

OCORRÊNCIA DE *Salmonella* spp. EM LINGUIÇAS COMERCIALIZADAS NO SUL DO RIO GRANDE DO SUL

PÂMELA INCHAUSPE CORRÊA ALVES¹; ITIANE BARCELLOS JASKULSKI²; LETÍCIA KLEIN SCHEIK²; LISSETH PAMELA PERALTA CANCHIS²; ISABELA SCHNEID KRONING²; WLADIMIR PADILHA DA SILVA³

¹Universidade Federal de Pelotas – pam.inchauspe@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – itianebarcellosj@hotmail.com; leticiascheik@hotmail.com; lpc_07@hotmail.com; isabelaschneid@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – wladimir.padilha2011@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As linguiças são derivados cárneos obtidos de carnes de animais de açougue, adicionadas ou não de tecidos adiposos, ingredientes, embutidas em envoltório natural ou artificial e submetidas ao processo tecnológico adequado (BRASIL, 2000). Os produtos de origem animal são constantemente manipulados nas etapas da cadeia produtiva até a sua rede de distribuição. Dessa forma, eleva-se o risco de contaminação por micro-organismos patogênicos e deteriorantes, que podem ser oriundos da matéria-prima ou de indevida manipulação durante o processamento (SOUZA et al., 2014).

Dentre os principais micro-organismos patogênicos responsáveis por doenças transmitidas por alimentos (DTA) se encontra *Salmonella* spp.. O gênero *Salmonella*, pertence à família Enterobacteriaceae, apresenta-se como bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, geralmente móvel por flagelos peritíquios (POPOFF & LE MINOR, 2015). Esse gênero possui capacidade de invadir a mucosa intestinal e provocar uma gastroenterite, denominada salmonelose, em humanos (YOSHIDA et al., 2016).

Diversos fatores de virulência são reconhecidos como fundamentais para a sobrevivência de *Salmonella* spp. no organismo do indivíduo infectado e no meio ambiente. Os genes que expressam as proteínas responsáveis pelos fatores de virulência nessa bactéria são encontrados, principalmente, em plasmídeos e nas Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella* (SPI), como os genes *pefA* e *sefA*, que codificam e expressam fímbrias, o gene *spvC*, que codifica o plasmídeo de virulência de *Salmonella* spp. e o gene *invA*, responsável pela invasão celular (ALZWGHAIBI et al., 2018; BARILLI et al., 2018; KARACAN SEVER & AKAN, 2018).

Diante do exposto, objetivou-se avaliar a presença de *Salmonella* spp. em linguiças provenientes de produtores da região sul do Rio Grande do Sul e, a partir dos isolados, realizar a confirmação molecular do gênero *Salmonella* spp., bem como o perfil de virulência.

2. METODOLOGIA

Foram avaliadas 252 amostras de linguiças provenientes de produtores da região sul do Rio Grande do Sul. As amostras foram mantidas sob refrigeração (4 °C) até o momento do processamento, no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas (DCTA/FAEM/UFPel).

Para o isolamento de *Salmonella* spp., as amostras foram analisadas pelo método descrito pela International Organization for Standardization (ISO - 6579), com algumas modificações. Inicialmente, 25 g de cada amostra foram

homogeneizadas em 225 mL de água peptonada tamponada (APT, Oxoid) e incubadas a 37 °C por 24 h, caracterizando a etapa de pré-enriquecimento. Em seguida, na etapa de enriquecimento seletivo, alíquotas de 0,1 mL e 1 mL foram transferidas para caldo Rappaport-Vassiliadis (RV, Acumedia) e caldo Tetratônato (TT, Acumedia), respectivamente, com incubação a 42 °C em banho maria por 24 h, para o caldo RV e 37 °C por 24 h para o caldo TT. Uma alçada de cada meio da etapa de enriquecimento seletivo (RV e TT) foi semeada em placas contendo ágar Entérico de Hektoen (HE, Himedia) e ágar Xilose Lisina Desoxicolato (XLD, Kasvi) com incubação a 37 °C por 24 h. As colônias típicas de *Salmonella* spp. foram submetidas à análise de bioquímismo em ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI, Kasvi), ágar Lisina Ferro (LIA, Acumedia), ágar Ureia (Vetec Química Fina Ltda.), Indol (Vetec Química Fina Ltda.) e testes de oxidase (Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda.). A confirmação dos isolados de *Salmonella* spp. foi realizada através de testes sorológicos com soros anti-*Salmonella* polivalentes somático e flagelar (Probac).

