

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIA**

SILVIA CASSIMIRO BRASÃO

**BIOFILMES DE *Salmonella* Minnesota: FORMAÇÃO, INFLUÊNCIA
DA SUPERFÍCIE, INIBIÇÃO POR AGENTES QUÍMICOS E
IMPORTÂNCIA DO PERÍODO ENTRE TRATAMENTOS**

**UBERLÂNDIA
2017**

SILVIA CASSIMIRO BRASÃO

BIOFILMES DE *Salmonella* Minnesota: FORMAÇÃO, INFLUÊNCIA DA
SUPERFÍCIE, INIBIÇÃO POR AGENTES QUÍMICOS E IMPORTÂNCIA DO
PERÍODO ENTRE TRATAMENTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ciências Veterinárias da
Universidade Federal de Uberlândia, como
exigência parcial à obtenção do Título de
Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Saúde Animal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daise Aparecida Rossi

UBERLÂNDIA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

- B823b
2017 Brasão, Silvia Cassimiro, 1987
 Biofilmes de Salmonella Minnesota: formação, influência da
 superfície, inibição por agentes químicos e importância do período entre
 tratamentos / Silvia Cassimiro Brasão. - 2017.
 82 p. : il.
- Orientadora: Daise Aparecida Rossi.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
 Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
 Inclui bibliografia.
1. Veterinária - Teses. 2. Salmonelose - Teses. 3. Biofilme - Teses.
 4. Alimentos de origem animal - Contaminação - Teses. I. Rossi, Daise
 Aparecida. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-
 Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

BIOFILMES DE *Salmonella* Minnesota: FORMAÇÃO, INFLUÊNCIA DA
SUPERFÍCIE, INIBIÇÃO POR AGENTES QUÍMICOS E IMPORTÂNCIA DO
PERÍODO ENTRE TRATAMENTOS

Dissertação aprovada para a obtenção
do título de Mestre no Programa de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias, da
Universidade Federal de Uberlândia,
pela banca examinadora formada por:

Uberlândia, 28 de julho de 2017.

Prof^a. Dr^a. Daise Aparecida Rossi (Orientadora) – FAMEV/UFU

Prof^a. Dr^a.Déborah Santesso Bonnas– IFTM

Prof^a. Dr^a.Eliane Pereira Mendonça– FAMEV/UFU

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

SILVIA CASSIMIRO BRASÃO, nascida em 25 de fevereiro de 1987, na cidade de Uberaba-MG, é Médica Veterinária graduada, no ano de 2011, pela Universidade de Uberaba. Realizou três iniciações científicas durante a graduação, entre 2008 e 2011 em projetos de pesquisa envolvendo as áreas de parasitologia, hematologia, imunologia voltados a sanidade e produtividade de bovinos nelore, ainda mecanismos de reparação de úlceras de córnea com plasma rico em plaquetas homologado. Possui especialização em Diagnóstico Laboratorial nas áreas de Patologia Clínica e Veterinária Preventiva pela Universidade de Uberaba concluído em 2013 e Residência do Ministério da Educação em Medicina Veterinária Preventiva no Laboratório de Doenças Infectocontagiosas da Universidade Federal de Uberlândia concluída em 2015. Iniciou o Mestrado em Ciências Veterinárias, na área de Clínica Médica e Investigação de Agentes Etiológicos na Faculdade de Medicina Veterinária na Universidade Federal de Uberlândia em 2015, e foi bolsista por um ano e sete meses pela CAPES. Médica Veterinária concursada na Universidade Federal de Uberlândia desde outubro 2016.

"Fé, duas letras que podem mudar sua vida, acredite."

(Peter Pan / Walt Disney)

"Feliz o justo, porque tudo lhe vai bem.
Com efeito, colherá o fruto do seu procedimento."

(Isaías, 3,10)

Dedico essa dissertação aos meus exemplos de vida e base forte da minha caminhada, meus pais Leovaldo (Leo) e Silvéria (Nina), que sempre me estimularam a dar esse grande passo.

