

## **ANÁLISE DA EFICÁCIA DE MÉTODOS BIOQUÍMICOS NA IDENTIFICAÇÃO DE *SALMONELLA SPP.* EM AMOSTRAS AMBIENTAIS DE PRODUÇÕES AVÍCOLAS DE PEQUENO PORTE**

Renata Lopes Simões da Silva<sup>1</sup>  
Victor Manuel C. F. Balcão<sup>2</sup>  
Marta Maria D. C. Vila<sup>3</sup>

Implementação de práticas agrícolas sustentáveis

### *Resumo*

As infecções causadas por *Salmonella* spp. representam um grave problema de saúde pública devido à sua alta prevalência em alimentos de origem animal. A correta identificação dessa bactéria é essencial para a prevenção de surtos de doenças transmitidas por alimentos, especialmente, em granjas de pequeno porte ou de subsistência, onde as práticas de biossegurança são limitadas. Este estudo objetivou comparar três métodos de identificação de *Salmonella* spp. em amostras de fezes de galinhas semidomiciliadas. As amostras foram coletadas em pequenas propriedades rurais de Sorocaba/SP e região. Após a etapa de enriquecimento, as amostras foram cultivadas em ágar *Shigella-Salmonella*. Todas as amostras apresentaram colônias enegrecidas, indicativas de *Salmonella* spp. No entanto, ao serem submetidas ao Enterokit B®, três amostras foram identificadas como *Proteus* spp., provavelmente, devido às semelhanças bioquímicas entre essas bactérias. Já as galerias API 20E® confirmaram a presença de *Salmonella* spp. nas amostras previamente identificadas como *Proteus* spp. Esses resultados demonstram a importância de utilizar métodos complementares para garantir a precisão no diagnóstico. A presença de reações cruzadas nos testes bioquímicos ressalta as limitações de métodos isolados. A combinação de métodos seletivos e testes bioquímicos é essencial para uma identificação confiável de *Salmonella* spp., contribuindo para a segurança alimentar e para a prevenção de surtos de salmonelose.

**Palavras-chave:** Biossegurança; Identificação bacteriana; Reação cruzada;

<sup>1</sup>Mestranda da Universidade de Sorocaba – Departamento VBLab, renata.96@outlook.com.

<sup>2</sup> Prof. Dr. Universidade de Sorocaba – Campus Cidade Universitária Aldo Vanucchi, Departamento VBLab, victor.balcão@prof.uniso.br

<sup>3</sup> Profª. Drª. Universidade de Sorocaba – Campus Cidade Universitária Aldo Vanucchi, Departamento VBLab, marta.vila@prof.uniso.br

## INTRODUÇÃO

As infecções causadas por *Salmonella* spp. estão entre as principais preocupações em saúde pública no Brasil e no mundo, devido ao seu impacto significativo na segurança alimentar e na saúde humana. Essas bactérias são responsáveis por diversas doenças dependendo do tipo de cepa que contamina o indivíduo, como febre tifoide, febres entéricas e enterocolites. A contaminação é geralmente associada ao consumo de alimentos contaminados, especialmente produtos de origem animal, como ovos e carnes de frango (De Cesare, 2018; Dawood, Hussein, Rasool, 2024; Silva *et al.*, 2019).

A *Salmonella* spp. é uma bactéria com forma de bacilo, anaeróbica facultativa, móvel ou não, oxidase negativa, Gram-negativa, pertencente à família *Enterobacteriaceae* (Silva *et al.*, 2019). Existem inúmeros sorovares de *Salmonellas*, sendo amplamente subdivididos nas espécies *Salmonella bongori* e *Salmonella entérica subsp. enterica*, sendo a entérica a que mais afeta os seres humanos (Eng *et al.*, 2015).

A proximidade entre humanos e animais domésticos, bem como a intensificação das práticas de produção animal, especialmente em pequenas propriedades rurais, aumentam o risco de transmissão zoonótica de *Salmonella* spp. O diagnóstico precoce e a correta identificação da bactéria dessa bactéria são essenciais para a prevenção de surtos e para o controle de doenças transmitidas por alimentos (Brasil, 2021).

Tradicionalmente, o diagnóstico é realizado por métodos de cultivo microbiológico, enriquecimento seletivo e testes bioquímicos, como ágar *Shigella-Salmonella*, Enterokit B® e galerias API 20E® (Brasil, 2003; Faustino, 2020). A literatura recomenda o isolamento de colônias bacterianas em ágar Verde-brilhante ou em ágar *Shigella – Salmonella* (Miranda *et al.*, 2020; Rocha *et al.*, 2020). Para os testes bioquímicos são recomendados o uso dos meios ágar Tríplice Açúcar Ferro), LIA (ágar Lisina Ferro), SIM (ágar Citrato de Simmons) e Caldo de Ureia, que podem ser substituídos pelo Enterokit B® da empresa Probac do Brasil (Miranda *et al.*, 2020; Sales *et al.*, 2021).

Este trabalho tem como objetivo comparar e analisar os resultados de três métodos na identificação de *Salmonella* spp. em amostras de fezes de galinhas semidomiciliadas.

