



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**DÉBORA LUÍSE CANUTO DE SOUSA**

**PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS  
ISOLADAS DE OVOS DE GALINHAS CAPIRAS (*Gallus gallus  
domesticus*) NO SEMIÁRIDO DO NORDESTE DO BRASIL E  
SUA IMPLICAÇÃO EM SAÚDE ÚNICA**

**PATOS - PB**

**2020**

**DÉBORA LUÍSE CANUTO DE SOUSA**

**PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS  
ISOLADAS DE OVOS DE GALINHAS CAIPIRAS (*Gallus gallus  
domesticus*) NO SEMIÁRIDO DO NORDESTE DO BRASIL E  
SUA IMPLICAÇÃO EM SAÚDE ÚNICA**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciência Animal do Centro de Saúde  
e Tecnologia Rural da Universidade  
Federal de Campina Grande, como  
requisito parcial para obtenção do  
título de Mestra em Ciência Animal.

**Orientador: Professor Dr. Sérgio Santos de Azevedo.**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Carolina de Sousa Américo Batista Santos.**

**PATOS - PB**

**2020**



S725p Sousa, Débora Luíse Canuto de.

Perfil de resistência antimicrobiana de bactérias isoladas de ovos de galinhas caipiras (*Gallus gallus domesticus*) no Semiárido do Nordeste do Brasil e sua aplicação em saúde única. / Débora Luíse Canuto de Sousa. - 2020.

53f.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Santos de Azevedo; Co-orientadora: Profa. Dra. Carolina de Sousa Américo Batista Santos.

Dissertação de Mestrado; (Programa de Pós-graduação em Ciência Animal) - Universidade Federal de Campina Grande; Centro de Saúde e Tecnologia Rural.

1. Ovos de galinhas caipira - resistência antimicrobiana. 2. *Gallus gallus domesticus*. 3. Bactérias isoladas - ovos de galinha caipira. 4. Enterobactérias. 5. Resistência antimicrobiana. 6. Enterobactérias produtoras de betalactamase de espectro ampliado - ESBL. 7. Perfil de suscetibilidade in vitro - bactérias Gram-negativas. 8. Microbiologia dos alimentos - ovos. I. Azevedo, Sérgio Santos de. II. Santos, Carolina de Sousa Américo. III. Título.

CDU:613.286:579.67(043.3)

**Elaboração da Ficha Catalográfica:**

Johnny Rodrigues Barbosa  
Bibliotecário-Documentalista  
CRB-15/626



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL  
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**PROVA DE DEFESA DO TRABALHO DE DISSERTAÇÃO**

**TÍTULO:** “Perfil de resistência antimicrobiana de bactérias isoladas de ovos de galinhas caipiras (*Gallus gallus domesticus*) no semiárido do nordeste do Brasil e sua implicação em saúde única”

**AUTORA:** Débora Luise Canuto doe Sousa

**ORIENTADOR:** Dr. Sergio Santos Azevedo

**JULGAMENTO**

**CONCEITO:** APROVADO

Dr. Sergio Santos Azevedo  
UAMV/UFCG  
Presidente

*Meire Maria da Silva*  
Dra. Meire Maria da Silva  
CUJP/UNIPÊ  
1º Examinador

*Rosália Severo de Medeiros*  
Dra. Rosália Severo de Medeiros  
UACB/UFCG  
2º Examinador

Patos - PB, 28 de fevereiro de 2020

Prof. Dr. José Fabio Paulino de Moura  
Coordenador

## ***Epígrafe***

Minha energia é o desafio, minha motivação é o impossível, e é por isso que eu preciso ser, à força e a esmo, inabalável.

Augusto Branco

*Aquele que habita no abrigo do Altíssimo e descansa à sombra do Todo-poderoso pode dizer ao Senhor:  
"Tu és o meu refúgio e a minha fortaleza, o meu Deus, em quem confio". Ele o livrará do laço do caçador e do veneno mortal.  
Ele o cobrirá com as suas penas, e sob as suas asas você encontrará refúgio;  
a fidelidade dele será o seu escudo protetor.*

*Você não temerá o pavor da noite nem a flecha que voa de dia, nem a peste que se move sorrateira nas trevas, nem a praga que devasta ao meio-dia.*

*Mil poderão cair ao seu lado; dez mil, à sua direita, mas nada o atingirá. Você simplesmente olhará, e verá o castigo dos ímpios.  
Se você fizer do Altíssimo o seu abrigo, do Senhor o seu refúgio, nenhum mal o atingirá, desgraça alguma chegará à sua tenda.*

*Porque a seus anjos ele dará ordens a seu respeito, para que o protejam em todos os seus caminhos, com as mãos eles o segurarão, para que você não tropece em alguma pedra. Você pisará o leão e a cobra, pisoteará o leão forte e a serpente.*

*Porque ele me ama, eu o resgatarei, eu o protegerei, pois conhece o meu nome.*

*Ele clamará a mim, e eu lhe darei resposta, e na adversidade estarei com ele, vou livrá-lo e cobri-lo de honra. Vida longa eu lhe darei, e lhe mostrarei a minha salvação."*

Bíblia Sagrada  
Salmo 91

**Dedico**

*A minha família, especialmente aos meus pais por tudo que me proporcionaram, pelo apoio, amor, carinho e confiança que depositados em mim.*

**Ofereço**

*A Deus, pelo que sou, pelo dom da vida*

*Tudo que sou a Ti agradeço Senhor.*



## **Agradecimentos**

Sou grata a Deus pela minha vida e todas as conquistas alcançadas.

À toda a minha família, pais e irmã, que é a minha maior fonte de inspiração, especialmente aos meus pais que sempre me apoiaram e me incentivaram a vencer na vida.

Ao meu esposo, pelo afeto, carinho e confiança em longos anos de ausência.

Ao meu orientador Prof. Sérgio Azevedo pelos ensinamentos e por todo o apoio e confiança que depositou em mim.

A minha co-orientadora e amiga Profa. Carolina Américo, que me incentivou com bons conselhos, transmitindo ensinamentos que me propiciou crescimento profissional e pessoal.

A Dra. Meire, pela parceria, apoio e orientações nesse projeto.

Aos professores doutores Rosália Severo, Meire Maria e Antônio Albério, por aceitarem com estima o convite para participar da banca.

Ao Dr. Tiago Casella do Centro de Investigação de Microrganismos, FAMERP e Hospital de Base de São José do Rio Preto; e Dra Luana, que foram imprescindíveis na construção final desse projeto.

Aos meus amigos que estiverem presentes dividindo as alegrias e percalços durante esses dois anos que me ajudaram e fortaleceram desde de pequenos e importantes detalhes, dias difíceis, até os momentos finais. A eles sou muito grata: Fernanda Meire, Iara Nunes, Djavan, Domingos Neto, Lucas Richter e em especial Hannah da Costa, nossa amizade e cumplicidade são coisas de outras vidas... Agradeço também a Victor Morais por me ajudar nos ajustes finais.

Ao meu amigo Giovanni Medeiros por me incentivar a não desistir, persistir e pela troca de conhecimento em nossas alegres viagens até Patos-PB. Obrigada pelo carinho, pela ideia do tema do projeto, e juntamente com Pirajá Neto, pelas belas risadas e resenhas nas estradas da vida.

Aos meus colegas de laboratório os que passaram e os que permanecem: Daniele Pessoa, Ednaldo, Gisele Ramalho, Neide e todos os estagiários no decorrer desses dois anos, pelos bons momentos e pelo conhecimento que construímos juntos.

A todos os professores que transmitiram seus conhecimentos e aos que fazem parte do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal em destaque para o Prof. Dr. José Fábio por todo apoio.

A todos os funcionários da Pós graduação por todo serviço prestado com carinho e amor.

A todos os integrantes do Grupo de Estudos da nossa salinha de estudo da Pós.

À Universidade Federal de Campina Grande pela oportunidade de realizar meu mestrado. Tenho muito orgulho de fazer parte dessa instituição.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro a mim concedido.

Enfim, a todos aqueles que contribuíram diretamente ou indiretamente para o meu aprendizado e para que esse trabalho fosse realizado.

# PERFIL DE RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE OVOS DE GALINHAS CAIPIRAS NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO E SUA IMPLICAÇÃO EM SAÚDE ÚNICA

## RESUMO

A criação de galinhas caipiras é uma atividade amplamente difundida no Nordeste do Brasil, sobretudo em propriedades de agricultura familiar. No entanto, a ausência de um programa oficial no Brasil de monitoramento da qualidade sanitária de produtos dessa exploração, especificamente ovos, gera preocupação do ponto de vista de saúde pública, uma vez que agentes bacterianos podem ser transmitidos pelo consumo de ovos bem como tais agentes podem ser carreadores de genes de resistência antimicrobiana. Dessa maneira, os objetivos deste trabalho foram isolar e identificar microrganismos provenientes de ovos de galinha caipira comercializados em feiras livres no semiárido brasileiro, e caracterizar o perfil e identificar genes de resistência antimicrobiana dos isolados. Foram utilizados 128 ovos de galinhas caipira comercializados no semiárido brasileiro no período de agosto de 2018 a abril de 2019, dos quais 40 (31,3%) apresentaram crescimento bacteriano, sendo dezoito bactérias (45%) Gram-positivas e 22 (55%) Gram-negativas. Os microrganismos isolados foram *Staphylococcus* spp. (27,5%), *Bacillus* spp. (15%), *Pseudomonas aeruginosa* (7,5%), *Klebsiella* spp. (7,5%), *Salmonella* spp. (7,5%), *Proteus mirabilis* (7,5%), *Citrobacter* spp. (7,5%), *Escherichia coli* (7,5%), *Providencia* spp. (5%), *Corynebacterium* spp. (2,5%), *Enterobacter* spp. (2,5%) e *Alcaligenes* spp. (2,5%). Houve crescimento bacteriano em 10 (7,8%) albúmens e 38 (29,7%) gemas ( $P < 0,001$ ). Os antimicrobianos que apresentaram maiores índices de resistência foram amoxicilina + ac. clavulânico (77,3%), ampicilina (95,5%), cefalexina (68,2%), cefalotina (72,7%), ácido nalidíxico (72,7%), ertapinem (59,1%) e imipinem (63,3%). Dos 22 isolados de bactérias Gram-negativas 12 foram positivas no teste fenotípico para  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (ESBL), e genes CTX-M foram detectados em quatro isolados, com o grupo *bla*<sub>CTX-M2-like</sub> identificado em um isolado (*Klebsiella* spp.) e *bla*<sub>CTX-M8-like</sub> em três (*Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. e *Citrobacter* spp.). Conclui-se que a emergência e disseminação de bactérias produtoras de CTX-M em ovos de galinhas caipiras alerta para a possível difusão de genes de resistência na interface humana – animal – ambiental.