E ao meu marido Alex Eduardo e irmão Leonardo que estiveram comigo durante toda a caminhada, sendo meus fiéis escudeiros. E ao meu bebê que ainda esta recente em meu ventre, sendo meu segundo coração que me inspira a cada dia ser melhor.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, aos meus Santos Protetores e ao meu Anjo da Guarda por sua proteção e pela força vinda da Fé nos momentos mais difíceis que passei.

A minha Família, aos meus pais Leovaldo e Silvéria e ao irmão Leonardo por todo o amor, dedicação, educação, apoio e paciência que tiveram comigo, obrigada por sempre me incentivarem a realizar meus sonhos. Ao meu Marido Amigo Alex Eduardo, que várias vezes escutou minhas queixas, me auxiliou com atividades e foi paciente com as mudanças na nossa vida em busca do meu sonho, além de neste último mês me presentear com nosso sonho maior o nosso bebê. À minha afilhada e sobrinha, Bianca, que foi a alegria mais sublime e pura que ocorreu neste momento, trazendo tranquilidade ao meu coração e minha cunhada Jéssica que me presenteou com essa maravilha e tem sido atenciosa nestes dias. A minha concunhada Danielle, cunhado Leandro e sobrinha Júlia que se tornaram grandes conselheiros desse universo acadêmico e ombro amigo nos momentos de incertezas. Meu agradecimento especial a todos vocês Família e Marido pelas horas que ficaram ao telefone, na webcam e ao vivo, não me deixando desistir e me mostrando que sou capaz de chegar onde desejo, cada vitória o reconhecimento devido a vocês minha Fortaleza.

A minha amiga irmã de alma Naiara que mesmo distante sempre conseguiu dar suporte com dúvidas a respeito da indústria, fornecimento de material e ombro amigo de sempre. As amigas, Giovanna (Gi), Clebianne (Clebis), Renata Prado (Afilhada Querida) e Francesca (Tchesca) pelos momentos de descontração, sorrisos e afeto, que foram essenciais para amenizar os dias tensos nessa jornada.

A Professora Doutora Rosangela Ziech, Ana Paula Perin Universidade Federal do Paraná (UFPR), Palotina, e ao Professor Dr Deivid pelo auxílio acadêmico ao sanar dúvidas a respeito das cepas controle do biofilme e estatística.

A minha orientadora Daise, por ter aceitado me orientar na elaboração deste trabalho, sempre com alto astral recebendo tão bem no meu novo lar LABIO. E mesmo desempenhando muitas atividades, sempre me atendeu e ajudou. Ela foi meu exemplo de pessoa persistente, que não têm obstáculo grande demais para não ser ultrapassado.

A Grande Família LABIO, Marcelo, Phelipe, Sara, Newton, Jocasta, Priscila, Marcela, Héliida, e tantos outros que passaram pelo laboratório e deixaram um

pouco da sua contribuição. Seja desde a ajuda preparando um meio de cultura, lavando material, até os bons momentos de trabalho que me proporcionaram. Em especial Roberta, Eliane, Guilherme e Renata Prado que em todas as vezes que precisei de auxílio em técnicas, aparelhos e dúvidas em geral me ajudaram. A UFU que me deu todo o apoio estrutural para a realização deste projeto.

À Driene que gentilmente cedeu as cepas de *Salmonella* Minnesota para serem estudadas.

À FAPEMIG pelo auxílio financeiro e a CAPES pela concessão da bolsa. A todos que contribuíram de forma direta e indireta neste estudo.

Às professoras que aceitaram compor esta banca de defesa, Déborah e Eliane. Obrigada por se disponibilizarem a realizar a leitura, correções e avaliação deste trabalho.

Obrigada.

