clara, das 140 amostras de ovos, foram encontrados a presença de 42 microrganismos em 38 amostras de ovos, sendo encontrados mais de um tipo de microrganismo nas mesmas amostras de ovos, na qual a porcentagem de contaminação com microrganismos foi de 27,1% do total de amostras analisadas. A lista dos microrganismos isolados e identificados encontra-se descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Microrganismos isolados em 38 ovos de um total de 140 amostras analisadas comercializadas na região do Distrito Federal

Microrganismos	Número de microrganismos isolados em 38 ovos de um total de 140 amostras de ovos analisadas	% em 140 amostras de ovos analisadas
<i>Acinetobacterspp.</i>	1/ 140	0,71
<i>Corynebacterium spp.</i>	1/ 140	0,71
<i>Enterobacter spp.</i>	4/140	2,8
<i>Escherichia coli</i>	4/140	2,8
<i>Hafnia spp.</i>	3/140	2,14
<i>Proteusmirabilis</i>	1/140	0,71
<i>Providência spp.</i>	1/140	0,71
<i>Pseudomonasalcaligenes</i>	2/140	1,42
<i>Staphylococcus spp.</i>	24/140	17,1
<i>Yersinia spp.</i>	1/140	0,71
Total de microrganismos	42/140	30,0

Segundo Menezes (2013), o perfil microbiológico caracterizado compõe um grupo importante de bactérias, pois inclui a maioria das bactérias contaminantes de alimentos, tanto as deteriorantes que causam alterações organolépticas do produto, como as patogênicas que podem causar danos à saúde do homem.

A presença do gênero *Escherichia coli* nos resultados da caracterização microbiológica em ovos neste estudo estão entre os gêneros bacterianos comumente envolvidos na deterioração desse alimento, segundo Aragon-Alegro et al. (2005) sugerindo a ocorrência de uma contaminação de origem fecal. As demais bactérias gram negativas isoladas pertencentes ao grupo de coliformes totais, além de serem encontradas nas fezes, também estão presentes no solo e na água. Considerando que a legislação brasileira (Brasil, 2001) não estabelece padrões específicos para a presença destes microrganismos, o presente estudo é relevante por indicar condições higiênicas insatisfatórias.

No presente estudo, observou-se a presença de 04 amostras positivas com a presença dos microrganismos *Enterobacter spp.* e 01 *Proteus mirabilis*, similar aos encontrados por Ge et al. (2016) no isolamento, identificação e

caracterização de patógenos isolados de alimentos de conteúdo interno do ovo na China, no qual relataram que a presença dos microrganismos *Enterobacter* spp e *Proteus mirabilis* são comumente encontrados no trato intestinal das aves.

Das 38 amostras de ovos positivas observou-se a presença 24 amostras com o microrganismo *Staphylococcus* spp. todos negativos para o teste da coagulase, totalizando 57,14% dos 42 isolados e 24/140 (17,1%) nas 140 amostras de ovos. Estes resultados foram superiores aos encontrados por Klein e colaboradores em 2010, que verificou a presença de *Staphylococcus* coagulase negativa em 11,8% nas 144 amostras de ovos comercializados no estado de Minas Gerais. Os 24 microrganismos *Staphylococcus* spp. isolados neste trabalho foram identificados quanto a espécie e foram: 1/24 *Staphylococcus capitis*, 1/24 *Staphylococcus carnosus*, 1/24 *Staphylococcus chromogenes*, 1/24 *Staphylococcus schleiferi*, 2/24 *Staphylococcus Kloosii*, 2/24 *Staphylococcus pulvereri*, 2/24 *Staphylococcus saccharolyticus*, 2/24 *Staphylococcus cohnii*, 3/24 *Staphylococcus saprophyticus*, 4/24 *Staphylococcus epidermidis* e 5/25 *Staphylococcus galinarium*.