**Palavras-chave:** *Enterobacterales*, resistência antimicrobiana, ESBL, CTX-M

# ANTIMICROBIAL RESISTANCE PROFILE OF BACTERIA ISOLATED FROM FREE-RANGE CHICKEN EGGS FROM THE BRAZILIAN SEMIARID AND ITS IMPLICATION IN ONE HEALTH

## ABSTRACT

Free-range chicken raising is a widespread activity in the Northeast of Brazil, especially on family farms. However, the absence of an official program in Brazil to monitor the sanitary quality of free-range chicken products, specifically eggs, raises public health concerns since bacterial agents can be transmitted through the consumption of eggs as well as such agents may be carriers of antimicrobial resistance genes. Thus, the objectives of this work were to isolate and identify microorganisms from free-range chicken eggs from free markets in the Brazilian semi-arid region, and to characterize the profile and identify antimicrobial resistance genes of the isolates. A total of 128 eggs from free-range chickens sold in the Brazilian semi-arid region from August 2018 to April 2019 were used, of which 40 (31.3%) showed bacterial growth, with 18 bacteria (45%) being Gram-positive and 22 (55%) Gram-negative. The isolated microorganisms were *Staphylococcus* spp. (27.5%), *Bacillus* spp. (15%), *Pseudomonas aeruginosa* (7.5%), *Klebsiella* spp. (7.5%), *Salmonella* spp. (7.5%), *Proteus mirabilis* (7.5%), *Citrobacter* spp. (7.5%), *Escherichia coli* (7.5%), *Providencia* spp. (5%), *Corynebacterium* spp. (2.5%), *Enterobacter* spp. (2.5%) and *Alcaligenes* spp. (2.5%). There was bacterial growth in 10 (7.8%) albumen and 38 (29.7%) egg yolks ( $P < 0.001$ ). The antimicrobials that showed the highest resistance rates were amoxicillin + ac. clavulanic (77.3%), ampicillin (95.5%), cephalexin (68.2%), cephalothin (72.7%), nalidixic acid (72.7%), ertapinem (59.1%) and imipenem (63.3%). Of the 22 Gram-negative bacteria isolates 12 were positive in the phenotypic test for extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL), and CTX-M genes were detected in four isolates, with the *bla*<sub>CTX-M2-like</sub> group identified in one isolate (*Klebsiella* spp.) and *bla*<sub>CTX-M8-like</sub> in three (*Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. and *Citrobacter* spp.). We conclude that the emergence and spread of CTX-M-producing bacteria in free-range chicken eggs warns of the possible diffusion of resistance genes at the human - animal - environmental interface.

**Keywords:** Enterobacterales, antimicrobial resistance, ESBL, CTX-M

## Lista de Tabelas

### CAPÍTULO I

**Tabela 1-** Frequência de positividade em ovos de galinhas caipiras (*Gallus gallus domesticus*) comercializados em feiras livres do semiárido brasileiro, no período de agosto de 2018 a abril de 2019..... 28

**Tabela 2-** Ovos de galinha caipira (*Gallus gallus domesticus*) comercializados em feiras livres do semiárido brasileiro, positivos (n = 40) no isolamento bacteriano de acordo com o tipo de microrganismo, no período de agosto de 2018 a abril de 2019. ....29

**Tabela 3-** Isolados bacterianos encontrados em albúmen (n = 10) e gema (n = 38) de ovos de galinhas caipiras (*Gallus gallus domesticus*) comercializados em feiras livres do semiárido brasileiro, no período de agosto de 2018 a abril de 2019. ....28

**Tabela 4 –** Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados Gram negativos de ovos de galinhas caipiras (*Gallus gallus domesticus*) coletados no período de agosto de 2018 a abril de 2019. ....29

### CAPÍTULO II

**Tabela 1-** Frequência de bactérias isoladas de ovos de galinha caipira (*Gallus gallus domesticus*) comercializados em feiras livres do semiárido brasileiro (n = 22), no período de agosto de 2018 a abril de 2019. ....44

**Tabela 2-** Suscetibilidade aos antimicrobianos de 22 isolados Gram negativos de ovos de galinhas caipiras (*Gallus gallus domesticus*). ....45

**Tabela 3-** Detecção de genes blaCTX-M e subtipagem em grupos RFLP. ....45

## **Lista de Figuras**

**Figura 1**- Municípios utilizados para a colheita de ovos de galinha caipira (*Gallus gallus domesticus*) no período de agosto de 2018 a abril de 2019. ....24

## **Lista de abreviaturas, siglas e símbolos**

% – percentual

( $P < 0,05$ ) – significância inferior a 5% ( $P > 0,05$ ) – significância superior a 5%

BHI- Brain Heart Infusion

BrCAST- Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

°C- Grau Celsius

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CLSI – Clinical & Laboratory Standards Institute

Cm- Centímetros

CTX-M – Variante de enzima betalactamase

DTA's Doenças transmitidas por alimentos

ESBL- Enterobactérias produtoras de betalactamase de espectro ampliado

EUCAST- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

h- Horas

mL- Mililitro

mm- Milímetro

PCR- Proteína C Reativa

PPGZ – Programa de Pós-graduação em Zootecnia Prof. – Professor

Profa. – Professora

Prof.- Professor

TSI- Triple Sugar Iron Agar

UGCG- Universidade Federal de Campina Grande

VM- Vermelho de Metila

VP- Vermelho de Metila

## Sumário

RESUMO .....	VIII
ABSTRACT .....	IX
Lista de Tabelas .....	X
Lista de Figuras.....	XI
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos .....	XII
Introdução geral .....	14
REFERÊNCIAS .....	16
CAPÍTULO I.....	18
RESUMO .....	19
ABSTRACT: .....	20
INTRODUÇÃO.....	21
MATERIAL E MÉTODOS .....	22
Local de estudo e obtenção das amostras.....	22
Isolamento e identificação bacteriana .....	23
Perfil de suscetibilidade <i>in vitro</i> de bactérias Gram-negativas.....	24
ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	24
RESULTADOS.....	25
DISCUSSÃO .....	28
CONCLUSÃO .....	32
REFERÊNCIAS.....	33
CAPÍTULO II.....	38
MATERIAL E MÉTODOS .....	42
Local de estudo e obtenção das amostras.....	42
Isolamento e identificação bacteriana .....	42
Teste de susceptibilidade <i>in vitro</i> .....	43
Detecção de $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (ESBL).....	43
Detecção de genes blaCTX-M e subtipagem em grupos RFLP.....	44
RESULTADOS .....	44
DISCUSSÃO.....	46
CONCLUSÃO .....	48
REFERÊNCIAS .....	49
CONCLUSÃO GERAL.....	51



## Introdução geral

A criação de galinhas caipiras é uma atividade cujo mercado é muito promissor. Além disso, a sua comercialização pode ser efetuada de modo direto (produtor-consumidor), ou com a existência de, no máximo, um intermediário, tornando compensadores e bastante atrativos os preços dos produtos para o produtor. Essa atividade já se tornou uma tradição na agricultura familiar por ser uma produção que requer investimentos de baixo valor, como também de fácil manejo, podendo ser realizado por homens e/ou mulheres que desejam complementar a sua renda, melhorando assim a qualidade de vida da família (SAGRILLO et al., 2016). Seu subproduto, o ovo, é uma das principais fontes para alimentação humana, pois consiste em um alimento completo, rico em vitaminas, minerais, ácidos graxos e proteínas, que proporcionam vários aminoácidos essenciais de excelente valor biológico (MOTA et al., 2017). No entanto, a falta de capacitação técnica é a maior causa de insucesso nos projetos de avicultura alternativa. Medidas de vigilância e defesa sanitária são adotadas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e pela indústria para manter uma boa condição sanitária do produto. Apesar deste sistema de biossegurança aplicado às criações comerciais, populações de aves conhecidas como galinhas caipiras encontram-se fora deste controle sanitário (MARCHESI et al., 2013).

Como descrito por Almeida et al. (2017) um dos maiores fatores de preocupação em relação ao consumo de ovos é a saúde pública, pois esse alimento quando consumido *in natura*, armazenado de forma errônea, ingerido fora do prazo de validade, entre outros fatores, pode causar intoxicações gastrointestinais pela contaminação de agentes como *Salmonella* sp., por *Staphylococcus aureus*, ou coliformes.

A demanda elevada por alimentos avícolas promoveu a utilização de antimicrobianos com o intuito de prevenir e tratar doenças bacterianas, diminuir a mortalidade e atuar como promotor de crescimentos nos animais, resultando, ao longo dos anos, no consumo exacerbado desses medicamentos, e consequentemente selecionando bactérias resistentes (APTA; NIGERIA, 2012; TALEBIYAN et al., 2014).

Considerada um problema de saúde global e comprometendo a efetividade dos antibióticos, a resistência antimicrobiana inviabiliza o tratamento

de infecções comuns, e está intrinsecamente associada com a utilização de agentes antimicrobianos de forma indiscriminada. Essa resistência pode ocorrer por mutações genéticas, em que as bactérias podem adquirir DNA por transformação, transdução, conjugação e transposição. Além disso, os microrganismos são capazes de modificar o antibiótico e desencadear menor permeabilidade da membrana impedindo sua atuação (ALLEN et al., 2010; CHENG et al., 2016).

A disseminação da resistência bacteriana entre diferentes ecossistemas vem sendo estudada como um conceito amplo dentro do contexto de Saúde Única (*One Health*), que retrata a interação entre humanos, animais e meio ambiente, e que vem crescendo como uma estratégia para a melhor compreensão e resolução de problemas contemporâneos de saúde que surgem como consequência da convergência humana, animal e ambiental, como por exemplo o problema da resistência antimicrobiana na interface da medicina humana e veterinária. Neste contexto, apesar dos vários estudos conduzidos apontarem para evidência substancial de difusão de bactérias clinicamente significantes resistentes de animais para seres humanos, estudos de epidemiologia genômica tem confirmado que seres humanos também podem transmitir esses patógenos para animais em um processo zoonótico reverso, denominado zooantroponose (SELLERA e LINCOPAN, 2019). Um dos intuitos propostos pela estratégia Saúde Única é a conscientização sobre os riscos associados ao uso incorreto de antibióticos tanto na criação de animais de companhia quanto de produção, o que consequentemente reflete no homem e no meio ambiente (CONRAD et al., 2013). Segundo Silva e Lincopan (2012), as betalactamases de espectro estendido (ESBL) em *Enterobacterales* é um problema de saúde pública mundial, pois apresenta importância tanto na medicina veterinária quanto na medicina humana. Os mesmos autores afirmaram que mesmo estando disseminadas no território brasileiro, não há a notificação de ESBL em todas as unidades federativas. Some-se a isso o fato de que o país ainda não possui um programa nacional de vigilância da resistência microbiana.

No Nordeste brasileiro existem poucos estudos em relação a isolamentos microbiológicos em ovos caipiras e nenhum com análise de seus perfis de

resistência, sendo mais comuns trabalhos com ovos de produção de granjas. Dessa forma, considerando os fatores relacionados à importância da qualidade microbiológica do ovo caipira para o consumo humano e a necessidade de consumir esse produto íntegro livre de patógenos, bem como a problemática da resistência antimicrobiana, o objetivo deste trabalho foi identificar a presença de microrganismos em ovos de galinha caipira (*Gallus gallus domesticus*) assim como seu perfil de resistência, comercializados em feiras do semiárido brasileiro.

Essa dissertação é composta por dois capítulos: no capítulo I foi abordada a identificação de microrganismos em ovos de galinha caipira (*Gallus gallus domesticus*) comercializados em feiras livres na região do semiárido do nordeste do Brasil, demonstrando a variedade desses isolados diante de uma metodologia adaptada, a análise da sensibilidade de alguns antibióticos para a observação do perfil de resistência em bactérias Gram-negativas, tomando como base a casuística da resistência bacteriana que pode causar impacto à saúde pública. No capítulo II, o perfil de resistência com testes fenotípicos e genotípicos de bactérias Gram negativas isoladas, produtoras de ESBL e carreadoras dos genes blaCTX-M foram estudadas, discutindo o impacto causado pelo uso indiscriminado de antibióticos, o surgimento e a disseminação de cepas resistentes diante do contexto da interface One Health, humana-animal-ambiente.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, C. A., FRIEBEL, D., ROSSA, R. B. & GELINSKI, J. M. L. 2017. **Avaliação das Condições Higiênico-Sanitárias da Casca e Gema de Ovos In Natura**. Anuário pesquisa e extensão Unoesc Videira, 2017.

