

# PESQUISA DE COLIFORMES TOTAIS E COLIFORMES FECAIS ANALISADOS EM OVOS COMERCIAIS NO LABORATÓRIO DE PATOLOGIA AVÍCOLA DE DESCALVADO\*

A.L.S.P. Cardoso<sup>1</sup>, E.N.C. Tessari, A.G.M. Castro, A.M.I. Kanashiro, N.M.S.Q. GAMA

<sup>1</sup>Laboratório de Patologia Avícola de Descalvado, Instituto Biológico, Rua Bezerra Paes, 2278, CEP 13690-000, Descalvado, SP, Brasil.

## RESUMO

Com objetivo de verificar as condições higiênico-sanitárias de ovos comerciais de vários fornecedores da região de Descalvado, estado de São Paulo, foram avaliados, no período de 17/1/98 a 28/12/98, 48 amostras compostas por 30 ovos cada. Os gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, formam o grupo denominado coliforme que diferencia-se em dois grupos: total e fecal. Os ovos foram analisados no Laboratório de Patologia Avícola de Descalvado, onde foram assepticamente manipulados e processados de acordo com as técnicas bacteriológicas específicas para isolamento e identificação destes microorganismos. Obteve-se crescimento de coliforme total em 33,3% e de coliforme fecal em 8,33% das amostras. Estes resultados indicam que é necessário uma melhora na manipulação e acondicionamento desses ovos, considerando os padrões de comparação em ovos frescos para estes microorganismos de acordo com a Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde.

PALAVRAS-CHAVE: Aves, coliformes, *Escherichia coli*, ovo.

## ABSTRACT

RESEARCH OF TOTAL COLIFORMS AND FECAL COLIFORMS ANALYSED AT THE AVIAN PATHOLOGY LABORATORY OF DESCALVADO. With the objective of verifying the sanitary and hygienic conditions of commercial eggs from several suppliers of the Descalvado region, state of São Paulo, 48 samples, with 30 eggs each, were evaluated in the period from 1/17/98 to 12/28/98. The *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* and *Klebsiella* genres, form the group coliform that split in 2 groups: total and fecal. The eggs were analysed at the Avian Pathology Laboratory of Descalvado and were aseptically manipulated and processed according to the specific bacteriological techniques for isolation and identification of these microorganisms. A 33.3% total coliform and 8.33% fecal coliform growth was obtained. These results indicate that it is necessary an improvement in manipulation and storage of these eggs, considering the standards for comparison in fresh eggs for these microorganisms according to the Sanitary Bureau of the Brazilian Ministry of Health.

KEY WORDS: Poultry, coliforms, *Escherichia coli*, egg.

## INTRODUÇÃO

Os ovos são reconhecidos como um importante alimento, degustado por diversas populações ao redor do globo, sendo sua popularidade justificada pela sua fácil obtenção, seu baixo custo e também porque o ovo é praticamente imbatível em sua excelência nutricional (NASCIMENTO *et al.*, 1996).

O grupo dos coliformes totais inclui todas as bactérias na forma de bastonetes gram-negativos, não esporogênicos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, capazes de fermentar a lactose com produ-

ção de gás, em 24 a 48 horas a 35°C. Esta definição é a mesma para o grupo de coliformes fecais, porém, restringindo-se aos membros capazes de fermentar a lactose com produção de gás, em 24 horas a 44,5-45,5°C (HITCHINS *et al.*, 1996; SILVA & JUNQUEIRA, 1995; SILVA *et al.*, 1997).

O índice de coliformes totais avalia as condições higiênicas e o de coliformes fecais é empregado como indicador de contaminação fecal e avalia as condições higiênico-sanitárias deficientes, visto presumir-se que a população deste grupo é constituída de uma alta proporção de *E. coli* (SIQUEIRA, 1995).

\*Trabalho apresentado na 12ª Reunião Anual do Instituto Biológico, realizada em São Paulo, em novembro de 1999.

Os principais agentes de infecções intestinais entre outros encontram-se as enterobactérias, destacando-se como um microorganismo de interesse em alimentos a *Escherichia coli* O157:H7. Sua designação surgiu inicialmente em 1982, após ter sido implicada como agente etiológico da colite hemorrágica (NASCIMENTO & STAMFORD, 2000).