O microrganismo *Staphylococcus saprophyticus*, segundo Widerstrom et al. (2012), é um patógeno perigoso para pessoas imunocomprometidas. Sua virulência foi comparada a do *Staphylococcus aureus* no estudo identificação e caracterização de patógenos transmitidos por alimentos de conteúdo interno do ovo na China, realizado por Ge et al. (2016). Entretanto, estudos feitos por Andrade et al. (2004) não encontraram a presença deste microrganismo na avaliação microbiológica de ovos de galinhas comercializados em Goiânia-Go. No Brasil, apesar da legislação vigente não apresentar parâmetros para a presença desta bactéria em ovos, os resultados encontrados com a presença de *Staphylococcus* coagulase negativa devem ser consideradas, pois segundo Freitas et al. (2009), existe a possibilidade desse microrganismo produzir toxinas responsáveis por causar intoxicação alimentar e a sua incidência pode indicar falhas nas condições de manejo, durante a criação, e ainda, a falha nos cuidados higiênicos na sua manipulação.

3. Teste de susceptibilidade antimicrobiana e Detecção de genes de resistência antimicrobiana por PCR

Com relação ao teste de susceptibilidade antimicrobiana, todas as 42 bactérias isoladas de ovos inspecionados comercializados na região do Distrito Federal foram submetidas a pelo menos um teste e os resultados estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2. Teste de resistência antimicrobiana realizados em microrganismos isolados de ovos inspecionados na região do Distrito Federal.

Agente Antimicrobiano	Acinetobacter spp. (n=01)			Corynebacterium spp. (n=01)			Enterobacter spp. (n=04)			Escherichia coli (n=04)			Hafnia alvei (n=03)			Proteus mirabilis (n=01)			Providencia spp. (n=01)			Pseudomonas spp. (n=02)			Staphylococcus spp. (n=24)			Yersinia spp. (n=01)					
	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)	S (%)	I (%)	R (%)			
AMO	0	0	100	0	0	100	0	0	100	33,3	0	66,6	100	0	0	100	0	0	100	0	0	50	0	50	0	87,5	0	12,5	100	0	0		
AMP	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	50	0	50	0	100	0	0	100	0	0	0		
CFE	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	33,3	0	66,6	100	0	0	100	0	0	50	0	50	0	83,3	16,7	0	0	100	0	0		
CFL	0	0	100	0	0	100	0	0	100	33,3	0	66,6	100	0	0	100	0	0	100	0	0	50	0	50	0	100	0	0	100	0	0	0	
CAZ	100	0	0	100	0	0	100	0	0	66,6	0,0	33,3	100	0	0	100	0	0	100	0	0	50	50	0	45,8	37,5	16,7	100	0	0	0		
CFZ	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	33,3	66,6	100	0	0	100	0	0	100	0	0	50	0	50	0	100	0	0	0	0	100	0	
CIP	100	0	0	0	100	0	0	100	0	66,6	33,3	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	0	0	100	0	
CLO	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	95,8	4,2	0	100	0	0	
DOX	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	62,5	29,2	8,3	100	0	0	
ENO	100	0	0	0	100	25	75	0	0	100	0	33,3	66,6	0,0	0	0	100	0	0	100	0	0	50	50	0	58,3	29,2	12,5	100	0	0	0	
ERI	0	100	0	0	0	100	0	75	25	0	0	100	33,3	33,3	0	0	100	0	0	100	0	0	100	50	0	79,2	12,5	8,3	100	0	0	0	
EST	0	0	100	100	0	0	100	0	0	100	0	33,3	66,6	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	87,5	4,2	8,3	0	0	100	0	
GEN	0	100	0	100	0	0	100	0	0	100	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	0
NEO	0	0	100	100	0	0	100	0	0	100	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	100	0	0	95,8	4,2	0	100	0	0	0
SUL	0	0	100	100	0	0	0	0	100	100	0	66,6	0	33,3	0	0	100	0	0	100	0	0	50	0	50	0	83,3	0	16,7	100	0	0	0
TET	100	0	0	100	0	0	0	100	0	100	0	33,3	33,3	33,3	0	0	100	100	0	0	100	0	0	100	0	0	41,7	8,3	50	100	0	0	0
VAN	0	0	100	100	0	0	0	0	100	0	0	100	33,3	0	66,6	0	0	100	0	0	100	0	0	100	50	0	100	0	0	100	0	0	0

AMO=amoxicilina;AMP=ampicilina;CFE=cefalexina;CAZ,Ceftazidima;CIP=ciprofloxacina;CLO=clorafenicol;DOX=doxicilina;

ENO=enrofloxacina;ERI=eritromicina;EST=estreptomicina;GEN=gentamicina;NEO=neomicina;SUL=sulfonamidas;

TET=tetraciclina;VAN=vancomicina; S=Sensível; I= Intermediário; R=Resistente.