ALLEN, H.; DONATO, J.; WANG, CLOUD-HANSEN, K.; DAVIES, J.; HANDELSMAN, J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, p.251-259, 2010. Disponível em: <<https://handelsmanlab.discovery.wisc.edu/wp-content/uploads/2018/01/AllenCalloftheWild.pdf>>. Acesso em: 22 out. 2019.

APTA, D.F.; NIGERIA, I. The Emergence of antibiotics resistance and utilization of probiotics for poultry production. **Science Journal of Microbiology**, 2 ed., v.2012, p.8-13, 2012.

CHENG, G.; DAI, M.; AHMED, S.; HAO, H.; WANG, X.; YUAN, Z. Antimicrobial Drugs in Fighting against Antimicrobial Resistance. **Frontiers in Microbiology**, v.7, p.470.2016. Disponível em:

<<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00470/full>>. Acesso em: 22 de out. 2019.

CONRAD, P.A.; MEEK, L.A.; DUMIT, J. Operationalizing a One Health approach to global health challenges. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, 36:211-6, 2013.

MARCHESI, J. A.P.; ARALDI-FAVASSA, C. T.. Estudo da incidência de Salmonella enteritidis em populações de galinhas caipiras no município de Concórdia (Santa Catarina, Brasil) por meio de teste sorológico, **Ágora: revista de divulgação científica**, v. 18, p. 29–34, 2011.

MOTA, A.S.B.; LIMA, P.M.S.; SILVA, D.S.; ABREU, V.K.G.; FREITAS, E.R.; PEREIRA, A.L.F. Internal quality of eggs coated with cassava and yam starches. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.12, n.1, p.47-50, 2017.

TALEBIYAN, R.; KHERADMAND, M.; KHAMESIPOUR, F. et al. Multiple antimicrobial resistance of Escherichia coli isolated from chickens in Iran. **Veterinary Medicine International**, 2014.

SAGRILO, EDVALDO et al. **Validação do Sistema Alternativo de Criação de Galinha Caipira.** Disponível em:<<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/AgriculturaFamiliar/RegiaoMeioNorteBrasil/GalinhaCaipira/index.htm>>. Acesso em: 05 FEV. 2020.

SELLERA, F.P.; LINCOPAN, N. Zoonanthroponotic transmission of high-risk multidrug-resistant pathogens: A neglected public health issue. **Journal of Infection and Public Health**, v. 12, p. 294-295, 2019.

SILVA, K.C; LINCOPAN, N. Epidemiologia das beta-lactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações no agronegócio. **J. Bras. Patol. Med. Laboratorial**, 2: 91- 99, 2012.

## **CAPÍTULO I**

### **MICROORGANISMOS ISOLADOS EM OVOS DE GALINHAS CAIPIRAS (*Gallus gallus domesticus*) NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO E SUA IMPLICAÇÃO EM SAÚDE ÚNICA**

Artigo a ser submetido à *Semina: Ciências Agrárias*  
(JCR 0.370, Qualis B1)

# MICROORGANISMOS ISOLADOS EM OVOS DE GALINHAS CAIPIRAS (*Gallus gallus domesticus*) NO SEMIÁRIDO BRASILEIRO E SUA IMPLICAÇÃO EM SAÚDE ÚNICA

## RESUMO

No Brasil, a escala de produção de ovos aumenta a cada ano, impulsionando a necessidade de maior controle da qualidade bacteriológica de toda a cadeia produtiva. Além do aspecto nutricional, a produção de ovos, principalmente de galinhas caipiras, tem sido uma alternativa de geração de renda para produtores familiares. O objetivo do trabalho foi identificar a presença de microrganismos em galinhas caipiras (*Gallus gallus domesticus*) e seu perfil de resistência frente alguns antimicrobianos de interesse a Saúde Única, comercializadas em feiras livres da microrregião Seridó, no estado do Rio Grande do Norte semiárido brasileiro. Foram utilizadas amostras de 128 ovos. As colônias bacterianas foram submetidas ao exame bacterioscópico pelo método de coloração de Gram e identificadas por testes bioquímicos. O crescimento bacteriano foi observado em 40 ovos (31,3%), oito no albúmen e 38 na gema. Dezoito bactérias (45%) eram Gram-positivas e 22 (55%) Gram-negativas. Os microrganismos isolados foram *Staphylococcus* spp. (27,5%), *Bacillus* spp. (15%), *Pseudomonas aeruginosa* (7,5%), *Klebsiella* spp. (7,5%), *Salmonella* spp. (7,5%), *Proteus mirabilis* (7,5%), *Citrobacter* spp. (7,5%), *Escherichia coli* (7,5%), *Providencia* spp. (5%), *Corynebacterium* spp. (2,5%), *Enterobacter* spp. (2,5%) e *Alcaligenes* spp. (2,5%). Realizou-se teste de suscetibilidade *in vitro* de 22 *Enterobacterales* pela técnica de difusão em disco. Foram utilizados 18 antimicrobianos de cinco classes: aminoglicosídeos; betalactâmicos; quinolonas; carbapenêmicos e outros. Dezesete (77,3%) isolados apresentaram resistência múltipla a mais de uma classe de antimicrobianos. As maiores taxas de resistência foram amoxicilina +ac. clavulânico (77,3%), ampicilina (95,5%), cefalexina (68,2%), cefalotina (72,7%), ácido nalidíxico (72,7%), ertapinem (59,1%) e imipinem (63,3%). Conclui-se que existe uma grande variedade de enterobactérias com perfil multirresistente presente em ovos de galinha caipira, o que é importante do ponto de vista de Saúde Única.

**Palavras-chave:** *Enterobacterales*, ovos, semiárido brasileiro, saúde pública.

**MICROORGANISMS ISOLATED IN EGGS FROM CAIPIRAS CHICKENS  
(*Gallus gallus domesticus*) IN THE BRAZILIAN SEMI-ARID AND ITS  
IMPLICATION ON UNIQUE HEALTH**

**ABSTRACT:**

In Brazil, the scale of egg production increases every year, driving the need for greater control of bacteriological quality throughout the production chain. In addition to the nutritional aspect, egg production, mainly of free-range chickens, has been an alternative for generating income for family producers. The objective of the work was to identify the presence of microorganisms in free-range chickens (*Gallus gallus domesticus*) and their resistance profile against some antimicrobials of interest to Unique Health, marketed in free markets in the Seridó microregion, in the Brazilian semi-arid state of Rio Grande do Norte. Samples of 128 eggs were used. The bacterial colonies were subjected to bacterioscopic examination using the Gram stain method and identified by biochemical tests. Bacterial growth was observed in 40 eggs (31.3%), eight in albumen and 38 in yolk. Eighteen bacteria (45%) were Gram-positive and 22 (55%) Gram-negative. The isolated microorganisms were *Staphylococcus* spp. (27.5%), *Bacillus* spp. (15%), *Pseudomonas aeruginosa* (7.5%), *Klebsiella* spp. (7.5%), *Salmonella* spp. (7.5%), *Proteus mirabilis* (7.5%), *Citrobacter* spp. (7.5%), *Escherichia coli* (7.5%), *Providencia* spp. (5%), *Corynebacterium* spp. (2.5%), *Enterobacter* spp. (2.5%) and *Alcaligenes* spp. (2.5%). In vitro susceptibility testing of 22 Enterobacterales was performed using the disk diffusion technique. Eighteen antimicrobials from five classes were used: aminoglycosides; beta-lactams; quinolones; carbapenems and others. Seventeen (77.3%) isolates showed multiple resistance to more than one class of antimicrobials. The highest resistance rates were amoxicillin + ac. clavulanic (77.3%), ampicillin (95.5%), cephalexin (68.2%), cephalothin (72.7%), nalidixic acid (72.7%), ertapinem (59.1%) and imipinem (63.3%). It is concluded that there is a wide variety of enterobacteria with a multi-resistant profile present in free-range chicken eggs, which is important from the point of view of Unique Health.

**Keywords:** Enterobacterales, eggs, Brazilian semiarid, public health

## INTRODUÇÃO

Considerada um importante e crescente problema de saúde pública, os alimentos podem sofrer contaminações ao longo das etapas de elaboração, possibilitando assim o desenvolvimento de enfermidades de origem alimentar (FLORES; MELO 2015). Nesse contexto, assume destaque o ovo, alimento consumido em todo mundo devido ao seu alto valor nutricional (SOUZA et al., 2014). Entretanto, esse alimento tem sido apontado como veiculador de diversas bactérias, principalmente do gênero *Salmonella* spp., causando surtos de toxinfecções alimentares. Relatórios da Vigilância Sanitária no Brasil mostraram que de 2010 a 2015 foram notificados mais de 3.900 surtos por alimentos contaminados no Brasil, com total de 42 óbitos. No entanto, estima-se que existam muitos casos de subnotificação (PORTAL SAÚDE, 2015).

De acordo com os dados das pesquisas trimestrais da produção de ovos de galinha, divulgadas pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no ano de 2017, a produção foi de 799,33 milhões de dúzias no quarto trimestre de 2016, atingindo sua maior produção, considerando a série histórica iniciada em 1987. Em 2018, as granjas brasileiras registraram a produção de 928,42 milhões de dúzias de ovos no quarto trimestre. Já a produção de ovo do tipo caipira tem sido uma alternativa de geração de renda e dieta para produtores familiares de baixa renda, e no Brasil, a cada ano sua escala de produção aumenta, sendo absorvida em grande parte pelo mercado interno, impulsionando a necessidade de maior controle da qualidade bacteriológica de toda a cadeia produtiva (IBGE, 2019).

Dentre as vias de transmissão para contaminação de ovos, destaca-se o contato com as fezes das aves no ato da postura, bem como também a penetração de microrganismos através de rachaduras ou dos poros da casca após a lavagem, além da transmissão transovariana. Neste caso, o conteúdo contaminado será interno, localizado na gema, e os processos convencionais de desinfecção dos ovos não serão eficientes (SOUZA et al., 2012). O controle da presença de microrganismos patogênicos nos ovos é difícil devido a várias formas de ocorrência de contaminações, uma vez que alguns desses microrganismos fazem parte da microbiota das aves (MENEZES, 2012).



Bactérias patogênicas resistentes aos antimicrobianos oriundas de humanos e animais tem sido uma questão de preocupação para a saúde pública devido ao risco da exposição humana a bactérias no consumo de ovos (SILVA et al., 2016), destacando-se as da família *Enterobacterales*, que são agentes que habitam o trato intestinal de seres humanos e animais (TORTORA et al., 2017).

Isolamento de *Escherichia coli*, *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp. e *Providencia* spp. também são relatados, seja de ovo intacto ou rachado. Esses microrganismos patogênicos são capazes de causar deterioração de alimentos e doenças infecciosas nos consumidores quando introduzido na cadeia alimentar, assim como *Staphylococcus*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* e *Salmonella* spp., sendo o último responsável pela maior quantidade de casos no país (GARCIA et al., 2010).

Dessa maneira, considerando os fatores relacionados à importância da qualidade microbiológica do ovo para o consumo humano e a necessidade de consumir um produto íntegro livre de patógenos, o objetivo deste trabalho foi identificar a presença de microrganismos em ovos de galinha caipira (*Gallus gallus domesticus*) comercializados em feiras livres na região do semiárido do nordeste do Brasil e seu perfil de resistência frente alguns antimicrobianos de interesse a Saúde Única.