RESUMO

A principal causa da infecção humana por *Salmonella* spp. é a ingestão de alimentos de origem animal contaminados, com destaque para a carne de aves e seus derivados. Entre as salmonelas paratíficas mais isoladas de aves no Brasil, o sorovar Minnesota tem se destacado pela alta prevalência em amostras de frango. Porém, pouco se conhece sobre a real importância deste sorovar em saúde pública, e até o momento, são poucos os relatos deste sorotipo como responsável por surtos de salmonelose humana no mundo. O biofilme representa uma importante fonte de contaminação de alimentos que pode estar presente em vários pontos da cadeia de processamento da carne de frango, e assim, pode ser uma das causas da perpetuação de *S. Minnesota* nas plantas de abate. A dissertação foi fracionada em três capítulos, sendo o primeiro referente às considerações gerais dos tópicos abordados nos demais capítulos. O segundo capítulo investigou 29 cepas de *S. Minnesota*, isoladas na cadeia de produção de duas indústrias avícolas com ciclo completo de produção, durante o período de 2009 a 2014. Nas cepas foram determinados: a capacidade de formar biofilmes, a presença de genes específicos relacionados a estas comunidades e a disseminação das cepas por meio da similaridade genética. No terceiro capítulo, selecionou-se três das 29 cepas de *S. Minnesota* por serem distintas filogeneticamente na tipagem molecular e na classificação tradicional de biofilme. Nessas, foram avaliadas a formação de biofilmes em materiais comumente utilizados na indústria, tais como polipropileno, poliuretano e aço inoxidável, antes e após o tratamento com agentes sanitizantes: hipoclorito de sódio 1% e ácido peracético 0,8%, e ainda, determinar se após estes tratamentos, em ambiente favorável, há recuperação do micro-organismo viável.

Palavras-chave: *adrA*. *csgD*. Higienização. *luxS*. RAPD. Salmonelose.

ABSTRACT

The main cause of human infection with *Salmonella* spp. is the ingestion of contaminated food of animal origin, with emphasis on poultry meat and its derivatives. Among the most isolated paratyphoid *Salmonella* in Brazil, the serovar Minnesota has been noted for its high prevalence in chicken samples. However, little is known about the real importance of this serovar in public health, and to date, there are few reports of this serotype as responsible for outbreaks of human salmonellosis worldwide. Biofilm represents an important source of food contamination that may be present at various points in the chicken meat processing chain, and thus may be one of the causes of *S. Minnesota*'s perpetuation in slaughter plants. The dissertation was divided in three chapters, the first referring to the general considerations of the topics covered in the other chapters. The second chapter investigated 29 strains of *S. Minnesota* isolated in the production chain of two poultry industries with complete production cycle during the period from 2009 to 2014. In the strains were determined the ability to form biofilms, the presence of specific genes related to these communities and the dissemination of strains through genetic similarity. In the third chapter, three of the 29 *S. Minnesota* strains were selected considering their phylogenetically distinction in molecular typing and in the traditional biofilm classification. In these, the formation of biofilms in materials commonly used in industry, such as polypropylene, polyurethane and stainless steel, were evaluated before and after treatment with sanitizing agents: 1% sodium hypochlorite and 0.8% peracetic acid, and to determine if after these treatments in a favorable environment, there is recovery of the viable microorganism.

Keywords: *adrA*. *csgD*. Sanitation. *luxS*. RAPD. *Salmonellosis*.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

- Tabela 1.** Sequência 5' – 3' dos *primers*, tamanho do fragmento e referência utilizados para a identificação dos genes *csgD*, *adrA* e *luxS* em cepas de *S. Minnesota*. 44
- Tabela 2.** Classificação de biofilmes de cepas de *S. Minnesota* isoladas nos anos de 2009 a 2014 em duas empresas abatedouras de aves, de acordo com o Índice de Formação de Biofilmes. 45
- Tabela 3.** Contagens médias (Log UFC) após adesão e formação de biofilmes por 29 cepas de *S. Minnesota* isoladas nos anos de 2009 a 2014 em duas empresas abatedouras de aves localizadas nos estados de Minas Gerais e São Paulo. 45