Foram observados 14/42 (33,3%) dos microrganismos isolados resistentes a Tetraciclina e Vancomicina, sendo importante ressaltar que o uso do antimicrobiano Tetraciclina na alimentação de frangos está proibido no Brasil desde 2009, segundo a Instrução Normativa nº 26 no Regulamento Técnico para a Fabricação, o Controle de Qualidade, a Comercialização e o Emprego de Produtos Antimicrobianos de Uso Veterinário (Brasil, 2009). Foi observado em 12/42 (28,5%) dos isolados resistência à Amoxicilina, Eritromicina e Sulfonamidas, 11/42 (26,1%) dos isolados foram resistentes a Ampicilina, 10/42 (23,8%) dos isolados resistentes à Cefazolina, 9/42 (21,4%) dos isolados resistentes à Cefalotina, 6/42 (14,2%) dos isolados resistentes à Enrofloxacina e Estreptomicina, 5/42 (11,9%) dos isolados resistentes à Cefalexina e Ceftazidima, 3/42 (7,1%) dos isolados resistentes à Doxiciclina, somente 1/42 (2,3%) dos isolados apresentaram resistência à Ciprofloxacina e Neomicina e nenhum dos microrganismos foram resistentes ao Clorafenicol e Gentamicina.

Os 04 microrganismos *Escherichia coli* isolados foi resistente a seis tipos de antibióticos: Amoxicilina, Ampicilina, Cefalotina, Cefazolina, Eritromicina e Vancomicina, resultados semelhantes aos encontrados por Musgrove et al. (2006) em que o microrganismo *Escherichia coli* também foi resistente ao antibiótico Cefalotina, no estudo de resistência antimicrobiana em *Salmonella* e *Escherichia coli* isolados da casca de ovos comerciais nos Estados Unidos.

O microrganismo *Pseudomonas* spp. foi resistente a oito tipos de antibióticos e a *Hafnia* spp. foi resistente a onze diferentes fármacos. Os resultados obtidos no presente estudo, nos quais os microrganismos isolados de ovos inspecionados comercializados na região do Distrito Federal foram resistentes a múltiplos antimicrobianos, vai ao encontro às revisões de Titze e Palermo-Neto, 2005; e aos estudos de Dallal, 2010; Alvarez-Fernández et al., 2012, no qual relataram que Enterobactérias patogênicas são frequentemente encontradas em materiais e produtos avícolas, sendo veiculados por alimentos e relatadas em episódios de múltiplas resistência a diversos antimicrobianos.

Tendo em vista a ampla resistência a antimicrobianos observados no presente trabalho, o teste de antibiograma foi importante para a identificação

do agente antimicrobiano e sugere que maiores estudos sejam realizados para se detectar a origem das resistências verificadas.

Com relação aos resultados da detecção dos genes de resistência antimicrobiana, nenhum dos 42 microrganismos isolados dos ovos inspecionados comercializados na região do Distrito Federal apresentou genes de resistência para Sulfonamidas (sul1); para Beta-lactâmicos (SHV); para Clorafenicol (cat1); aac(3)-I para Aminoglicosídeos e tet(M) para Tetraciclina.

Os resultados obtidos por Mezhoud et al. (2016) foram diferentes aos encontrados neste trabalho, pois estes autores encontraram a presença do gene SHV para Beta-lactâmicos no microrganismo *Enterobacter cloacae* em estudo de presença de resistência antimicrobiana em bactérias coliformes da incubação de ovos de frango com ênfase em bactérias produtoras de ESBL/Amp C em amostras coletadas na Bélgica, Países Baixos e França. No Brasil, não há trabalhos de detecção de genes de resistência antimicrobiana em bactérias isoladas neste tipo de alimento, sendo este um dos primeiros. No entanto, a não detecção dos genes verificados neste estudo, também não permitem afirmar que não há presença destes genes. Maiores estudos devem ser conduzidos com outros genes de resistência para a verificação da circulação em bactérias presentes neste alimento, que inclusive possam induzir resistência cruzadas.

Na detecção do gene da integrase Int1 apenas os microrganismos *Hafnia alvei*, *Staphylococcus scheifer* e *Pseudomonas alcaligenes* foram positivos para o gene Int1, em que os fragmentos de 280bp foram visualizados (Figura 1).