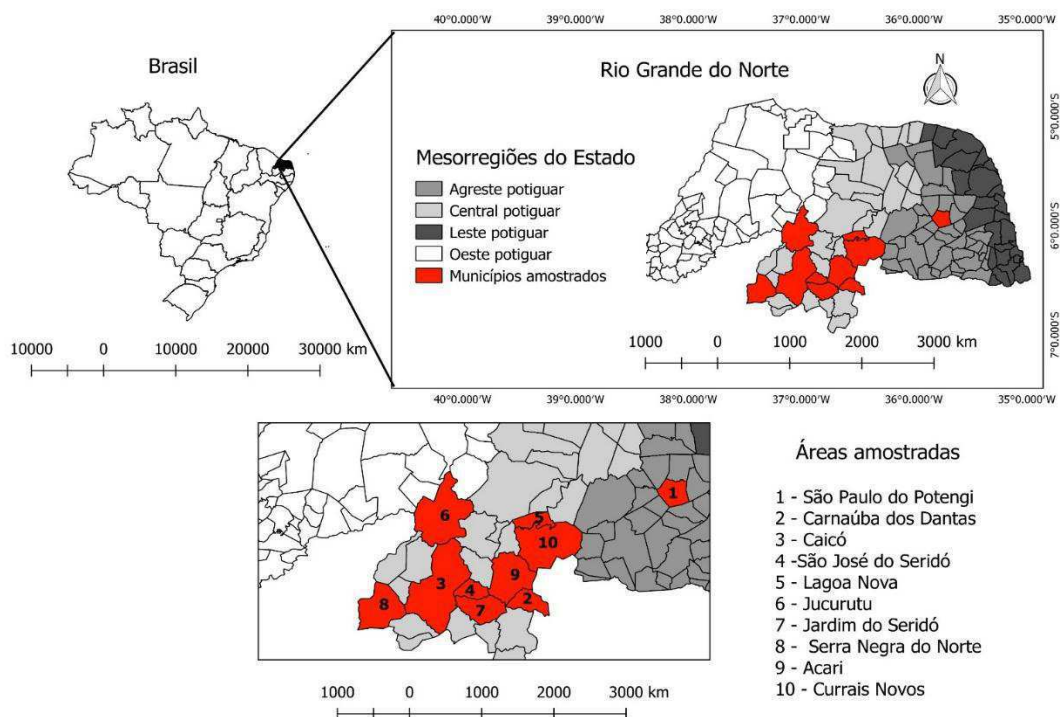
## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Local de estudo e obtenção das amostras**

O estudo foi realizado em pontos comerciais de feiras livres do estado do Rio Grande do Norte, semiárido brasileiro. Os municípios contemplados foram Acari, Caicó, Carnaúba dos Dantas, Currais Novos, Jardim do Seridó, Jucurutu, Lagoa Nova, São José do Seridó, São Paulo do Potengi e Serra Negra do Norte (Figura 1).

Os ovos foram transportados em temperatura ambiente até o Laboratório de Microbiologia do Hospital Veterinário Dr. Ivon Macedo Tabosa da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), campus Patos – PB, onde

foram processados. No total, foram obtidos 128 ovos no período de agosto de 2018 a abril de 2019.



**Figura 1-** Municípios utilizados para a colheita de ovos de galinha caipira (*Gallus gallus domesticus*) no período de agosto de 2018 a abril de 2019.

### Isolamento e identificação bacteriana

A parte externa do ovo (casca) foi higienizada com álcool 70% e logo após, por visualização em ovoscópio, uma pequena parte desta casca foi quebrada com uma pinça estéril na porção inferior onde localiza-se a câmara de ar, formando um orifício de aproximadamente 1cm, sem danificar a película entre a casca e albúmen para separação do albúmen e gema utilizando uma seringa para aspiração. Em seguida, o material aspirado (albúmen e gema separados) foi enriquecido em caldo Brain Heart Infusion (BHI) na razão de 2 mL de conteúdo dos ovos em 3 mL de BHI por 24 h na temperatura de 37°C e posteriormente semeado em placas de Petri contendo os meios ágar sangue ovino desfibrinado a 5%, ágar MacConkey, e ágar ágar com espessura de 9 mm. Após o cultivo, as placas foram incubadas à temperatura de 37°C em aerobiose por 24-48 horas para verificação do crescimento bacteriano. As colônias bacterianas foram

submetidas ao exame bacterioscópico pelo método de coloração de Gram e identificadas por provas bioquímicas: TSI, motilidade, malonato, produção de indol, produção de urease, produção de gelatinase, produção de fenilalanina desaminase, utilização de citrato, reação de vermelho de metila (VM) e Voges-Proskauer (VP), fermentação da lactose, hidrólise de esculina, redução de nitrato, catalase, oxidase e coagulase (MURRAY et al.,1999).

### **Perfil de suscetibilidade *in vitro* de bactérias Gram-negativas**

Para a avaliação da susceptibilidade *in vitro* foi utilizado o método de disco difusão em Ágar Müller-Hinton (MH), conforme recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2019) e BrCAST (2019). A concentração bacteriana para realização do antibiograma foi correspondente à turbidez da escala 0,5 de McFarland e a espessura da camada de ágar Müller-Hinton (MH) na placa de 4mm. Os discos de antibióticos foram mantidos em temperatura ambiente por no mínimo 20 minutos e no máximo 30 minutos antes do seu uso, sendo a colocação dos mesmos nas placas realizada em até 15 minutos. Após a semeadura, as placas ficaram mantidas em temperatura de incubação de 35-37 °C. A interpretação dos resultados foi realizada através da leitura de halos de inibição (CLSI, 2019; BrCast, 2019). Os antimicrobianos utilizados foram: aminoglicosídeos - amicacina (30 µg), gentamicina (10 µg) e neomicina (30 µg); beta-lactâmicos - cefalexina (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefalotina (30 µg) e amoxicilina + ácido clavulânico (30 µg); quinolonas - ácido pipemídico (20µg), ácido nalidíxico (30µg), enrofloxacina (5µg) e norfloxacina (10µg); carbapenêmicos - ertapinem (10µg), imipinema (10µg) e meropenem (10µg); outros - cloranfenicol (30µg) e tetraciclina (30µg).

### **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para comparação das frequências dos agentes bacterianos isolados nos ovos foi utilizado o teste binomial, e para comparação da frequência de positividade entre albúmen e gema foi utilizado o teste de qui-quadrado. As

análises foram realizadas no ambiente R (R Core Team, 2019) com nível de significância de 5%.

## RESULTADOS

Dos 128 ovos analisadas foi observado crescimento bacteriano em 40 (31,3%). Na Tabela 1 são apresentadas as frequências de positividade de acordo com os municípios investigados. Somente em três municípios não foram obtidos ovos positivos, e as frequências de positividade variaram de 14,4% em Caicó a 72% em São José do Seridó.

**Tabela 1**- Frequência de positividade em ovos de galinhas caipiras (*Gallus gallus domesticus*) comercializados em feiras livres do semiárido brasileiro, no período de agosto de 2018 a abril de 2019, de acordo com o município.

Município	No. total de ovos	Ovos positivos	
		Total	Frequência (%)
Acarí	5	2	40
Caicó	54	8	14,8
Carnaúba dos Dantas	3	2	66,7
Currais Novos	5	0	0
Jardim do Seridó	7	0	0
Jucurutu	10	3	30
Lagoa Nova	5	0	0
São José do Seridó	25	18	72
São Paulo do Potengi	10	5	50
Serra Negra do Norte	4	2	50
Total	128	40	31,3

Na Tabela 2 são apresentadas as frequências de microrganismos isolados nos ovos positivos (n = 40). Dezoito bactérias (45%) foram do grupo das Gram-positivas e 22 (55%) Gram-negativas. Os microrganismos isolados foram *Staphylococcus* spp. (27,5%), *Bacillus* spp. (15%), *Pseudomonas aeruginosa* (7,5%), *Klebsiella* spp. (7,5%), *Salmonella* spp. (7,5%), *Proteus mirabilis* (7,5%), *Citrobacter* spp. (7,5%), *Escherichia coli* (7,5%), *Providencia* spp. (5%), *Corynebacterium* spp. (2,5%), *Enterobacter* spp. (2,5%) e *Alcaligenes* spp. (2,5%). Foi observada diferença significativa nas proporções de agentes isolados ( $P = 0,004$ ).

**Tabela 2-** Ovos de galinha caipira (*Gallus gallus domesticus*) comercializados em feiras livres do semiárido brasileiro, positivos (n = 40) no isolamento bacteriano de acordo com o tipo de microrganismo, no período de agosto de 2018 a abril de 2019.

Agentes	Número de amostras positivas	Frequência (%)
<i>Staphylococcus</i> spp.	11	27,5
<i>Bacillus</i> spp.	6	15
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	7,5
<i>Klebsiella</i> spp.	3	7,5
<i>Salmonella</i> spp.	3	7,5
<i>Proteus mirabilis</i>	3	7,5
<i>Citrobacter</i> spp.	3	7,5
<i>Escherichia coli</i>	3	7,5
<i>Providencia</i> spp.	2	5
<i>Corynebacterium</i> spp.	1	2,5
<i>Enterobacter</i> spp.	1	2,5
<i>Alcaligenes</i> spp.	1	2,5
Total	40	100

As amostras também foram analisadas em separado, sendo 128 albúmens (claras) e 128 gemas. Houve crescimento bacteriano em 10 (7,8%) albúmens e 38 (29,7%) gemas ( $P < 0,001$ ). As 48 frequências de agentes isolados em albúmens (n = 10) e gemas (n = 38) positivos são apresentados na Tabela 3. As bactérias mais frequentemente isoladas em albúmen foram *Citrobacter* spp. (30%) e *Staphylococcus* spp. (20%), e em gemas *Staphylococcus* spp. (23,7) e *Bacillus* spp. (15,8%).

**Tabela 3-** Isolados bacterianos encontrados em albúmen (n = 10) e gema (n = 38) de ovos de galinhas caipiras (*Gallus gallus domesticus*) comercializados em feiras livres do semiárido brasileiro, no período de agosto de 2018 a abril de 2019.

Agente	Albúmen		Gema	
	No. amostras positivas	de Frequência (%)	No. amostras positivas	de Frequência (%)
<i>Staphylococcus</i> spp.	2	20	9	23,7
<i>Bacillus</i> spp.	0	0	6	15,8
<i>Pseudomonas</i>	0	0	3	7,9
<i>Klebsiella</i> spp.	1	10	3	7,9
<i>Salmonella</i> spp.	1	10	3	7,9
<i>Proteus mirabilis</i>	0	0	3	7,9
<i>Citrobacter</i> spp.	3	30	3	7,9
<i>Escherichia coli</i>	1	10	3	7,9
<i>Providencia</i> spp.	0	0	2	5,3
<i>Corynebacterium</i> spp.	0	0	1	2,6
<i>Enterobacter</i> spp.	1	10	1	2,6
<i>Alcaligenes</i> spp.	1	10	1	2,6
Total de amostras	10	100	38	100

Os padrões de resistência de 22 isolados de bactérias Gram-negativas em relação a 18 antimicrobianos são apresentados na Tabela 4. Os antimicrobianos que apresentaram maiores índices de resistência foram amoxicilina + ac. clavulânico (77,3%), ampicilina (95,5%), cefalexina (68,2%), cefalotina (72,7%), ácido nalidíxico (72,7%), ertapinem (59,1%) e imipinem (63,3%).

**Tabela 4** – Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados Gram negativos de ovos de galinhas caipiras (*Gallus gallus domesticus*) coletados no período de agosto de 2018 a abril de 2019.