CAPÍTULO 3

- Tabela 1.** Identificação e classificação dos biofilmes produzidos por três isolados de *S. Minnesota* filogeneticamente distintas isoladas em duas empresas brasileiras durante os anos de 2009 a 2014. 70
- Tabela 2.** Classificação de biofilmes (DO600 nm) de três cepas de *S. Minnesota* isoladas em duas empresas brasileiras durante os anos de 2009 a 2014, produzidos em superfícies de aço inoxidável, poliuretano e polipropileno. 70
- Tabela 3.** Contagens médias de biofilmes por cepas de *S. Minnesota* isoladas em duas empresas durante os anos de 2009 a 2014, produzidos nas superfícies de aço inoxidável, poliuretano e polipropileno. 70
- Tabela 4.** Contagens médias (log UFC) de biofilmes de *S. Minnesota* isoladas em duas empresas brasileira durante os anos de 2009 a 2014 (fraco, moderado e forte), em superfícies de aço inoxidável (AI), poliuretano (PU) e polipropileno (PP) após 15 minutos de contato 71

com sanitizantes.

Tabela 5. Contagens médias (log UFC) de biofilmes de *S. Minnesota* 71
formados em diferentes superfícies tratadas com ácido peracético
0,8%, antes e após reincubação por 24 horas.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Dendograma gerado por análise computadorizada (Gel Compare II) 46
de perfis de DNA de cepas de *S. Minnesota*, baseado na técnica
RAPD-PCR. A análise foi realizada pelo método de Dice/UPGMA
(parâmetro de tolerância de 1,0%, homologia $\geq 80\%$).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Al: Aço inox

Als: auto - indutores

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APPCC: Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle

ATCC: *American Type Culture Collection*

BHI: Caldo infusão de cérebro e coração

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

dNTPs: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DO: Densidade óptica

DOc: Densidade óptica do controle

DTAs: Doenças Transmitidas por Alimentos

EFSA: *European Food Safety Authority*

EPS: matriz extracelular polimérica

EUA: Estados Unidos da América

FAO: *Food and Agriculture Organization*

FIOCRUZ: Fundação Instituto Oswaldo Cruz

FSA: Food Standards Agency

H₂O: Água

ISO: *International Organization for Standardization*

Kb: Kilobase

LABIO: Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada

LPS: lipopolissacarídeos

mA: Miliampère

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MgCl₂: Cloreto de Magnésio

mm: Milímetro

mM: Milimolar

NaCl: Cloreto de sódio

ng: Nanograma

nm: Nanômetro

OIE: *World Organization for Animal Health*

OMS: Organização Mundial de Saúde

pb: pares de base

PBS: Tampão fosfato – salino

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

pH: Potencial Hidrogeniônico

pmol: Picomol

PP: Polipropileno

PRP: Programa de Redução de Patógenos

PU: Poliuretano

QS: *quorum –sensing*

RAPD: *Random Amplified Polymorphic DNA*

RASFF: *Rapid Alert System for Food and Feed*

rpm: rotações por minute

SM: *Salmonella* Minnesota

SINAN: Sistema de Informação de Agravos de Notificação

TBE: Tris/Borato/EDTA

TSA: Agar Triptona de Soja

TSB: Caldo Triptona de Soja

U: Unidade

UE: União Europeia

UFC: Unidades Formadoras de Colônias

UPGMA: *Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean*

UV: Radiação Ultravioleta

V: Voltagem

VNC: viáveis não cultiváveis

W: Watt

WHO: *World Health Organization*

µg: Micrograma

µl: Microlitro

µm: Micrômetro

XLD: Ágar de desoxicolato-lisina-xilose

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS	18
1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivos Específicos	22
3 REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1 <i>Salmonella</i> spp. e <i>S. Minnesota</i>	24
3.2 Biofilmes	26
3.3 Consequências da adesão microbiana na indústria alimentar	29
3.4 Higiene e sanitizantes na indústria alimentar	30
3.5 Tipagem molecular por RAPD-PCR	32
 CAPÍTULO 2 – Caracterização de biofilmes de <i>S. Minnesota</i> de origem avícola	 34
 CAPÍTULO 3 – Ação de sanitizantes em biofilmes de <i>Salmonella Minnesota</i> formados em diferentes tipos de superfícies	 47
 REFERÊNCIAS	 72