Bactérias que pertencem ao grupo coliforme têm como habitat o trato intestinal do homem e de outros animais (PARDI *et al.*, 1995; SILVA & JUNQUEIRA, 1995; VANDERZANT & SPLITTSTOESSER, 1996) e espécies dos gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella* podem persistir por longos períodos e se multiplicarem em ambientes não fecais (SIQUEIRA, 1995). Essas bactérias são prejudiciais para os alimentos, onde sua presença determina inutilidade dos mesmos (FRAZIER, 1976). *E. coli* é o mais importante indicador de contaminação fecal (VANDERZANT & SPLITTSTOESSES, 1996), embora possa ser introduzida nos alimentos a partir de fontes não fecais (SILVA & JUNQUEIRA, 1995).

Ovos de qualidade ruim são problemas comuns que causam grandes prejuízos na indústria avícola e podem ser devido a fatores que envolvem manejo, meio ambiente e doenças.

Geralmente admite-se que o ovo de galinha é estéril até o momento da postura (HAYES, 1993), é suscetível a uma rápida contaminação (FRAZIER, 1976) e a penetração de microorganismos é facilitada pela umidade (HAYES, 1993; RIEDEL, 1987). A gema do ovo é um excelente meio de cultivo para os microorganismos (FRONING *et al.*, 1996) infectada possivelmente por bactérias que penetram através dos poros da casca, atravessam as membranas, multiplicam-se na clara e alcançam então a gema. Provavelmente essas bactérias são encontradas em matéria fecal (FRAZIER, 1976). A alteração dos ovos deve-se fundamentalmente pelas bactérias gram-negativas (HAYES, 1993) devido a uma enzima anti-gram-positiva existente na clara (RIEDEL, 1987).

Ovos que permanecem estocados por longos períodos tem sua qualidade interna alterada, favorecendo a multiplicação bacteriana, devido à perda da viscosidade da albumina (PARDI, 1977).

As enterobactérias tem atividade proteolítica, destruindo algumas estruturas da casca do ovo, o que poderia facilitar a penetração de outras bactérias as quais se multiplicariam no conteúdo interno do ovo, provocando sua deterioração (BEZERRA, 1995).

O objetivo do presente trabalho foi verificar a ocorrência do grupo coliforme em ovos comerciais e avaliar as condições higiênico-sanitárias desses ovos para assegurar o controle de sua qualidade, beneficiando assim o consumo humano.

A indústria avícola deve estar bastante consciente de que há muito a ser feito no sentido de garantir uma melhor qualidade microbiológica de seus produtos (NASCIMENTO *et al.*, 1996).

## MATERIAL E MÉTODOS

### Colheita das amostras:

Foram coletadas no total 48 amostras de ovos comerciais de vários fornecedores da região de Descalvado, Estado de São Paulo e analisados no Laboratório de Patologia Avícola de Descalvado através de técnicas bacteriológicas específicas para determinação de coliformes totais e fecais. Os ovos foram lavados com álcool iodado e feito um "pool" com 30 ovos de cada amostra, o qual foi homogeneizado asépticamente e destes 25g foram transferidas para 225 ml de água salina peptonada a 1% (DIFCO) estéril e colocadas em homogeneizadores esterelizados. Esta diluição corresponde a uma proporção de 1:10, ou seja, 10g do homogeneizado contém uma grama da amostra. A partir da diluição inicial, foram feitas as diluições seriadas  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  em água salina peptonada 1%. Estas diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  foram usadas para posterior procedimento microbiológico.

### Procedimentos microbiológicos:

A metodologia foi seguida de acordo com as técnicas descritas por SILVA *et al.* (1997). Para análise de coliformes fecais e coliformes totais, microorganismos anaeróbios facultativos fermentadores de lactose com produção de ácido e gás dentro de 24 a 48 horas de incubação à temperatura de 32 a 37°C, usou-se a metodologia de tubos seriados. Partindo das diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  foi pipetado alíquotas de 1 ml das respectivas diluições para uma série de três tubos contendo 9ml do Caldo Lauril Triptose suplementado com 50mg/L de 4-metil-umbelifenil- $\beta$ -D-glucuronídeo (LST-MUG) (DIFCO) contendo tubo de Durham invertido, homogeneizando e incubando os tubos a 35°C/48 horas. Transcorrido este tempo foi observado a produção de gás nos tubos de fermentação (tubo de Durham). A *E. coli* produz uma enzima  $\beta$ -glucuronidase que degrada o complemento MUG, o produto resultante (4-metilumbeliferona) é fluorescente sob luz ultravioleta. Utilizando os tubos positivos de LST-MUG foi observado sob lâmpada de luz ultravioleta (0 a 6W), ondas longas (365nm), numa cabine escura. Foi considerado como positivo todos os tubos que apresentaram fluorescência azul, confirmativa da presença de *E. coli*. Anotou-se o número de tubos positivos e determinou-se o Número Mais Provável (NMP) em uma tabela adequada às diluições utilizadas e o resultado foi expresso em NMP de coliformes fecais/g.