<b>ANTIMICROBIANOS</b>	<b>SENSÍVEL INTERMEDIÁRIO RESISTENTE</b>		
<b>AMINOGLICOSÍDEOS</b>			
Amicacina (30 µg)	77,30%	4,50%	18,20%
Gentamicina (10 µg)	63,60%	4,50%	31,90%
Neomicina (30 µg)	45,50%	18,20%	36,40%
<b>B-LACTÂMICOS</b>			
Amoxicilina +Ác. Clavulânico (10 µg)	18,20%	4,50%	77,30%
Ampicilina (10 µg)	4,50%	0%	95,50%
Cefalexina (30 µg)	22,70%	9,10%	68,20%
Cefotaxima (30 µg)	54,50%	9,10%	36,40%
Ceftazidima (30 µg)	95,50%	0%	4,50%
Cefalotina (30 µg)	22,70%	4,50%	72,70%
<b>QUINOLONAS</b>			
Ácido Pipemídico (20 µg)	31,8%	18,20%	45,50%
Ácido Nalidíxico (30 µg)	22,70%	4,50%	72,70%
Enrofloxacina (5 µg)	68,20%	4,50%	27,30%
Norfloxacina (10 µg)	59,10%	4,50%	36,40%
<b>CARBAPENÊMICOS</b>			
Ertapinem (10 µg)	41%	0%	59,1%
Imipinem (10 µg)	31,90%	4,50%	63,30%
Meropinem (10 µg)	40,90%	13,60%	45,50%
<b>OUTROS</b>			
Clorafenicol (30 µg)	68,20%	4,50%	27,30%
Tetraciclina (30 µg)	54,50%	9,10%	36,40%

## **DISCUSSÃO**

A frequência de isolamentos obtidos nesse estudo a partir de 128 ovos de galinhas caipiras (*Gallus gallus domesticus*) comercializados em feiras livres do Rio Grande do Norte, semiárido brasileiro, foi elevada. Ocorreu crescimento bacteriano em 40 unidades (31,3%), o que reflete elevada contaminação. Essas contaminações podem ocorrer através da casca, sendo que os fatores como umidade do ar, tempo e temperatura, favorecem a migração de bactérias da casca para o interior do ovo (BARANCELLI et al., 2012). Sabe-se que a maioria das toxinfecções alimentares ocorrem por condições impróprias no

processamento dos alimentos, sendo essencial garantir um manejo correto, promovendo a qualidade sanitária. Portanto, alguns cuidados relacionados ao manejo são necessários para preservar ao máximo sua qualidade original, desde a produção primária até a comercialização, garantindo a segurança do alimento até os consumidores (SANTOS, 2016).

Outro ponto que merece ser destacado diz respeito a forma de comercialização desse produto. Ovos de galinhas caipiras geralmente são comercializados em feiras livres, mantidos em temperatura ambiente desde a produção até a distribuição final, principalmente no semiárido do Nordeste do Brasil. A temperatura, o tempo de estocagem e as características particulares da ave (linhagem, idade, manejo nutricional e estado sanitário) também são fatores que exercem influência direta na qualidade do ovo ofertado ao consumidor (PIRES et al., 2015).

Ampla variedade de bactérias isoladas foi verificada nesse estudo, destacando-se os gêneros *Staphylococcus* spp. (27,5%) e *Bacillus* spp. (15%). Essa alta frequência pode advir de manuseio, armazenamento e transporte inadequados, causando a deteriorização desse alimento. O *Staphylococcus aureus*, por exemplo, pode se multiplicar nos alimentos e produzir toxinas acarretando o quadro de intoxicação estafilocócica (MURRAY et al., 2014). Pode ser responsável por Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) e é considerado o terceiro agente etiológico mais prevalente no desenvolvimento dessas doenças com cerca de 5,7% dos casos (BRASIL, 2016).

Foram obtidos 22 (55%) isolados de bactérias Gram-negativas. Dos nove gêneros bacterianos encontrados, algumas enterobactérias responsáveis pela deterioração de ovos e causadoras de doenças zoonóticas como a *Salmonella* spp., se destacaram. A presença de *Salmonella* spp. tem sido incriminada como a principal responsável por agravos a saúde pública. Não se sabe ao certo se essa elevada contaminação é proveniente da própria ave, do ambiente ou da manipulação dos ovos, mas se sabe que o ovo pode se contaminar após a postura, ao entrar em contato com as fezes pela penetração do microrganismo e durante a formação do folículo da gema e/ou formação do albúmen no oviduto, antes da formação da casca, propiciando a produção de ovos já contaminados (JONES et al., 2004). Entretanto, pesquisas microbiológicas revelam que a



contaminação ocorre, para a maioria das bactérias, principalmente após a postura. Essa disseminação horizontal é caracterizada pela contaminação bacteriana na passagem pela cloaca ou no contato com o ambiente e na sua manipulação, sendo que existe uma correlação direta entre a contaminação do ambiente e a contaminação dos ovos (EMBRAPA, 2004).

A presença da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* encontrada no estudo é um fator preocupante para a integridade dos ovos, pois este agente é um dos principais microrganismos que possuem grande capacidade de atravessar a casca do ovo e suas membranas. Essa bactéria é proteolítica e altera as características sensoriais e físico-químicas do ovo pela produção de substâncias, como ácido e gás sulfídrico, amoníaco, aminas, indol e ureia, e pela oxidação de ácidos graxos (MENDES et al., 2012).

Existe uma preocupação na fiscalização e controle da qualidade de alimentos, no entanto, o enfoque maior das pesquisas em ovos é relacionado a presença de *Salmonella* spp., e conforme a Instrução Normativa Nº 62 de 2003 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) do Brasil, a metodologia preconizada para avaliação da qualidade higiênico-sanitária e fiscalização assim como RDC 01/2001 que trata sobre os padrões microbiológicos, relacionada a esse agente, ocorre em ovos provenientes de granja, de um sistema de galinhas poedeiras, diferentemente do sistema considerado caipira, em que não há esse controle. No entanto, neste trabalho houve a preocupação em detectar patógenos, não somente a *Salmonella* spp., mas outros que podem comprometer a integridade desse alimento e, conseqüentemente, causar danos à saúde pública. Dessa forma, foi feita uma adaptação da metodologia preconizada pelo MAPA, demonstrando sua eficácia em isolar bactérias Gram-positivas e Gram-negativas sem a necessidade de estabelecer vários meios e métodos de isolamento para cada patógeno (BRASIL, 2003; AVINSA, 2001)

Com relação à comparação das frequências de isolamentos em albúmen e gema, observou-se maior proporção de bactérias isoladas da gema (29,7%) em comparação com albúmen (7,8%). Uma vez ocorrendo a contaminação por bactérias no conteúdo interno de ovos, as mesmas podem causar danos ao consumidor (STRINGHINI et al., 2009), como as Doenças Transmitidas pelos

Alimentos (DTA's), responsáveis por intoxicações. Essas doenças causadas por esses patógenos, podem levar o paciente ao choque séptico e a morte, além de afetar a economia de forma geral (NEWELL *et al.*, 2010). Para diminuir os danos, a refrigeração do produto seria uma alternativa, no entanto, aumentaria o custo de produção, o que faz com que a maioria dos ovos que são vendidos no mercado brasileiro estejam à temperatura ambiente (MOTA *et al.*, 2017). Outras medidas também são cabíveis, como a forma de transportes, manuseio e criação das aves.

Entre os isolados de bactérias Gram-negativas, no teste de susceptibilidade *in vitro* foi verificada resistência para os 18 antimicrobianos testados, sendo que houve alta resistência em amoxicilina +ac. clavulânico (77,3%), ampicilina (95,5%), cefalexina (68,2%), cefalotina (72,7%), ácido nalidíxico (72,7%), ertapinem (59,1%) e imipinem (63,3%), o que pode estar associado ao uso frequente ou mesmo subdosagens desses antimicrobianos na terapia de enfermidades, ou no manejo de criação e alimentação. O uso de antimicrobianos na avicultura é uma prática comum no semiárido, visando aumento da produtividade animal, ou controle de patógenos. Porém, esse uso muitas vezes é feito de forma empírica e indiscriminada, proporcionando o surgimento cada vez maior de cepas bacterianas resistentes a estas drogas, causando impactos econômicos, e de saúde. Dentro desse contexto, pesquisas demonstram um aumento na resistência de bactérias Gram-negativas que são isoladas de animais de produção, principalmente as da família *Enterobacterales*. O aumento da resistência entre esses membros tem culminado no aparecimento cada vez mais frequente de espécies multirresistentes, exigindo esforço multidisciplinar para prevenção e controle, além de uma detecção laboratorial eficiente (GISKE *et al.*, 2011).

Os medicamentos veterinários frequentemente utilizados são os antimicrobianos betalactâmicos, aminoglicosídeos e tetraciclina (SPISSO *et al.*, 2007), sendo as tetraciclina são utilizadas como aditivo alimentar para aves e suínos (TORTORA *et al.*, 2017). As quinolonas são extensivamente utilizadas no tratamento de lotes de aves infectadas pela *Salmonella enteritidis* (CALDEIRA, 2012), no entanto, no presente estudo, além de encontrar resistências a classe dos betalactâmicos e quinolonas, classes de antibióticos como carbapenêmicos

que não deveriam ser encontradas em ovos sendo incomum na rotina da clínica médica veterinária e produção animal, foram evidenciadas. Esses antimicrobianos são de maior espectro de ação, utilizados na prática da clínica médica, indicados nas infecções hospitalares graves ou em último recurso quando outros antimicrobianos falham (JONES et al., 2005).

A presença de bactérias resistentes em alimentos é fator preocupante e de impacto mundial diante do potencial de transferência de agentes patogênicos resistentes aos antimicrobianos para os seres humanos, animais e ambiente (PAVLICKOVA et al., 2017). Apesar do fenômeno de resistência ser inegável, não existe, até o presente momento, um modelo de análise de risco proposto para o estudo da resistência bacteriana em nível de campo, isto é, que avalie a real contribuição do uso de antimicrobianos em animais de produção e produtos de origem animal como os ovos de galinha caipira para a magnitude do problema. Portanto, estudos como esse norteiam medidas de controle higiênico-sanitárias, de prevenção e controle de disseminação da resistência bacteriana, como a implementação de precauções do uso correto de antibióticos.

## **CONCLUSÃO**

Foi detectado a presença elevada de bactérias em ovos de galinha caipira (*Gallus gallus domesticus*), comercializados na região do semiárido do nordeste do Brasil, tanto Gram positivas, como Gram negativas, demonstrando a eficácia da metodologia adaptada e utilizada no estudo. Os resultados obtidos nesta pesquisa podem servir como alerta sanitário, pois foi constatado a contaminação do conteúdo interno, o que deixa o produto impróprio para alimentação, podendo trazer sérios riscos gerando grande impactos à saúde pública. Vale ainda ressaltar que foi demonstrada a presença de resistência bacteriana em relação a diversas classes de antibióticos, enfatizando a importância da utilização correta desses antimicrobianos na avicultura, no intuito de evitar disseminação de patógenos carreadores de resistência, minimizando impactos econômicos, de saúde e ambientais.

## REFERÊNCIAS

ADESIYUN, A.; OFFIAH, N.; SEEPERSADSINGH, N.; RODRIGO, S.; LASHLEY, V.; MUSAI, L. Frequency and antimicrobial resistance of enteric bacteria with spoilage potential isolated from table eggs. **Food Research International**. v. 39, p. 212–219, 2006.

ALCÂNTARA, J.B. Pesquisa de Salmonella sp. em aves criadas em sistema industrial e alternativo. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Animal, Goiânia, 2015

ALLEN, H.; DONATO, J.; WANG, CLOUD-HANSEN, K.; DAVIES, J.; HANDELSMAN, J. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nature Reviews Microbiology**, v.8, p.251-259, 2010. Disponível em: <<https://handelsmanlab.discovery.wisc.edu/wp-content/uploads/2018/01/AllenCalloftheWild.pdf>>. Acesso em: 22 out. 2019.

BARANCELLI, G.V.; MARTIN, J.G.; PORTO, E. Salmonella em ovos: relação entre produção e consumo seguro. **Segurança alimentar e nutricional**, Campinas, n. 19, v. 2, p. 73-82, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02/01/2001. **Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 jan. 2001, Seção 1, p. 45-53.