Para a verificação da presença dos genes de virulência, primeiramente se realizou a extração do DNA genômico, segundo o protocolo descrito por ELLINGTON et al. (2007). A confirmação molecular dos isolados de *Salmonella* spp. foram realizados por ensaios de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), pela detecção do gene *hilA* e detecção dos genes de virulência (*invA*, *spvC*, *sefA* e *pefA*). Os isolados caracterizados fenotípica e molecularmente foram enviados à Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) para identificação do sorovar.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), pela resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001, o padrão microbiológico estabelecido para embutidos frescais e produtos cárneos maturados, em que se enquadram as linguiças cruas e similares, é a ausência de *Salmonella* spp. em 25 g de alimento (BRASIL, 2001). Na Tabela 1 são apresentados os dados obtidos no isolamento de *Salmonella* spp. em amostras de linguiça.

Tabela 1. Características de isolados de *Salmonella* spp. provenientes de linguiças comercializadas no sul do Brasil

Isolados	Origem	Sorovar	Genes de virulência
1	Linguiça mista colonial	Typhimurium	<i>invA</i> , <i>spvC</i> , <i>pefA</i>
2	Linguiça caseira	Typhimurium	<i>invA</i> , <i>spvC</i> , <i>pefA</i>
3	Linguiça suína	Shwarzengrude	<i>invA</i> , <i>spvC</i>
4	Linguiça mista	Rissen	<i>invA</i>
5	Linguiça calabresa frescal	Give	<i>invA</i>
6	Linguiça de frango com queijo	Rissen	<i>invA</i>
7	Linguiça suína com queijo	Rissen	<i>invA</i>
8	Linguiça mista	Give	<i>invA</i>

9	Linguiça suína com queijo parmesão	Derby	<i>invA, sefA</i>
10	Linguiça suína	Rissen	<i>invA</i>
11	Linguiça mista frescal	Infantis	<i>invA</i>
12	Linguiça frescal	Infantis	<i>invA</i>
13	Linguiça defumada	Infantis	<i>invA</i>
14	Linguiça frescal	Infantis	<i>invA</i>

Salmonella spp. foi isolada em 14 das 252 amostras de linguiça avaliadas (5,55%), as quais estavam em desacordo com os padrões da legislação vigente. Resultado similar foi obtido por ED-DRA et al. (2017), que encontraram *Salmonella* spp. em 21,79% das amostras de linguiça provenientes de diferentes estabelecimentos avaliados. Da mesma forma, TRIMOULINARD et al. (2017) verificaram a ocorrência de *Salmonella* spp. em 11,8% de 203 amostras de linguiça.

Todos os 14 isolados foram confirmados como pertencentes ao gênero *Salmonella* spp. pela amplificação do gene *hilA* (fragmento de 413 pb). Além disso, os 14 isolados (100%) abrigavam o gene *invA*, responsável pela invasão de *Salmonella*. Para os demais genes testados, o gene *spvC* foi detectado em três isolados (21,43%), enquanto os genes *pefA* e *sefA* foram detectados apenas em dois isolados (14,28%) e um isolado (7,14%), respectivamente (Tabela 1).

ED-DRA et al. (2017) também verificaram a presença do gene *invA* em 100% dos isolados de *Salmonella* spp., o que pode ser explicado por esse gene ser conservado nessa espécie bacteriana e auxiliar na invasão celular. Com relação ao gene *spvC*, KARACAN SEVER & AKAN (2019) verificaram a presença em 8,92% dos isolados estudados, enquanto ZADERNOWSKA & CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA (2017) relataram uma prevalência de 18,7%. Já a presença dos genes *pefA* e *sefA*, relatada nesse estudo, também foi reportada por outros autores (BORGES et al., 2019; THUNG et al. 2018).