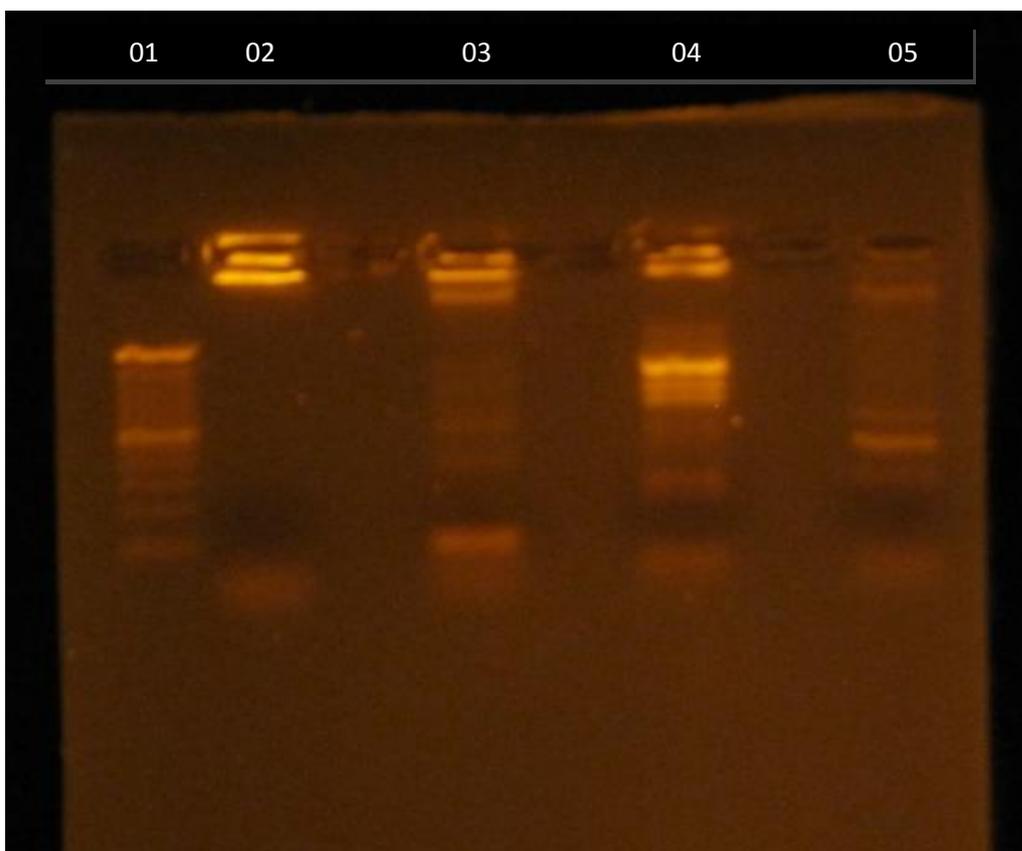


Fig.1. PCR para detecção do gene da Integrase IntI1. 1) Marcador DNA *ladder*100bp; 2) reação negativa para *oprimer IntI1*; 3,4,5) reação positiva para o *prime IntI1* (280pb). Visualização em gel de agarose a 1,5% com concentração de 1% de brometo de etídio.

Dos microrganismos que foram observados com a presença do gene IntI1, o microrganismo *Hafnia alvei* também apresentou no teste de susceptibilidade antimicrobiana resistência à Vancomicina, Sulfonamidas, Ampicilina e Tetraciclina. O microrganismo *Staphylococcus schleifer* apresentou no teste de susceptibilidade antimicrobiana resistência à Sulfonamidas e o microrganismo *Pseudomonas* spp resistência à Vancomicina, Cefalotina, Ampicilina, Cefalexina, Cefazolina, Eritromicina, Enrofloxacina e Amoxicilina. A presença do gene da integrase pode estar contribuindo para as resistências observadas. No entanto, deve-se realizar o sequenciamento para a verificação de genes que possam estar ocasionando o fenótipo de resistência.

Di Conza e Gutking (2010) concluíram que a presença do gene da integrase IntI1 é um potencial indicativo de microrganismos capazes de

recrutar resistência a antibióticos, no qual o gene *Int1* é conhecido por ser uma parte essencial de todos os integrons que estão envolvidos na aquisição de resistência a antibióticos. (CAMBRAY et al. 2010). Em relação aos resultados obtidos neste trabalho, maiores estudos devem ser conduzidos para se verificar a origem das resistências observadas.