Para contagem de coliformes totais, tomou-se todos os tubos de LST-MUG com produção de gás e foi transferido uma alçada de cada cultura para tubos de Caldo Verde Brillante 2% (VB) (DIFCO). Incubou-se

a 35°C por 24 a 48 horas e observou-se o crescimento com produção de gás. Foi anotado o número de tubos de VB com gás confirmativo da presença de coliformes totais e determinado o NMP/g em uma tabela de NMP apropriada as diluições inoculadas, o resultado foi expresso em NMP de coliformes totais/g.

## RESULTADOS

Através dos resultados obtidos no presente trabalho, os produtos pesquisados no período, apresentam níveis significativos de contaminação de acordo com o código de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde – Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária-VNSVA-Portaria nº 451 de 19/9/97 onde do total das amostras analisadas, 33,3% apresentaram resultado positivo para coliformes totais e 8,33% apresentaram resultados positivos para coliformes fecais. Com relação a coliformes fecais, 4 (quatro) amostras obtiveram resultados entre o índice de 100 a 500 NMP de coliformes fecais/g, indicando que 8,33% desses ovos apresentaram condições higiênicas insatisfatórias (BRASIL, 1998). Quanto a coliformes totais, 16 (dezesseis) amostras obtiveram resultados entre o índice de 100 a 500 NMP de coliformes totais/g. Considerando-se que não existem padrões específicos de comparação para coliformes totais estabelecido por esta legislação, ainda assim, o resultado obtido de coliformes totais de acordo com o índice dos padrões específicos para NMP de coliformes fecais/g, pode ser útil para indicar a necessidade de melhorar a qualidade higiênica desses ovos.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

De acordo com os padrões específicos de comparação em ovos frescos para coliformes totais e fecais estabelecido pela legislação em vigor, as análises dos resultados deste trabalho indicam a necessidade de adoção de boas práticas de manipulação. Isso envolve um maior controle no acondicionamento desses ovos e do isolamento das áreas de manipulação para melhorar a qualidade dos ovos. A importância de medidas higiênicas-sanitárias assegura o controle de patógenos nos ovos para que estes cheguem em perfeitas condições para o consumo humano, uma vez que a cada dia, o consumidor torna-se mais exigente, isto é, requer melhores condições sanitárias, sendo que as normas sanitárias estão ganhando importância por parte das empresas visando o consumo final.

DOYLE & SCHOENI (1987) demonstraram que a ocorrência de *E. coli* O157:H7, sorotipo extremamente patogênico para humanos, requer uma maior atenção por parte dos órgãos de controle e inspeção, já que há

indicações de que esta é passível de ocorrer em produtos avícolas. Entretanto, trabalhos como os de DE BOER (1993) indicaram a sua ausência nesses produtos.

Segundo FRONING *et al.* (1996), nos E.U.A. a qualidade dos ovos e seus produtos vêm sendo melhorados nos últimos anos desde que em 1971 a legislação federal entrou em vigor, obrigando que U. S. Department Agriculture (USDA) inspecione os ovos e seus produtos.

Em estudos de NASCIMENTO & STAMFORD (2000) verificou-se que a incidência de *Escherichia coli* O157:H7 em alimentos tem sido de suma importância para o desenvolvimento de métodos mais rápidos e eficientes para a sua detecção.

BEZERRA (1995) demonstrou que ovos examinados provenientes de super mercado, feira livre, galinha caipira e de aves com suspeita clínica, apresentaram contaminação por *Pseudomonas sp.*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* e *Escherichia coli*. Comparando a ocorrência de isolamento das enterobactérias, a mais isolada foi *Pseudomonas sp.*, principalmente nos ovos vendidos em feira livre e naqueles de galinha caipira. De modo geral, os ovos examinados apresentaram contaminação por coliformes, sendo a *Escherichia coli* isolada em todos os ovos, independente de sua procedência. Tanto a casca (70%) quanto o conteúdo interno, albúmem (12,5%) e gema (17,5%) dos ovos de todas as procedências apresentaram contaminação por coliformes, ressaltando que a *Escherichia coli* foi isolada apenas da casca dos ovos.