## METODOLOGIA

### Coleta de Amostras e Pré-enriquecimento

Foram coletadas seis amostras de fezes de galinhas semidomiciliadas em pequenas propriedades rurais de Sorocaba/SP e região. Cada amostra (25 g) foi adicionada à 225 mL de caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) para pré-enriquecimento da bactéria, sendo incubada em estufa à temperatura de 37 °C por 24 h (Brasil, 1995).

### Métodos de Identificação de *Salmonella* spp.

**Ágar *Shigella-Salmonella*:** As amostras pré-enriquecidas foram semeadas em ágar *Shigella-Salmonella*, um meio de cultura seletivo e diferencial para a detecção de *Salmonella* spp., com base na produção de H<sub>2</sub>S, evidenciada pelo escurecimento das colônias (Lee *et al.*, 2015).

**Enterokit B®:** As amostras com colônias positivas no ágar *Shigella-Salmonella* foram submetidas ao Enterokit B®, que utiliza três meios bioquímicos: EPM (fermentação de glicose, produção de gás e H<sub>2</sub>S), MILi (motilidade, indol e descarboxilação de lisina) e Citrato de Simmons (utilização de citrato como única fonte de carbono). Esses testes bioquímicos são recomendados para a confirmação de *Salmonella* spp. (Miranda *et al.*, 2020).

**Galerias API 20E®:** A terceira abordagem consistiu no uso das galerias API 20E®, que avaliam 20 características bioquímicas das amostras, fornecendo um perfil mais detalhado de identificação. As galerias foram utilizadas conforme as instruções do fabricante, sendo incubadas à temperatura de 37°C por 24 h e os resultados analisados por comparação com uma base de dados (Faustino, 2020).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O primeiro passo do trabalho foi realizar a identificação em ágar *Shigella-Salmonella*, sendo que, todas as amostras apresentaram crescimento de colônias com a característica coloração enegrecida, indicativa de produção de H<sub>2</sub>S, típico de *Salmonella* spp. Esse método é amplamente utilizado devido à sua especificidade, inibindo o crescimento de bactérias Gram-positivas e permitindo a diferenciação entre *Salmonella* spp. e outras *Enterobacteriaceae*, como *Proteus* spp., *Escherichia coli*, e *Shigella* spp. (Lee *et al.*, 2015). No entanto, foram observadas divergências quando as mesmas amostras foram submetidas aos testes bioquímicos subsequentes.

No Enterokit B®, três amostras foram identificadas como *Proteus vulgaris* e *Proteus mirabilis*. Esses resultados podem ser explicados pelas características bioquímicas compartilhadas entre *Proteus* spp. e *Salmonella* spp., como a produção de H<sub>2</sub>S, lactose, lisina e oxidase negativas, produção de gás, urease positiva, desaminação de triptofano e fermentação de glicose (Pozza, 2012; Zappa, 2015). A similaridade bioquímica entre essas bactérias pode levar a falsos positivos ou reações cruzadas, o que ressalta a limitação de métodos únicos para uma identificação precisa.

Nas galerias API 20E®, que fornecem um perfil mais detalhado de características bioquímicas, as amostras inicialmente identificadas como *Proteus* spp. no Enterokit B® foram confirmadas como *Salmonella* spp. Essa confirmação reforça a importância do uso de métodos complementares para evitar erros de diagnóstico. Resultados semelhantes foram relatados por Faustino (2020), Nunes e Siliano (2016), que destacaram a ocorrência de reações cruzadas em pequenos sistemas de produção, onde o controle sanitário é menos rigoroso.

A necessidade de uma abordagem diagnóstica rigorosa é evidente em sistemas de produção de pequeno porte, onde o manejo sanitário inadequado pode levar a um aumento na prevalência de patógenos. Segundo Miranda *et al.* (2020) e Maia *et al.* (2011), pequenos criadores de aves frequentemente enfrentam surtos de *Salmonella* spp. devido à ausência de práticas de biossegurança, o que reforça a importância de métodos de diagnóstico acurados para a prevenção de surtos de salmonelose.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo comparativo sobre métodos de identificação de *Salmonella* spp. demonstrou a eficácia e as limitações de diferentes abordagens diagnósticas. O ágar *Shigella-Salmonella* mostrou-se eficaz no isolamento inicial de *Salmonella* spp., mas a ocorrência de reações cruzadas com *Proteus* spp. nos testes bioquímicos, como o Enterokit B®, evidenciou a necessidade de utilizar métodos complementares, como as galerias API 20E®, para garantir maior precisão no diagnóstico.

Os resultados confirmam que, em contextos de manejo sanitário inadequado, como observado nas pequenas propriedades rurais, a adoção de métodos preventivos rigorosos é crucial para evitar a propagação de *Salmonella* spp. e evitar surtos de doenças transmitidas por alimentos. Assim, o uso combinado de métodos seletivos e bioquímicos complementares é essencial para garantir a segurança alimentar e proteger a saúde da população em questão.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelas bolsas de estudos concedidas, no âmbito de projeto de pesquisa (Processos nº 301978/2022-0 (Bolsa PQ-2), Victor M. Balcão e 130205/2024-9 (bolsa de Mestrado no âmbito do Projeto Observatório (ref. 440869/2022-6), Renata Lopes Simões da Silva). À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, São Paulo, Brazil), pelos Apoios à Pesquisa concedidos a Victor M. Balcão (FAPESP Refs. No. 2022/10775-9 (Project PsgPhageKill) e 2023/03797-9).