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

Os representantes do gênero *Salmonella* se destacam entre os principais agentes causadores de infecções alimentares no Brasil e no mundo (BRASIL, 2015; EFSA, 2014; CDC, 2016). Entre os alimentos envolvidos em casos e surtos por *Salmonella* na União Européia, Estados Unidos e outros países em que há vigilância ativa, o consumo de alimentos origem animal, principalmente a carne de frango é a mais importante fonte de infecções para os humanos (LANDÍNEZ, 2013; EFSA, 2015; CDC, 2015; MILAN, TIMM, 2015; CDC, 2016).

Em estudo desenvolvido no Brasil no período de 2008 a 2010, o gênero se destacou entre os mais notificados em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) no estado de São Paulo. O sorovar *S. Enteritidis* foi responsável por 17 surtos (4,6%) e *Salmonella* spp. por 13 (3,6%) (De OLIVEIRA, 2013). Um estudo mais abrangente publicado pelo Ministério da Saúde apontou que dentre os agentes etiológicos responsáveis pelos surtos de DTA, no período de 2000 a 2015, o gênero *Salmonella* foi o agente mais prevalente, responsável por 14,4% dos surtos notificados (BRASIL, 2015). Entre 2007 e 2016 o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) notificou 6.632 Surtos de DTAs no Brasil, sendo 90,5% deles provocados por bactérias e *Salmonella* spp o agente mais prevalente quando foi possível a identificação do agente etiológico (BRASIL, 2016). Nos Estados Unidos (EUA), este patógeno também foi citado pelo amplo envolvimento em DTAs, representando 40% dos casos registrados no ano de 2012, seguido por *Campylobacter*, com 35% (CDC, 2014).

Salmonella enterica subsp. enterica é constituída por mais de 2400 sorotipos. Desses, menos de 100 estão envolvidos em casos de salmonelose humana (POPOFF; BOCKEMÜHL; GHEESLING, 2004).

Entre as salmonelas paratíficas mais isoladas de aves no Brasil, o sorovar Minnesota tem se destacado pela alta prevalência em amostras de frango. Voss-Rech et al. (2015) demonstrou a emergência deste sorovar no país, o qual foi o mais prevalente, representando 40,24% dos isolamentos, seguido de *S. Infantis* (14,63%) e *S. Heidelberg* (7,31%). Na Bélgica, CODA-CERVA (2014) relatou aumento representativo na ocorrência deste sorovar em frangos de corte no país, que se tornou o segundo sorotipo mais comumente isolado neste alimento, passando de 2% em 2009 para 17,6% em 2012.

Na avaliação de alimentos para consumo humano, com exceção de carcaças de frangos, é exigida a ausência de *Salmonella* spp. em 25g (BRASIL, 2001). Assim, mesmo com o pouco conhecimento do envolvimento de *S. Minnesota* nos casos de salmonelose humana, o aumento no número de isolamentos leva à impacto nas empresas beneficiadoras de frango de corte, tornando importante investigar os fatores que contribuem para a sua presença no ambiente e alimentos, assim como de métodos para o seu controle.

Uma importante forma de as bactérias se perpetuarem no ambiente é sua associação em biofilmes, onde permanece na forma séssil, que é considerada uma estratégia para sua persistência. Vários fatores influenciam na associação das bactérias nessas comunidades, incluindo o tipo de superfície e suas imperfeições, o tempo de contato, os agentes químicos utilizados na higienização e o período entre higienizações (CHORIANOPOULOS et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009; PUI et al., 2011; TANG et al., 2012; KARACA et al., 2013; CORCORAN et al., 2014; De OLIVEIRA et al., 2014; SILVA et al., 2014; VIVIAN, 2014; ZIECH et al., 2016). A produção de biofilmes por micro-organismos patogênicos é considerada uma estratégia de sobrevivência em ambientes desfavoráveis e, portanto, um fator de virulência (MILAN; TIMM, 2015).