BRASIL 2003 .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. **Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificações**. Surto Doenças Transmitidas por Alimentos – DTA. 2016. Disponível em:< <http://portalsinan.saude.gov.br/surto-doencas-> (83) 3322.3222 contato@conbracis.com.br [www.conbracis.com.br](http://www.conbracis.com.br) transmitidas-por-alimentos-dta>. Acesso em: 28 ago. 2019.

BrCAST - Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. **Método de Disco-Difusão para Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos**. 2019. Disponível em: <<file:///C:/Users/DESKTOP/Downloads/Manual-Disco-Difusao-BrCAST-21092018.pdf>>. Acesso em 22 de outubro de 2019.

CALDEIRA, L. G. P., Cançado, S. d. V., Teixeira, L. V., Martins, N. R. d. S., Oliveira, A. M. G. d., & Rezende, C. P. **Pesquisa de resíduos de antimicrobianos em ovos e validação de método multirresíduos qualitativo e confirmatório por cromatografia líquida acoplada a**

**espectrometria de massas sequencial.** Universidade Federal de Minas Gerais. 2012

CARVALHO, D.P. **Qualidade externa de ovos comerciais.** 2013. 40f. Monografia (Graduação em Zootecnia) - Escola de Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2013.

CARVALHO, J.X.; SUÁREZ, R.O.; MENDES, F.Q.; FERNANDES, R.V.B.; CUNHA, M.C.; CARVALHO, A.M.X. Extensão da vida de prateleira de ovos pela cobertura com própolis. Semina: **Ciências Agrárias, Londrina**, v.34, n.5, p.2287-2296, 2013.

CHENG, G.; DAI, M.; AHMED, S.; HAO, H.; WANG, X.; YUAN, Z. Antimicrobial Drugs in Fighting against Antimicrobial Resistance. **Frontiers in Microbiology**, v.7, p.470.2016. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00470/full> >. Acesso em: 22 de out. 2019.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 29th Edition. document M100. Pennsylvania, USA, 2019.

DUARTE, SABRIN A CASTILHO; RAUECKER, URSULA NUNES; REZENDE, CÍNTIA SILVA MINAFRA E. **Mecanismos de invasão do ovo por Salmonella sp.** **Avicultura Industrial**, [S.L], n. 2, p. 16-19, fev./mar. 2017.

FERNANDES, D.P.B.; MORI, C.; NAZARENO, A.C.; PIZZOLANTE, C.C.; MORAES, J.E. Qualidade interna de diferentes tipos de ovos comercializados durante o inverno e o verão. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.67, n.4, 2015.

FLÔRES, M.L.; NASCIMENTO, V.P.D.; KADER, I.I.T.A.; CARDOSO, M.; SANTOS, L.D.; LOPES, R.F.F.; BARBOSA, T. M. C. Análise da contaminação por Salmonella em ovos do tipo colonial através da reação em cadeia da polimerase. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.33, n.3, p.553-557, 2003.

GANTOIS, I. et al. Mechanisms of egg contamination by Salmonella Enteritidis: Review article. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, n. 4, p. 718–738, 2009.

GARCIA, E. R. M. et. al. Qualidade de ovos de poedeiras semipesadas armazenados em diferentes temperaturas e períodos de estocagem. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal**, v.11, n.2, p. 505-518. 2010.

GISKE CG, GEZELIUS L, SAMUELSEN Ø, WARNER M, SUNDSFJORD A, WOODFORD N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo-βlactamases and KPC in Klebsiella pneumoniae with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. **Clin Microbiol Infect.** 2011;17(4):552-6.

GOMES FILHO, Valdez J. R. et al. Pesquisa de Salmonella spp. em galinhas

criadas em fundo de quintal (*Gallus gallus domesticus*) e ovos comercializados nas feiras livres na cidade de Fortaleza, Ceará. Semina: **Ciências Agrárias, Londrina**, v. 35, n. 4, p. 1855-1864, jul./ago., 2014. Disponível em: Acesso em: 22 out. 2019.

IBGE .INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA-IBGE. **Produção de ovos bate record no Brasil. 2019**. Disponível em:< <http://www.http://agenciabrasil.ebc.com.br/economia/noticia/2019-02/producao-de-ovos-bate-recorde-no-pais-diz-ibge>>. Acesso em: 20 dez. 2019.

JONES, D.R.; MUSGROVE, M.T.; NORTHCUTT, J.K. Variations in external and internal microbial populations in shell eggs during extended storage. **Journal Food Prot.** v.67, n.12, p.2657-2660, 2004.

JONES, R.N. et al. Emerging epidemic of metallo- $\beta$ -lactamase-mediated resistance. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.51, p.77-84, 2005.

LOURENÇO MCS, REIS EFM, VALLS R. **Salmonella entérica** subsp *houtenae* sorogrupo O:16 em um paciente HIV positivo: relato de caso. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 2004; 46(3):169-170.

EMBRAPA. **Manual de Segurança e Qualidade para Avicultura de Postura**. Brasília: EMBRAPA/SEDE, 2004. 97 p.  
<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/18216/1/MANUALSEGURANCAQUALIDADEaviculturadepostura.Pdf>>Acesso em: 22 de jan, 2020.

MEDINA, A.; HORCAJO, P.; JURADO, S. et al. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli* and atypical enteropathogenic *E. coli* strains from ruminants. **J. Vet. Diagn. Invest.** V.23, p. 91-95, 2011.

MENDES FR, ANDRADE MA, CAFÉ MB, SANTOS JS, LACERDA MJR, STRINGHINI JH, STRINGHINI ML, LEANDRO NSM. Physical and chemical quality of sanitized commercial eggs experimentally contaminated with *Pseudomonas aeruginosa* and refrigerated during storage. **R. Bras. Zootec.** 2012.

MENEZES, P.C.; LIMA, E.R.; MEDEIROS, J.P. et al. Egg quality of laying hens in different conditions of storage, ages and housing densities. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, n.9, p.2064-2069, 2012.

MOTA, A.S.B.; LIMA, P.M.S.; SILVA, D.S.; ABREU, V.K.G.; FREITAS, E.R.; PEREIRA, A.L.F. Internal quality of eggs coated with cassava and yam Artigo 486 – Manejo, processamento e tecnologia de ovos para consumo. **Nutritime Revista Eletrônica, on-line**, Viçosa, v.16, n.2, p.8400-8418, mar/abr, 2019. ISSN: 1983-9006 8415 starches. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.12, n.1, p.47-50, 2017

MURRAY P.R., BARON E.J. & PFALLER, M.A. **Manual of Clinical Microbiology**. American Society for Microbiology. 7ed. Washington. D.C. 325-337p. 1999.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. Microbiologia Médica. 7ª ed., Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2014.

NASCIMENTO, E.R.; PEREIRA, V.L.A. Micoplasmoses. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J. D.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. F. (Eds.). **Doenças das Aves**. 2. Ed. Campinas: FACTA, 2009, p. 485-500.

NEWELL, D. G. et al. Food-borne diseases- The challenges of 20 years ago still persist while new ones. **International Journal of Food Microbiology**, v.139, n. 2, p. S3-S15. 2010.

PAVLICKOVA, S., KLANCNIK, A., DOLEZALOVA, M., MOZINA, S.S., HOLKO, I., 2017. Antibiotic resistance, virulence factors and biofilm formation ability in *Escherichia coli* strains isolated from chicken meat and wildlife in the Czech Republic. *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes* 52, 570–576.

PERDONCINI, Gustavo et al. Salmonella spp. em ovos produzidos em sistema agroecológico. **Revista Agrocientífica**, v. 1, n. 1, jan./jun. 2014, p. 33-42

PIRES, F. M.; PIRES, S. F.; ANDRADE, C. L.; CARVALHO, D. P.; BARBOSA, A. F. C.; MARQUES, M. R. Fatores que afetam a qualidade dos ovos de poedeiras comerciais: armazenamento, idade, poedeira. **Nutritime Revista Eletrônica, on-line, Viçosa**, v. 12, n. 6, p. 4379-4385, 2015.

PORTAL SAÚDE – Vigilância Sanitária. **Doenças Transmitidas por Alimentos**. 2015. Disponível em: . Acesso em: 20 jan. 2020.

R Core Team (2019). R: **A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RAMIREZ, ROMÁN Y. R.; PINCÓN, DIANA P. A.; VARGAS, JOHANA C. M. **Salmonella Enteritidis en huevos de gallina comercializados en Tunja**. **Salud Soc. Uptc.**, v. 1, n. 2, 2014. Disponível em: Acesso em: 22 de out 2019.

RISHI, P. Evaluation of nisin-beta-lactam antibiotics against clinical strains of *Salmonella enterica* serovar Typhi. **The Journal of Antibiotics** (Tokyo), v. 67, n. 12, p. 807-11, 2014.

SANTOS, J.S.; MACIEL, L.G.; SEIXA, V.N.C.; ARAÚJO, J.A. Parâmetros avaliativos da qualidade física de ovos de codornas (*Coturnix coturnix* japônica) em função das características de armazenamento. **Revista Desafios**, v. 03, n. 01, 2016.

Secretaria de Defesa Agropecuária (DIPOA). Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003. Oficializa 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, 26 ago. 2003. Seção 1.

SOUZA, D. O. et. al. Qualidade interna e externa de ovos de granja marrom e caipira de acordo com a condição e o tempo de armazenamento. In: CONGRESSO DE PESQUISA E PÓSGRADUAÇÃO DO CAMPUS RIO VERDE DO IF GOIANO, 1., 2012, Goiânia – GO. **Anais...** Goiânia – GO: IFG, 2012.

SOUZA, P.M.; MUELLER, A.; FERNANDEZ, A.; STAHL, M. Microbiological efficacy in liquid egg products of a UV-C treatment in a coiled reactor. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 21, p. 90-98, Jan., 2014.

SPISSO, B. F.; FERRAZ, B., NOBREGA, MARQUES, A.W., SIPOLI, A.M. Resíduos e contaminantes químicos em alimentos de origem animal no Brasil: histórico, legislação e atuação da vigilância sanitária e demais sistemas regulatórios. **Ciências e Saúde Coletiva**, 14(6). p. 2091-2106, 2007.

STRINGHINI M.L.F, ANDRADE M.A, MESQUITA A.J, ROCHA T.R, 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, p. 1317- 1327, 2009.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 12.ed. Porto Alegre: Artmed, 2017, p 934.



## **CAPÍTULO II**

**CTX-M-producing *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. and *Citrobacter* spp.  
isolated from free-range chicken eggs in Brazil**

Artigo a ser submetido no modelo de comunicação curta ao Journal of  
Antimicrobial Chemotherapy  
Fator de impacto: 5.071 Qualis A1

**KLEBSIELLA spp., SALMONELLA spp. E CITROBACTER spp.  
PRODUTORA DE CTX-M ISOLADO DE GEMAS DE OVOS DE GALINHA  
CAIPIRA (*Gallus gallus domesticus*) NO BRASIL**

**RESUMO**

A emergência e a disseminação de bactérias produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL) têm sido retratadas como grande problema de saúde pública. No Brasil, embora as ESBL estejam amplamente disseminadas entre os membros da família *Enterobacterales* e sejam descritas como enzimas do tipo TEM, SHV, CTX-M, VEB, BES e GES em diferentes estados, as enzimas dos grupos CTX-M-2, CTX-M-8 e CTX-M-9 são as mais prevalentes em território brasileiro. O objetivo desse trabalho, foi verificar o perfil de resistência dos microrganismos isolados em gemas de ovos de galinha caipira (*Gallus gallus domesticus*) comercializados em feiras livres no semiárido do nordeste brasileiro, Foram analisados 128 ovos. As amostras de ovos, do conteúdo interno, foram analisadas separadamente, utilizando uma metodologia adaptada. De um total de 22 amostras positivas para bactérias Gram negativas, foram realizados testes de sensibilidade a antibióticos, assim como testes fenotípicos e genotípicos. Doze enterobactérias foram positivas no teste fenotípico de aproximação de disco, consideradas bactérias betalactamases de espectro estendido (ESBL). No teste genotípico, quatro isolados eram carreadores de genes CTX-M, sendo que o grupo blaCTX-M2 like foi identificado em um isolado (*Klebsiella* spp.) e o grupo blaCTX-M8 like em três isolados (*Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. e *Citrobacter* spp.) Conclui-se que os ovos comercializados em feiras livres no nordeste do semiárido brasileiro, contêm microrganismos que podem resultar em deterioração microbiana e alterar as propriedades nutritivas, disseminar cepas resistentes, representando potencial comprometimento para a saúde pública.