IV. CONCLUSÕES

Não foi detectada a presença de *Salmonella* spp. nas amostras analisadas, no entanto, o monitoramento deve ser contínuo levando-se em consideração o tamanho da amostra e a importância do microrganismo em Saúde Pública. Os resultados de caracterização microbiológica encontrados neste trabalho permitem concluir que há presença de vários microrganismos na clara e na gema de ovos inspecionados comercializados na região do Distrito Federal, os quais apresentam variada resistência antimicrobiana, apesar de não terem sido detectados os genes de resistência propostos, com exceção do gene da integrase 1, que pode estar contribuindo para a resistência fenotípica observada neste estudo. Mais estudos devem ser conduzidos para se verificar a real presença do microrganismo *Salmonella* spp., bem como para investigar os mecanismos das resistências observadas.

V. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA. **Relatório anual da Sociedade Brasileira de Proteína Animal**, em 2015. Disponível em: < <http://abpa-br.com.br>>. Acesso em: 20 de dez. 2016.

ANDRADE, M.A.; CAFÉ, M.B.; SÁ JAYME, V.; ROCHA, P.T.;; LEANDRO, N.S.M.; STRINGHINI, J.H. Avaliação da qualidade bacteriológica de ovos de galinha comercializados em Goiânia, Goiás, Brasil. **Ciência Animal Brasileira**. V.5, n.4, p.221-228, 2004.

ARAGON-ALEGRO, L.C.; SOUZA, K. L. O.; SOBRINHO, P. S. C.; LANDGRAF, M.; DESTRO, M. T. Avaliação da qualidade microbiológica de ovo integral pasteurizado produzido com e sem a etapa de lavagem no processamento. **Ciênc.Tecnol.Aliment.**, v. 25, n. 3, p. 618-622, 2005.

BARON, E.J.O.; PETERSON, L.R.; FINEGOLD, S.M. Bailey e Scott`s. **Diagnostic Microbiology**. 9a ed. Mosby, 1994.

BASS, L; LIEBERT, C.A.; LEE, M.D.; SUMMERS, A.O.; White D.G.; THAYER, S.G.; MAURER, J.J. Incidence and Characterization of Integrons, Genetic Elements Mediating Multiple-Drug Resistance, in avian *Escherichia coli*. **Antimicrob Agents Chemother**, 43(12):2925-9, 1999.

BAUER, A. W.; KIRBY, M. M. W.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, Chicago, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BRASIL 2001. Ministério da Saúde. **Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001**. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF,. Seção 1, p. 46-53, 10 jan. 2001.

Brasil 2003a. **Instrução Normativa nº 62, 26 de Agosto de 2003**. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003 .

BRASIL 2003b. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 70, de 06 de outubro de 2003**. Programa de Redução de Patógenos – Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* ssp. em Carcaças de Frangos e Perus, 2003. Diário Oficial da União de 10 out. 2003, seção 1, p. 9, 2003.

BRASIL 2009. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Instrução Normativa nº 26, de 09 de Julho de 2009**. Regulamento Técnico para a Fabricação, o Controle de Qualidade, a Comercialização e o Emprego de Produtos Antimicrobianos de Uso Veterinário, 2009.

BRASIL2016. **Brasil vai vender para a Colômbia ovos utilizados na fabricação de vacinas**. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br>>.. Acesso em: 20 de dez. 2016.

CAMBRAY, G.; GUEROUT, A.M.; MAZEL, D. Integron. **Annu Ver. Gente.** 44:141-166, 2010.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2016.

COSTA, C.R.; PAIVA, A.N.; BERENCHTEIN, B.; LEHMKUHL, A.M.S.; SANTOS, A.N.A.; MOLENEDO, R.R.C. Avaliação microbiológica em ovos comerciais lavados e não lavados. **Ver.Cient. Avic. Suin.**, v.2, n.1, p.001-010, 2016.

DI CONZA, A.J.; GUTKIND, G.O. Integrons: gene collectors. Ver. **Argent. Microbiol.** 42(1):63-78, 2010.