Para a indústria cárnea, a formação de biofilmes gera prejuízos, pois sua presença determina o descarte do alimento contaminado ou diminui sua vida útil de prateleira. Quando nessas comunidades as bactérias apresentam uma maior resistência aos sanitizantes, isso desencadeia o uso de agentes químicos em maior concentração ou em espaços de tempo reduzido, que resultam em aumento dos processos corrosivos nos equipamentos, tempo na jornada laboral de colaboradores e paradas na produção para sua eliminação do ambiente (VIANA, 2006; ROSADO, 2009).

O alto índice de isolamentos de *S. Minnesota* na cadeia produtiva avícola (FREITAS, 2011; CODA-CERVA, 2014; VOSS-RECH et al., 2015) alerta para a capacidade intrínseca deste sorovar em se adaptar às condições do ambiente, seja na granja ou no abatedouro, e assim se fixar às superfícies, tornando estes locais pontos constante de contaminação.

Diversos estudos demonstram que *Salmonella* spp é capaz de aderir e formar biofilme em superfícies tais como plástico (poliestireno, polietileno e polipropileno), lona (poliuretano) e aço inoxidável, que são comumente usados na indústria de

processamento e manipulação de alimentos (JOSEPH et al., 2001; CHMIELEWSKI; FRANK, 2003; MACHADO, 2007; STEENACKERS et al., 2012; MILAN, TIMM, 2015).

Assim, são necessários estudos que demonstrem a influência das superfícies na formação de biofilmes por *S. Minnesota* e quais os agentes químicos são mais indicados para o seu controle. Ensaio baseados em características fenotípicas têm sido utilizados para a avaliação da formação destas comunidades, sendo o mais citado na literatura a avaliação de biomassa em microplacas de poliestireno com a quantificação de células vivas e mortas (RODRIGUES et al., 2009; DÍEZ-GARCÍA et al., 2012; LIANOU e KOUTSOUMANIS, 2012; WANG et al., 2013).

Quanto aos agentes químicos utilizados para higienização das indústrias, há no mercado várias opções. Entre eles, compostos clorados, detergente alcalino, detergente neutro, amônia quaternária, ácido peracético e clorexidina (JAENISCH; KUCHIISHI; COLDEBELLA, 2010; MACHADO et al., 2010; COLLA et al., 2012). Porém, não há estudos específicos que verifiquem a ação destes agentes em biofilmes de *S. Minnesota* e sobre a influência do tipo de superfície na formação das comunidades formadas por esse sorovar.

Entender a características genotípicas de *S. Minnesota* que conferem maior adaptação ambiental relacionado à formação de biofilmes, a disseminação das cepas e os fatores que propiciam sua formação, como o tipo de superfície e os agentes químicos mais adequados para sua remoção, subsidiam a implantação de ações para o seu controle. Tal compreensão permite também sugerir melhores opções para higienização das indústrias, evitando assim a contaminação das plantas e, conseqüentemente, dos alimentos produzidos, sendo este o objetivo fundamental da indústria avícola, diante de um consumidor mais consciente e também de importadores cada vez mais exigentes.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Determinar em *S. Minnesota* isoladas na cadeia de produção avícola: sua similaridade genética, a capacidade de produzir biofilmes, a presença de genes específicos relacionados à formação destas comunidades, os agentes químicos utilizados para a remoção e a disseminação das cepas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar em cepas de *S. Minnesota* isoladas na cadeia de produção avícola:

- a similaridade genética utilizando a técnica de RAPD-PCR;
- a capacidade de formar biofilmes em microplacas de poliestireno classificando-as como fracas, moderadas e fortes;
- a presença dos genes *csgD* , *adrA* e *luxS*, relacionados à formação de biofilmes;
- quantificação da biomassa e das células viáveis em biofilmes formados em poliuretano, poliestireno e aço inoxidável;
- utilizar um ensaio de viabilidade celular para verificar a eficiência do contato por 15 minutos dos sanitizantes hipoclorito de sódio 1% e ácido peracético 0,8% na inibição dos biofilmes;
- determinar se após o tratamento dos biofilmes com os agentes químicos há recuperação de células viáveis quando os mesmos são submetidos a condições nutricionais e ambientais favoráveis por 24h;
- a partir dos resultados encontrados sugerir alterações nos planos de higienização das indústrias.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Salmonella* spp e *S. Minnesota*