**Palavras-chave:** resistência antimicrobiana, antimicrobianos, saúde única, enterobactérias.

***KLEBSIELLA* spp., *SALMONELLA* spp. AND *CITROBACTER* spp.  
PRODUCER OF CTX-M ISOLATED FROM EGGS OF THE CAIPIRA  
CHICKEN (*Gallus gallus domesticus*) EGGS IN BRAZIL**

**ABSTRACT**

The emergence and spread of bacteria producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) have been portrayed as a major public health problem. In Brazil, although ESBL are widely disseminated among members of the Enterobacterales family and are described as enzymes of the type TEM, SHV, CTX-M, VEB, BES and GES in different states, the enzymes of the CTX-M-2, CTX groups -M-8 and CTX-M-9 are the most prevalent in Brazilian territory. The objective of this work was to verify the resistance profile of the microorganisms isolated in egg yolks of free-range chicken (*Gallus gallus domesticus*) sold in open markets in the semiarid region of northeastern Brazil, 128 eggs were analyzed. The egg samples, of the internal content, were analyzed separately, using an adapted methodology. From a total of 22 positive samples for Gram negative bacteria, antibiotic sensitivity tests were performed, as well as phenotypic and genotypic tests. Twelve enterobacteria were positive in the phenotypic disk approximation test, considered extended-spectrum beta-lactamase bacteria (ESBL). In the genotypic test, four isolates were carriers of CTX-M genes, with the blaCTX-M2 like group being identified in one isolate (*Klebsiella* spp.) And the blaCTX-M8 like group in three isolates (*Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. and *Citrobacter* spp.) It is concluded that eggs sold in open markets in the northeast of the Brazilian semiarid region, contain microorganisms that can result in microbial deterioration and alter nutritional properties, disseminating resistant strains, representing a potential compromise for public health.

**Keywords:** antimicrobial resistance, antimicrobials, unique health, enterobacteria.

## INTRODUÇÃO

A criação de galinhas caipiras é uma atividade habitual e exerce importante função social sobretudo em propriedades rurais de agricultura familiar no Brasil. O ovo é uma das principais fontes para alimentação humana, porém, apresenta grande suscetibilidade à contaminação microbiológica, pois possui diversos nutrientes que auxiliam no desenvolvimento de microrganismos. Um dos maiores fatores de preocupação em relação ao consumo de ovos é a saúde pública, pois esse alimento quando consumido in natura, armazenado de forma errônea, ingerido fora do prazo de validade, entre outros fatores, pode causar intoxicações gastrointestinais pela contaminação de agentes como *Salmonella* sp., por *Staphylococcus aureus*, ou Coliformes (ALMEIDA et al., 2017).

A demanda elevada por alimentos avícolas promoveu a utilização de antimicrobianos com o intuito de prevenir e tratar doenças bacterianas, diminuir a mortalidade e atuar como promotores de crescimentos resultando, ao longo dos anos, no consumo exacerbado desses medicamentos, e conseqüentemente selecionando bactérias resistentes (TALEBIYAN et al., 2014). Considerada um problema de saúde global e comprometendo a efetividade dos antibióticos, a resistência antimicrobiana é um problema de Saúde Única e inviabiliza o tratamento de infecções comuns, na qual está intrinsecamente associada com a utilização de agentes antimicrobianos de forma indiscriminada (TALEBIYAN et al., 2014). Estima-se que o número de mortes relacionadas à essa resistência aumentem de 700.000 para 10 milhões por ano até 2050 (O'NEILL, 2015).

Neste contexto, a emergência e rápida disseminação de enterobactérias produtoras de CTX-M em animais e seres humanos é um ponto crítico de importância em Saúde Única. A produção de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) é um dos principais mecanismos de resistência em bactérias Gram-negativas aos betalactâmicos, principalmente na família Enterobacterales, e com maior prevalência em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (LICOPAN; SILVA, 2012). O surgimento e a disseminação de patógenos resistentes e produtores de CTX-M em ovos de galinhas caipiras cria importantes limitações terapêuticas na medicina veterinária.

Dessa forma, considerando os fatores relacionados à importância da qualidade microbiológica e resistência antimicrobiana do ovo caipira o objetivo desse trabalho é relatar a ocorrência de isolados de *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. e *Citrobacter* spp. produtoras de CTX-M a partir de ovos de galinha caipira comercializados no nordeste do Brasil.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Local de estudo e obtenção das amostras**

O estudo foi realizado em pontos comerciais de feiras livres do estado do Rio Grande do Norte, semiárido brasileiro. Os municípios contemplados foram Acari, Caicó, Carnaúba dos Dantas, Currais Novos, Jardim do Seridó, Jucurutu, Lagoa Nova, São José do Seridó, São Paulo do Potengi e Serra Negra do Norte. Os ovos foram transportados em temperatura ambiente até o Laboratório de Microbiologia do Hospital Veterinário Dr. Ivon Macedo Tabosa da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), campus Patos – PB, onde foram processados e analisados. No total, no período de agosto de 2018 a abril de 2019.

### **Isolamento e identificação bacteriana**

A parte externa do ovo (casca) foi higienizada com álcool 70% e logo após, por visualização em ovoscópio, uma pequena parte desta casca foi quebrada com uma pinça estéril na porção inferior onde localiza-se a câmara de ar, formando um orifício de aproximadamente 1 cm, sem danificar a película entre a casca e albúmen para separação do albúmen e gema utilizando uma seringa para aspiração. Em seguida, o material aspirado (albúmen e gema separados) foi enriquecido em caldo Brain Heart Infusion (BHI) na razão de 2 mL de conteúdo dos ovos em 3 mL de BHI por 24 h na temperatura de 37°C e posteriormente semeado em placas de Petri contendo os meios ágar sangue ovino desfibrinado a 5%, ágar MacConckey, e ágar ágar com espessura de 9 mm. Após o cultivo, as placas foram incubadas à temperatura de 37°C em aerobiose por 24-48 horas para verificação do crescimento bacteriano. As colônias bacterianas foram

submetidas ao exame bacterioscópico pelo método de coloração de Gram e identificadas por provas bioquímicas: TSI, motilidade, malonato, produção de indol, produção de urease, produção de gelatinase, produção de fenilalanina desaminase, utilização de citrato, reação de vermelho de metila (VM) e Voges-Proskauer (VP), fermentação da lactose, hidrólise de esculina, redução de nitrato, catalase, oxidase e coagulase (MURRAY et al., 1999).

### **Teste de susceptibilidade *in vitro***

Para a avaliação da susceptibilidade *in vitro*, foi utilizado o método de disco difusão em Ágar Müller-Hinton (MH), preconizado pela técnica de Kirby-Bauer (Bauer et al., 1966), conforme recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institutes (CLSI) (CLSI, 2019). Foram avaliados as seguintes classes de antibióticos: Aminoglicosídeos- Amicacina (30 µg), Gentamicina (10 µg), Kanamicina (30 µg), Neomicina (30 µg); β-lactâmicos- Amoxicilina/Clavulanato (20 µg), Ampicilina (30 µg), Cefalexina (30 µg), Cefalotina (30 µg), Cefepime (30 µg), Cefotaxima (30 µg), Cefoxitina (30 µg), Ceftazidima (30 µg), Ceftiofur (30 µg), Imipenem (30 µg); Quinolonas- Enrofloxacin (30 µg), Norfloxacin (10 µg); Outros- Clorafenicol (30 µg), Polimixina B e Tetraciclina (30 µg).

### **Deteção de β-lactamases de espectro ampliado (ESBL)**

Para a detecção fenotípica de ESBL foi utilizado o método de aproximação em discos. Os inóculos foram semeados em placas de Müller-Hinton (MH) segundo as normas do CLSI (2019), e após a secagem foram adicionados os discos de amoxicilina/ácido clavulânico 10 µg, aztreonam 30 µg, ceftazidima 30 µg, cefotaxima 30 µg e cefepime 30 µg (Laborclin), e em seguida incubados a temperatura de 37°C por 24-48 horas. Foi considerada produtora de ESBL a bactéria para a qual houve aumento do diâmetro do halo de inibição de β-lactâmico em direção ao disco de amoxicilina/ácido clavulânico ou o aparecimento da zona fantasma.

## Detecção de genes blaCTX-M e subtipagem em grupos RFLP

A amplificação de blaCTX-M foi realizada por PCR utilizando-se os primers e metodologia descritos previamente (EDELSTEIN et al., 2003). A análise de RFLP – “Restriction Fragment Length Polimorfism” foi realizada para agrupar os genes blaCTX-M identificados entre os grupos previamente descritos (BONNET, 2004). As endonucleases de restrição utilizadas foram selecionadas de acordo com metodologia já descrita (EDELSTEIN et al., 2003).

## RESULTADOS

Os isolados analisados neste estudo incluíram 22 bactérias Gram-negativas (Tabela 1). Essas bactérias foram submetidas ao teste de susceptibilidade, no qual, os padrões de resistência em relação a 18 antimicrobianos são apresentados na Tabela 2.

Testes fenotípicos foram realizados. Dos 22 isolados, 12 foram positivos no para ESBL, sendo um *E. coli*, um *Enterobacter* spp., três *Citrobacter* spp., dois *Klebsiella* spp., um *Alcaligenes* spp., dois *Proteus* spp., e dois *Salmonella* spp. Após teste genotípico, quatro isolados foram detectados com genes CTX-M (Tabela 3), sendo que o grupo blaCTX-M2 like foi identificado em um isolado (*Klebsiella* spp.) e o grupo blaCTX-M8 like em três isolados (*Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. e *Citrobacter* spp.).

**Tabela 1-** Frequência de bactérias isoladas de ovos de galinha caipira (*Gallus gallus domesticus*) comercializados em feiras livres do semiárido brasileiro (n = 22), no período de agosto de 2018 a abril de 2019.