DIERIKX, C.M.; VAN DUIJKEREN, E.; SCHOORMANS, A.H.; VAN ESSENZANDBERGEN, A.; VELDMAN, K.; KANT, A.; HUIJSDENS, X.W.; VAN DER ZWALUW, K.; WAGENAAR, J.A. & MEVIUS, D.J. Occurrence and characteristics of extended-spectrum- β -lactamase-and AmpC- producing clinical isolates derived from companion animals and horses. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** 67, 1368-1374, 2012.

GE, Z.; XUE, S.; JIANMEI.; YUEHUA, L.; JUAN, W.; XIUMEI, H.; ZHINA, Q.; YUDONG, W.; SHIGAN, Y. Isolation, Identification, and characterization of foodborne pathogens isolated from egg internal contents in China. **Journal of Food Protection**, vol. 79, n. 12, p. 2107-2112, 2016.

GREESON, K.; SULIMAN, G.M.; SAMI, A.; ALOWAIMER, A.; KOOHMARAIE, M.; Frequency of antibiotic resistant Salmonella, Escherichia coli, Enterococcus, and Staphylococcus aureus in meat in Saudi Arabia. **African Journal of Microbiology Research**, v.7, n.4, p.309-316, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. **Estatística da produção pecuária Indicadores IBGE. 2016.** Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br//2016>>. Acesso em: 20 dez. 2016.

KLEIN, R. W. T. **Avaliação da qualidade interna de ovos de consumo submetidos a diferentes condições de armazenamento.** 48f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; JR, W.C.W. **Diagnóstico Microbiológico-Texto e Atlas Colorido.** São Paulo: Medsi, 5 ed., 2001.

KOTTWITZ, L.B.; SCHEFFER, M.C.; COSTA, L.M.D.; LEÃO, J.A.; BACCK, A.; RODRIGUES, M.M.; OLIVEIRA, M.T.C.R. Perfil de resistência a antimicrobianos, fagotipagem e caracterização molecular de cepas de Salmonella Enteridis de origem avícola. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.33, n.2, p. 705-712, 2012.

LUPO, A.; COYNE, S.; AND BERENDONK, T.U. Origin and evolution of antibiotic resistance: The common mechanisms of emergence and spread in water bodies. **Front. Microbiol.** V. 3, n. 18,2012.

MAPA 1952. Decreto n. 30691. 1952. 381 f. **Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal** – Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Secretaria de Defesa Agropecuária, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Brasília.

MÁRQUEZ, M.L.F.; BURGOS, M.J.G.; PULIDO, A.G. AND LÓPEZ, R.L. Biocide tolerance and antibiotic resistance in *Salmonella* isolates from hen egg shells. **Food borne Pathogens And Disease.** Doi:10.1089/fpd.2016.2182.2016.

MENEZES, L.D.M.; **Caracterização microbiológica de ovos de consumo e de carcaças de frango produzidos no Estado de Minas Gerais.** Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010, 104p. Tese Doutorado.

MEZHOUD, H.; CHANTZIARAS, I.; IGUER-OUADA, M.; MOULA, N.; GARMYN, A.; MARTEL, A.; TOUATI, A.; SMET, A.; HAESBROUCK, F.; BOYEN, F. Presence of antimicrobial resistance in coliform bacteria from hatching broiler eggs with emphasis on ESBL/AmpC-producing bacteria. **Avian Pathology**, 2016.

MUSGROVE, M.T.; JONES, D.R.; NORTH CUTT, J.K.; COX, N.A.; HARRISON, M.A.; FEDORKA-CRAY, P.J.; LADELY, S.R. Antimicrobial resistance in *Salmonella* and *Escherichia coli* isolated from commercial shell eggs. **Poultry Science Association Inc.** v.85, p. 1665-1669, 2006.

OLIVEIRA, V.L.; TAHAM, T. Pesquisa de *Salmonella* spp. em ovos comercializados na região do Distrito Federal. **FAZU em Revista.** n.8, 2011.

PANDE, V.V.; GOLE, V.C. MCWHORTER, A.R.; ABRAHAM, S.; CHOUSALKAR, K.K. Antimicrobial resistance of non-typhoidal *Salmonella* isolates from egg layer flocks and egg shells. **International Journal of Food Microbiology** 203: 23-26, 2015.