4. CONCLUSÕES

A presença de *Salmonella* spp. nas amostras de linguiça comercializadas no sul do Rio Grande do Sul demonstra um risco potencial para os consumidores. Além disso, os isolados apresentam potencial de virulência por carrearem genes envolvidos no mecanismo de patogenicidade da bactéria.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União. Brasília, 2 de janeiro de 2001.
- ALZWGHAIBI, A. B.; YAHYARAHEYAT, R.; FASAEI, B. N.; LANGEROUDI, A. G.; SALEHI, T. Z. Rapid molecular identification and differentiation of common *Salmonella* serovars isolated from poultry, domestic animals and foodstuff using multiplex PCR assay. *Archives of Microbiology*, v. 200, n. 7, p.1009-1016, 2018.
- BARILLI, E.; BACCI, C.; STELLAVILLA, Z.; MERALDI, G.; D'INCAU, M.; BRINDANI, F.; VISMARRA, A. Antimicrobial resistance, biofilm synthesis and

- virulence genes in *Salmonella* isolated from pigs bred on intensive farms. **Italian Journal of Food Safety**, v. 7, n. 2, p. 7223, 2018.
- BRASIL. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Lingüiça.** Brasil: Ministério da Agricultura, 2000.
- BORGES, K. A et al. Antimicrobial Resistance and Molecular Characterization of *Salmonella Enterica* Serotypes Isolated from Poultry Sources in Brazil. **Braz. J. Poult. Sci.**, Campinas, v. 21, n. 1, eRBCA-2019-0827, 2019.
- BRUNO, B. T.; DOS SANTOS, L. A.; REZENDE, C. Biomarkers research in sausages sold in bulk in supermarkets of the Northwest Region of São Paulo state. **Revista Brasileira Multidisciplinar-ReBraM/Brazilian Multidisciplinay Journal**, v. 18, n. 1, p. 189-197, 2015.
- ED-DRA, A.; FILALI, F. R.; KARRAOUAN, B.; EL ALLAOUI, A.; ABOULKACEM, A.; BOUCHRIF, B. Prevalence, molecular and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from sausages in Meknes, Morocco. **Microbial pathogenesis**, v. 105, p. 340-345, 2017.
- ELLINGTON, M. J.; KISTLER, J.; LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 321-322, 2007.
- FIGUEIREDO, R., HENRIQUES, A., SERENO, R., MENDONÇA, N., SILVA, G. Resistencia a antibióticos em isolados de *Salmonella* entérica em alimentos de origem animal. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, Lisboa**, v.108, p.39-43, 2013.
- ISO 6579. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp., 4ed, 2002. The International Organization for Standardization, 2007.
- POPOFF, M.Y. & LE MINOR, L.E. *Salmonella*. In: **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**. 2015. p.79.
- SOUZA, M. D., PINTO, F. G. D. S., BONA, E. A. M. D., MOURA, A. C. D. Qualidade higiênico-sanitária e prevalência de sorovares de *Salmonella* em linguiças frescas produzidas artesanalmente e inspecionadas, comercializadas no oeste do Paraná, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, p. 107-12, 2014.
- THUNG, T. Y. et al. Prevalence, Virulence Genes and Antimicrobial Resistance Profiles of *Salmonella* Serovars from Retail Beef in Selangor, Malaysia. **Front. Microbiol.**, v. 8, 2017.
- TRIMOULINARD, A.; BERAL, M.; HENRY, I.; ATIANA, L.; PORPHYRE, V.; TESSIER, C.; CARDINALE, E. Contamination by *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and *Listeria* spp. of most popular chicken-and pork-sausages sold in Reunion Island. **International journal of food microbiology**, v. 250, p. 68-74, 2017.
- YOSHIDA, C., GURNIK, S., AHMAD, A., BLIMKIE, T., MURPHY, S.A., KROPINSKI, A.M. & NASH, J.H. Evaluation of molecular methods for identification of *Salmonella* serovars. **Journal of clinical microbiology**, v. 54, p. 1992-8, 2016.
- ZADERNOWSKA, A., & CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA, W. Prevalence, biofilm formation and virulence markers of *Salmonella* sp. and *Yersinia enterocolitica* in food of animal origin in Poland. **LWT**, v. 75, p. 552–556, 2017.