## REFERÊNCIAS

- BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 26 de 03 de novembro de 1995. Normas de Credenciamento e Monitoramento de Laboratórios de Diagnóstico das Salmoneloses Aviárias (*S. Enteritidis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* e *S. Typhimurium*). **Diário Oficial da União**, p. 17694 – 17698, 1995.
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Instrução Normativa nº 78 de 03 de novembro de 2003. Normas técnicas para controle e certificação de núcleos e estabelecimentos avícolas como livres de *Salmonella Gallinarum* e de *Salmonella Pullorum* e livres ou controladas para *Salmonella Enteritidis* e para *Salmonella Typhimurium*. **Diário Oficial da União**, p. 3 - 5, 2003.
- BRASIL, Ministério da Saúde. **Boletim epidemiológico**: Doenças tropicais negligenciadas. Brasília, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/ptbr/assuntos/saude-de-a-a-z/t/tracoma/publicacoes/boletim-epidemiologico-doencastropicais-negligenciadas>. Acesso em: 19 set. 2024.
- DAWOOD, M. S.; HUSSEIN, N. H.; RASOOL, K. H. Genetic diversity, virulence profiles, and antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* serovar Typhi isolated from typhoid fever patients in Baghdad, Iraq. **Journal of Biosafety and Biosecurity**, v. 1, n. 1, pg. 1 – 20, 2024.
- DE CESARE, A. *Salmonella* in foods: A reemerging problem. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 86, p. 137–179, 2018.
- ENG, S.; PUSPARAJAH, P.; MUTALIB, N. A.; SER, H.; CHAN, K.; LEE, L. *Salmonella*: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. **Frontiers in Life Science**, v. 8, n. 3, p. 284-293, 2015.
- FAUSTINO, A. S. M. **Validação de pesquisa de *Salmonella* em 375g em amostra de várias matrizes pela ISSO 6579-1** (Dissertação de mestrado). Universidade do Porto, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Porto, Portugal, 2020.
- LEE, K-M; RUNYON, M.; HERRMAN, T.J.; PHILLIPS, R.; HSIEH, J. Review of *Salmonella*



detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. **Food Control**, v. 47, p. 264-276, 2015

MAIA, T. A. C.; RIBAS, J. R. L.; MOURA, L. G.; BATISTA, M. B.; GARRIDO, I.; SANTOS, J. C. M. Aves de quintal reagentes a *Salmonella* criadas no entorno de matrizeiros no polo avícola de Feira de Santana, Bahia. In: **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, v. 38, p. 1 – 3, 2011.

MIRANDA, V. S.; FERREIRA, N. L.; TOMAZ, L. D.; SILVA, V. S.; SILVA, K. S.; SILVA, S. E. L. Isolamento e identificação bioquímica da *Salmonella spp.* em frangos de corte. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 11, p. 89982 – 89993, 2020.

NUNES, K. O.; SILIANO, P. R. Identificação de bactérias presentes em aparelhos celulares. **Science in Health**, v. 7, n. 1, p. 22 – 25, 2016.

POZZA, J.; VOSS-RECH, D.; VAZ, C. S. L. *Proteus mirabilis* como contaminante no isolamento de *Campylobacter*. In: **6ª Jornada de Iniciação Científica Embrapa, II Seminário de Pesquisa e Extensão da UnC**, Concórdia, SC, 2012.

ROCHA, D. C. C.; MARINHO, A. N. R.; REIS, M. S. O.; BORGES, I. R.; RAMOS, F. L. P.; LOUREIRO, E. C. B. Perfil epidemiológico e caracterização molecular de *Salmonella Typhi* isoladas no eestado do Pará, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 4, p. 53 – 62, 2020.

SALES, B. C. F.; SILVA, C. P.; LAPORTA, M. Z.; SILIANO, P. R. Identificação de enterobactérias em sushi embalados. **UNISANTA Bioscience**, v. 10, n. 1, p. 7 – 11, 2021.

SILVA, A. J. H.; ANJOS, C. P.; NOGUEIRA, L. S.; RIBEIRO, A. C. R.; FRAGA, E. G. S. *Salmonella spp.* um agente patogênico veiculado em alimentos. **Encontro de Extensão, Docência e Iniciação Científica**, v. 5, n. 1, 2019.

ZAPPA, V. **Índice de resistência múltipla aos antimicrobianos, concentração inibitória mínima e beta-lactamases de espectro estendido em linhagens de *Proteus mirabilis* e *Proteus vulgaris* isoladas de diferentes afecções em animais domésticos** (Tese de doutorado). Universidade Estadual Paulista, Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária 2015.