Agentes	Número de amostras positivas	Frequência (%)
<i>Pseudomonas</i>	3	13,6
<i>Klebsiella</i> spp.	3	13,6
<i>Salmonella</i> spp.	3	13,6
<i>Proteus mirabilis</i>	3	13,6
<i>Citrobacter</i> spp.	3	13,6
<i>Escherichia coli</i>	3	13,6
<i>Providencia</i> spp.	2	9,1
<i>Enterobacter</i> spp.	1	4,5
<i>Alcaligenes</i> spp.	1	4,5

**Tabela 2-** Suscetibilidade aos antimicrobianos de 22 isolados Gram negativos de ovos de galinhas caipiras (*Gallus gallus domesticus*)

<b>ANTIMICROBIANOS</b>	<b>SENSÍVEL</b>	<b>INTERMEDIÁRIO</b>	<b>RESISTENTE</b>
<b>AMINOGLICOSÍDEOS</b>			
Amicacina (30 µg)	77,30%	4,50%	18,20%
Gentamicina (10 µg)	63,60%	4,50%	31,90%
Neomicina (30 µg)	45,50%	18,20%	36,40%
<b>B-LACTÂMICOS</b>			
Amoxicilina +Ác. Clavulânico (10 µg)	18,20%	4,50%	77,30%
Ampicilina (10 µg)	4,50%	0%	95,50%
Cefalexina (30 µg)	22,70%	9,10%	68,20%
Cefotaxima (30 µg)	54,50%	9,10%	36,40%
Ceftazidima (30 µg)	95,50%	0%	4,50%
Cefalotina (30 µg)	22,70%	4,50%	72,70%
<b>QUINOLONAS</b>			
Ácido Pipemídico (20 µg)	31,8%	18,20%	45,50%
Ácido Nalidíxico (30 µg)	22,70%	4,50%	72,70%
Enrofloxacina (5 µg)	68,20%	4,50%	27,30%
Norfloxacina (10 µg)	59,10%	4,50%	36,40%
<b>CARBAPENÊMICOS</b>			
Ertapinem (10 µg)	41%	0%	59,1%
Imipinem (10 µg)	31,90%	4,50%	63,30%
Meropinem (10 µg)	40,90%	13,60%	45,50%
<b>OUTROS</b>			
Clorafenicol (30 µg)	68,20%	4,50%	27,30%
Tetraciclina (30 µg)	54,50%	9,10%	36,40%

**Tabela 3:** Detecção de genes *bla*<sub>CTX-M</sub> e subtipagem em grupos RFLP.

<b>Agentes</b>	<b>Nº de isolados positivos</b>	<b><i>bla</i><sub>CTX-M</sub></b>
<i>Klebsiella</i> spp.	1	<i>bla</i> <sub>CTX-M2</sub> like
<i>Klebsiella</i> spp.	1	<i>bla</i> <sub>CTX-M8</sub> like
<i>Salmonella</i> spp.	1	<i>bla</i> <sub>CTX-M8</sub> like
<i>Citrobacter</i> spp.	1	<i>bla</i> <sub>CTX-M8</sub> like



## DISCUSSÃO

Ampla variedade de enterobactérias em ovos foram encontradas nesse estudo. *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Proteus mirabilis*, *Citrobacter* spp., *Escherichia coli*, *Providencia* spp., *Enterobacter* spp. e *Alcaligenes* spp. foram isoladas. Por se tratar de um alimento bastante consumido, com pouca ou nenhuma fiscalização higiênico-sanitária, bem como suas formas de armazenamento, transporte e temperaturas elevadas, os ovos de galinhas caipiras comercializados em feiras livres no semiárido brasileiro estão susceptíveis a contaminações por bactérias por diversas vias de transmissão, o que explica o aparecimento desses agentes microbianos. Essa contaminação no interior dos ovos, ocasionada pela presença de bactérias Gram negativas, é responsável pela sua deterioração, visto que, esses microrganismos proteolíticos produzem odor e sabor desagradável (PIRES et al.,2015).

Com o isolamento e identificação das bactérias encontradas, procedeu-se o teste de sensibilidade, no qual foi possível observar alta frequência de resistência por parte desses patógenos para mais de uma classe de antibiótico, destacando altos índices de resistência aos betalactâmicos: amoxicilina +ac. clavulânico (77,3%), ampicilina (95,5%), cefalexina (68,2%), cefalotina (72,7%), que pode ser um indicador de produção de enzimas betalactamases por parte dessas bactérias. A produção de betalactamases constitui o principal mecanismo associado à resistência aos antibióticos betalactâmicos, como penicilinas, cefamicinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenens (LICOPAN; SILVA, 2012). O aumento da resistência aos antimicrobianos, gera a necessidade do conhecimento do perfil de sensibilidade das bactérias que mais causam infecções e no modo de disseminação da resistência (MARTINS, 2011).

Apesar de existir uma preocupação em relação ao uso e distribuição correta de antibióticos para humanos, na medicina veterinária não existe esse controle, utilizando-se muitas vezes de forma errônea esses fármacos. O uso inadequado dos antibióticos na avicultura pode estar relacionado a diversos fatores, tais como: dose subterapêutica, altas doses, promotores de crescimento, infecções não diagnosticadas entre outros, contribuindo assim para o surgimento de cepas resistentes que podem ser transmitidas aos ovos e disseminadas para

o ambiente e humanos. Se tratando de resistência bacteriana, essas cepas geram um problema complexo que envolve várias espécies de bactérias e seus diferentes mecanismos de resistência (CHANTZIARAS et al., 2014)

Após a realização do método do teste de aproximação de discos, constatou-se que 12 enterobactérias eram positivas para ESBL, havendo sinergismo entre os substratos e o inibidor, comumente denominada zona fantasma. Nesse caso, cepas resistentes a classes de antibióticos podem ser disseminadas através desse alimento, um problema complexo que envolve a saúde humana, animal e ambiental. Isso ocorre, porque muitas vezes essa resistência é transferida de uma bactéria a outra ocasionando desequilíbrio em vários ecossistemas existentes. O uso empírico de antimicrobianos na mesma rapidez que são descobertos, as bactérias vêm demonstrando uma notável habilidade de desenvolver resistência a esses agentes (BEZERRA et al., 2017).

Depois da realização da Detecção de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (ESBL), realizou-se a Detecção de genes *bla*CTX-M e subtipagem em grupos RFLP, pelo método de diagnóstico Proteína C- Reativa (PCR), revelando a presença de quatro bactérias carreadoras dos genes CTX-M, sendo que o grupo *bla*CTX-M2 like foi identificado em um isolado (*Klebsiella* spp.) e o grupo *bla*CTX-M8 like em três isolados (*Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. e *Citrobacter* spp.).

Essas enzimas são divididas em seis grupos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 e KLUC. No Brasil, a produção de enzimas CTX-M tornou-se o mecanismo mais comum de resistência adquirida às cefalosporinas de amplo espectro em bactérias Gram-negativas, a partir de amostras clínicas humanas e animais, bem como em ambientes aquáticos (CASELLA et al., 2015). Isso demonstra um fator muito preocupante, uma vez que, esse tipo de resistência embora já tenha sido reportado no Brasil em animais e ambientes hospitalares, não deveria ser encontradas em alimentos.

Detectar esses agentes em ovos de galinhas caipiras, demonstra perigo a saúde pela rápida mutação e disseminação dessas bactérias. As betalactamases, frequentemente encontradas em território brasileiro, incluem os grupos CTX-M-2, CTX-M-8 e CTX-M-9, o que se verifica nesse estudo ao encontrar as variantes CTX-M2, CTX-M8. O surgimento de novas variantes e a prevalência de betalactamases em isolados de origem comunitária, ambiental e

em alimentos têm demonstrado a complexidade em se estabelecer a origem da resistência (LINCOPAN; SILVA, 2012). Dessa maneira, tomando como base a importância desse estudo em ovos de galinhas caipiras no semiárido brasileiro, são necessárias medidas que estabeleçam o uso adequado de antibióticos na clínica médica e no agronegócio, a fim de diminuir os impactos na saúde pública e evitar o aumento da resistência bacteriana.

## **CONCLUSÃO**

A presença de quatro bactérias carreadoras dos genes CTX-M, do grupo *bla*<sub>CTX-M2 like</sub> foi identificado em um isolado (*Klebsiella* spp.) e o grupo *bla*<sub>CTX-M8 like</sub> em três isolados (*Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. e *Citrobacter* spp.). O surgimento e a disseminação de bactérias produtoras de CTX-M em ovos de galinha caipira cria importantes limitações terapêuticas na medicina veterinária, e considerando que a abordagem One Health foi incentivada a unificar a saúde humano-animal-ambiente em um único padrão, a rápida disseminação de genes relevantes de resistência antimicrobiana em produtos de origem animal, como ovos de galinha caipira, é preocupante em uma perspectiva mais ampla da saúde pública, uma vez que galinhas portadoras de bactérias produtoras de ESBL podem contribuir para a disseminação desses patógenos na interface humano-animal.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, C. A., FRIEBEL, D., ROSSA, R. B. & GELINSKI, J. M. L. 2017. **Avaliação das Condições Higiênico-Sanitárias da Casca e Gema de Ovos In Natura**. Anuário pesquisa e extensão Unoesc Videira, 2.
- BEZERRA, W.G.A.; HORN, R.H.; SILVA, I.N.G.; TEIXEIRA, R.S.C.; LOPES, E.S.; ALBUQUERQUE, Á.H.; CARDOSO, W.C. Antibióticos no setor avícola: uma revisão sobre a resistência microbiana. **Archivos de Zootecnia**, 66 (254): 301-307. 2017.
- CHANTZIARAS, I.; BOYEN, F.; CALLENS, B. AND DEWULF, J. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. **J Antimicrob Chemother**, 2014.
- PIRES, F. M.; PIRES, S. F.; ANDRADE, C. L.; CARVALHO, D. P.; BARBOSA, A. F. C.; MARQUES, M. R. Fatores que afetam a qualidade dos ovos de poedeiras comerciais: armazenamento, idade, poedeira. **Nutritime Revista Eletrônica, on-line, Viçosa**, v. 12, n. 6, p. 4379-4385, 2015
- BONNET, R.. Growing Group of Extended-Spectrum. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 48, p.1-14, jan. 2004.
- MARTINS, Alexandre Costa; PICOLI, Simone Ulrich. Métodos Alternativos para detecção de betalactamase de espectro estendido em Escherichia Coli e Klebsiella pneumoniae. **Rev. Bras. Patol. Med. Lab**, v. 47, n. 4, p. 421-426, ago. 2011.
- CASELLA, T., et al. Detection of blaCTX-M-type genes in complex class 1 integrons carried by Enterobacteriaceae isolated from retail chicken meat in Brazil. **Int. J. Food Microbiol**. 197:88- 91, 2015.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**, 29th Edition. document M100. Pennsylvania, USA, 2019.
- EDELSTEIN M., PIMKIN M., PALAGIN I., EDELSTEIN I., STRATCHOUNSKI L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in Russian hospitals. **Antimicrob Agents Chemother**. v.47, n. 12, p.3724-3732. 2003.
- O'NEILL, J. Antimicrobials in Agriculture and the Environment: Reducing Unnecessary Use and Waste. **The Review on Antimicrobial Resistance**. 2015.
- TALEBIYAN, R.; KHERADMAND, M.; KHAMESIPOUR, F; RABIEE-FARADORBEH, M. Multiple antimicrobial resistance of Escherichia coli isolated from chickens in Iran. **Veterinary Medicine International**, 2014. Disponível

em: < <https://www.hindawi.com/journals/vmi/2014/491418/abs/>>. Acesso em: 23 de out. 2019.

SILVA, C.K.; LINCOPAN, N. Epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases in Brazil: clinical impact and implications for agribusiness. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** vol.48 no.2 Rio de Janeiro Apr. 201

## CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos neste estudo revelam a presença de isolados em ovos de galinha caipira (*Gallus gallus domesticus*) comercializados em feiras livres do nordeste do semiárido do Brasil, apresentando resistência em bactérias gram positivas e gram negativas como exemplo das *Enterobacterales*, demonstrando um fator preocupante e de muita importância, uma vez que, a resistência e presença de microrganismos resistentes aos antimicrobianos, dificulta a escolha do medicamento na terapia desses microrganismos, podendo ser potencialmente transmitidas ao homem através de alimentos e do seu contato direto com animais. A presença de betalactames de espectro ampliado e as variantes CTX-M entre essas isoladas é uma questão de saúde pública, visto que, bactérias desses ovos conseqüentemente podem disseminar esses patógenos para humanos, animais e ambientes. Assim, é de extrema importância monitorar a presença dessas bactérias, seus perfis e mecanismos de resistência, ressaltando a importância do uso correto dos antimicrobianos.