De acordo com TOLEDO *et al.* (1991), no Brasil não existem dados de análises microbiológicas, realizadas de forma sistemática, que visem a determinação da qualidade dos ovos “in natura” consumidos pela população.

No Brasil a Secretaria de Vigilância do Ministério da Saúde, considera a necessidade do constante aperfeiçoamento das ações no controle sanitário, com vistas a proteção da saúde da população. Quanto a definição de critérios e padrões microbiológicos para alimentos é indispensável às boas práticas de produção de alimentos e prestação de serviços na área de alimentação. Os princípios gerais a serem aplicados para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos têm justificativa no que se refere aos problemas de saúde pública e na necessidade de uniformizar os padrões para o comércio entre os países (BRASIL, 1998).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DE BOER, E. *Escherichia coli* O157:H7 in poultry products. In: EUROPEAN SYMPOSIUM ON THE QUALITY OF POULTRY MEAT, 11., 1993, Tours. *Proceedings*. Tours: P. Colin, 1993, v.1, p.533-536.

- DOYLE, M.P. & SCHOENI, J.L. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.53, p.2394-2396, 1987.
- BEZERRA, R. Recuperação e pesquisa de *Salmonella* spp. e detecção de anticorpos em ovos comerciais de galinha *Gallus gallus* (Linnaeus, 1758). São Paulo, 1995. 59p. [Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo].
- BRASIL. Ministério da Agricultura. Portaria nº 451 de 19 de setembro de 1997. Regulamento técnico - Princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2/7/98, p.4-13, 1998.
- FRAZIER, N.C. *Microbiología de los alimentos*. Zaragoza: Acribia, 1976. 512p.
- FRONING, G.; IZAT, A.; RILEY, G.; MAGWIRE, H. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods: Eggs and egg products*. 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1996. p.857-873.
- HAYES, P.R. *Microbiología e higiene de los alimentos: El huevo de gallina y su alteración*. Zaragoza: Acribia, 1993. p.102-103.
- HITCHINS, A.D.; HARTMAN, P.A.; TODD, E.C.D. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods: Coliforms-Escherichia coli and its toxins*. 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1996. p.325-369.
- NASCIMENTO, M.R. & STAMFORD. T.L.M. Incidência de *Escherichia coli* O157:H7. *Rev. Higiene Alimentar*, São Paulo, v.14, n.70, p.32-35, 2000.
- NASCIMENTO, V.P.; SANTOS, L.R.; CARDOSO, M.O.; RIBEIRO, A.R.; SCHUCH, D.M.T.; SILVA, A.B. Qualidade Microbiológica dos produtos avícolas. In: SIMPÓSIO GOIÂNIO DE AVICULTURA, 2., 1996, Goiânia. *Anais*. Goiânia: 1996. p.13-17.
- PARDI, M.C.; SANTOS, I.F.; SOUZA, E.R.; PARDI, H.S. *Ciência, higiene e tecnologia da carne: Riscos microbiológicos da carne*, Goiânia: UFG, 1995. v.1, p.294-308.
- PARDI, H.S. Influência da comercialização na qualidade de ovos de consumo. Niterói, 1977. 73p. [Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Fluminense].
- RIEDEL, G. *Controle sanitário dos alimentos*. São Paulo: Loyola, 1987. 445p.
- SILVA, N. & JUNQUEIRA, V.C.A. *Métodos de análise microbiológica de alimentos*. Campinas: ITAL, 1995. 228p.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. *Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos*. São Paulo: Varala, 1997. 295p.
- SIQUEIRA, R.S. *Manual de microbiologia de alimentos*. Brasília: EMBRAPA, 1995. 159p.
- TOLEDO, A.; SOARES, P.C.; SAUKAS, T.N. Qualidade de ovos em natureza comercializados no município de Recife, PE. II Avaliação microbiológica. *Caderno Ômega da Universidade Federal Rural Pernambuco*, Série Veterinária, n.5, p.41-47, 1990.
- VANDERZANT, C. & SPLITTSTOESSER, D.F. *Compendium of methods for microbiological examination of foods*. 3.ed. Washington: American Public Health Association, 1996. 873p.

Recebido para publicação em 17/8/00