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*. São bacilos Gram-negativos, não formadores de esporos, aeróbicos ou anaeróbicos facultativos. Possuem como condições ótimas de crescimento a temperatura de 37°C e o pH próximo a neutralidade (D'AOUST; MAURER, 2007). A maioria dos sorovares com importância para a saúde pública são móveis, oxidase negativa, catalase positiva, reduzem nitrato a nitrito e são vermelho de metila positivas. Fermentam a glicose com produção de ácido e gás, não fermentam a lactose e a sacarose, produzem H₂S, não produzem indol ou hidrolisam ureia e descarboxilam lisina e ornitina. Fermentam o dulcitol, não utilizam o malonato e a maioria dos sorotipos utiliza o citrato como fonte de carbono (SILVA et al., 2007).

O gênero é constituído pelas espécies *S. bongori* e *S. enterica*, esta última espécie com seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houstenae* e *indica*, que de acordo com o perfil antigênico agrupam mais de 2400 sorotipos (POPOFF; BOCKEMÜHL; GHEESLING, 2004).

Salmonella é um dos mais importantes patógenos zoonóticos transmitido pelos alimentos. Esses micro-organismos causam enfermidades de gravidade variada em humanos e animais, que resultam em custos médicos elevados e prejuízo às indústrias produtoras (LEE et al., 2015).

Entre os alimentos envolvidos em casos de surtos por *Salmonella* na União Européia, Estados Unidos e outros países em que há vigilância ativa, o consumo de alimentos origem animal, principalmente a carne de frango, é a mais importante fonte de infecções aos humanos (LANDÍNEZ, 2013; EFSA, 2015; CDC, 2015; MILAN, TIMM, 2015; CDC, 2016).

No Brasil, *Salmonella* é o agente etiológico mais prevalente em surtos alimentares oficialmente notificados em que há identificação do micro-organismo (BRASIL, 2016).

Dados publicados pela Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar do Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (DDTHA-CVE-SESSP) demonstraram a ocorrência de 459 surtos de diarreia com etiologia identificada, no período de 1999 a 2003. Destes, 325

episódios (70,8%) foram causados por bactérias, sendo 140 (43,1%) atribuídos à *Salmonella* spp (DDTHA, 2005). No mesmo estado, entre 2008 a 2010, o gênero se destacou entre os mais notificados, com o sorovar *S. Enteritidis* responsável por 17 surtos (4,6%) e *Salmonella* spp. por 13 (3,6%) (De OLIVEIRA, 2013).

Dados oficiais do Ministério da Saúde demonstram que entre os agentes etiológicos responsáveis pelos surtos de DTAs no período de 2000 a 2015, *Salmonella* foi o agente mais prevalente, responsável por 14,4% dos surtos notificados (BRASIL, 2015). Já no período entre 2007 e 2016, o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) notificou 6.632 Surtos de DTAs, sendo 90,5% deles provocados por bactérias e *Salmonella* spp. o agente mais prevalente quando foi possível a identificação (BRASIL, 2016).

Nos Estados Unidos este patógeno também foi citado pelo amplo envolvimento em DTAs, representando 40% dos casos registrados no ano de 2012, seguido por *Campylobacter*, com 35% (CDC, 2014). Também em 2015, *Salmonella* foi o micro-organismo de maior ocorrência em alimentos de origem animal contaminados, com destaque para o consumo da carne de aves que contribuiu com 6,5% dos casos e a carne de peru com 4,6% (CDC, 2016).

De acordo com Muniz (2014), *Salmonella* está ligado às aves desde os primórdios da produção avícola, sendo sua epidemiologia e controle complexos e relacionados a vários fatores como o sorovar, hospedeiro, ambiente e características geográficas.