RAHMAN, M.H., NONAKA, L., TAGO, R. & SUZUKI, S. Occurrence of two genotypes of tetracycline (TC) resistance gene test (M) in the TC-resistant bacteria in marine sediments of Japan. **Environ. Sci. Technol.** 42:5055- 5061, 2008.

RIBEIRO, A.R.; KELLERMANN, A. SANTOS, L.R.; BESSA, M.C.; NASCIMENTO, V;P. *Salmonella* spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n.2, p. 296-299, 2007.

ROWLANDS, R.E.G.; RISTORI, C.A.; IKUNO, A.A.; BARBOSA, M.L.; JAKABI, M.; FRANCO, B.D.G.M. Prevalence of drug resistance and virulence features in *Salmonella* spp. Isolated from foods associated or not with salmonellosis in Brazil. **Rev. Inst. Med. trop.** S. Paulo vol.56 n.6, p.461-467, 2014.

SCALLAN, E.; HOEKSTRA, R.M.; ÂNGULO, F.J.; TAUXE, R.V.; WIDDOWSON M-A.; ROY, S.L. et al. Food borne illness acquired in the United States- Major pathogens. **Emerg Infect Dis.**17:7-15, 2011.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. TANIWAKI, M.H.; SANTOS, R.F.S.; GOMES, R.A.R. **Manual de métodos de análises microbiológica de alimentos e água.** São Paulo: Varela, 4.ed., 2010. 632p.

SINGH, S.; YADAV, A.S.; SINGH, S.M.; BHARTI, P. Prevalence of Salmonella in chicken eggs collected from poultry farm via marketing channels and their antimicrobial resistance. **Food Research International.** 43:2027-2030, 2010.

SIRIKEN, B.; TURK, H.; YILDIRIM, T.; DURUPINAR, B.; EROL, I. Prevalence and characterization of Salmonella isolated from chicken meat in Turkey. **Journal of Food Science**, v. 80, n.5, 2015.

STRINGHINI, M.L.F.; ANDRADE, M.A.; MESQUITA, A.J.; ROCHA, T.M.; REZENDE, P.M.; LEANDRO, N.S.M. Características bacteriológicas de ovos lavados e não lavados de granjas de produção comercial. **Ciência Animal Brasileira**, v.10, n.4, 2009.

VAN, T.T.H.; CHIN, J.; CHAPMAN, T.; TRAN, L.T.; COLOE, P.J. Safety of raw meat and shell fish in Vietnam: An analysis of Escherichia coli isolations for antibiotic resistance and virulence genes. **Int J Food Microbiol.** 124: 217-223, 2008.

OHTSUKA, K.; YANAGAWA, K.; TAKATORI, K.; HARA-KUDO, Y. Detection of *Salmonella enterica* in naturally contaminated liquid eggs by loop-mediated isothermal amplification, and characterization of Salmonella isolates. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 71, n.11, p 6730-6735, 2005.

WEI, S.; MORRISSON, M.; YU, Z. Bacterial census of poultry intestinal microbiome. **Poultry Science**, v.92, n.3, p.671-683, 2013.

WIDERSTROM, M.; WISTROM, J.; SJOSTEDT, A.; MONSEN, T. Coagulase negative Staphylococci: update on the molecular epidemiology and clinical presentation, with a focus on Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus saprophyticus. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**31:7-20, 2012.

FREITAS, M.F.L.; LUZ, I.S.; PINHEIRO JUNIOR, J.W. Detecção genes toxigênicos em amostras de *Staphylococcus* spp. Isolados de queijos de coalho. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, v.29, p. 375-379, 2009.

TITZE, R.A.; PALLERMO-NETO, J. **Uso de antimicrobianos em avicultura e o desenvolvimento de Resistência bacteriana.** In: PALLERMO-NETO, J.; SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L. Farmacologia aplicada à avicultura. 1.ed. São Paulo: Roca, p. 161-173, 2005.

DALLAL, M.M.S.; DOYLE, M.P.; REZADEHBASHI, M. et al. Prevalence and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* serotypes, *Campylobacter* and *Yersinia* spp. Isolated from retail chicken and beef, Tehran, Iran. **Food Control**, v.21, n.4, p.388-392, 2010.

ALVAREZ-FERNÁNDEZ, E.; ALONSO-CALLEJA, C.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, C. et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Spain: comparison between 1993 and 2006. **International Journal of Food Microbiology**, v.153, p.281-287, 2012.