Salmonella enterica subsp. *enterica* sorovar Minnesota foi isolada pela primeira vez, em 1936, em um peru de uma granja no estado de Minnesota nos EUA (EDWARDS; BRUNER, 1938).

Há constante alteração entre os sorovares de *Salmonella* mais isolados no Brasil e no mundo, assim como naqueles mais envolvidos com saúde pública. (FINSTAD et al., 2012). Atualmente, *S. Minnesota* tem trazido preocupação pelo aumento no número de isolamentos na cadeia de produção de carne de aves (FREITAS, 2011; CODA-CERVA, 2014; VOSS-RECH et al., 2015) e pelo fato de pouco se conhecer sua sobre seu potencial zoonótico. Somente no ano de 2013 ocorreu o primeiro relato do envolvimento deste sorovar como responsável por urosepse em um paciente imunodeprimido pela síndrome de Crohn's (STEINEBRUNNER et al., 2013). Porém, este relato isoladamente, principalmente

por tratar-se de paciente imunocomprometido, não permite estabelecer sua importância em saúde pública.

Freitas (2011) aplicou a técnica de ribotipagem para identificação de cepas de *Salmonella* provenientes de frangos de corte no Brasil no período de 2009 a 2010. Constatou que *S. Minnesota* foi o segundo sorovar mais identificado em amostras de origem avícola, evidenciando que este sorovar vem ocupando espaço entre os principais isolados de aves no Brasil.

No ano de 2012 distintos sorovares de *Salmonella* isolados de carne de frango importada do Brasil foram reportados na Europa, sendo os mais identificados: *S. Heidelberg* seguida de *S. Minnesota* (RASFF, 2012). No banco de dados do Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF) há relato de três identificações de *S. Minnesota* no ano de 2017 em amostras de carne de frango brasileiras. Uma cepa foi identificada na Eslováquia em peito de frango salgado congelado e duas cepas foram isoladas na Alemanha em amostras de filetes de peitos de frangos congelados, sendo um salgado e outro natural (RASFF, 2017a; RASFF, 2017b).

Voss-Rech et al. (2015) demonstraram a emergência de *S. Minnesota* no Brasil, o qual foi o sorovar mais isolado de swabs de arrasto em propriedades de frango de corte, representando 40,24% dos isolamentos, seguido de *S. Infantis* (14,63%) e *S. Heidelberg* (7,31%). Na Bélgica, o Centro de Pesquisa de Veterinária e Agronomia (CODA-CERVA) demonstrou um aumento representativo na ocorrência deste sorovar em carnes de frangos de corte no país, que se tornou o segundo sorotipo mais comumente isolado neste alimento, passando de 2% em 2009 para 17,6% em 2012 (CODA-CERVA, 2014).

De acordo com Pickler et al. (2014), salmonelas paratíficas, como *S. Minnesota* não causam sinais clínicos nas aves, porém persistem no intestino destas, fator que favorece sua disseminação na cadeia produtiva.

Apesar da pouca evidência entre associação de *S. Minnesota* com doença nas aves ou em saúde pública, a presença de representantes deste gênero bacteriano na carne é indesejável e interfere na relação comercial entre os países, podendo levar até mesmo à interdição do alimento exportado (BACK; ISHIZUKA, 2010).

3.2 Biofilmes

Flach, Karnopp e Corção (2005) definem biofilmes como agregados de micro-organismos embebidos em uma matriz polimérica e aderidos a uma superfície sólida, formando uma estrutura porosa e altamente hidratada contendo exopolissacarídeos e pequenos canais por entre as micro colônias. Donlan e Costerton (2002) propõem que biofilmes foram a primeira forma de vida comunitária registrada no planeta e estima que a maioria dos micro-organismos na terra possam se organizar nesse formato.

Já Shirliff, Mader e Camper (2002) e Harrison, Turner e Ceri (2005) descrevem biofilmes como comunidades multicelulares aderidas a uma superfície biótica ou abiótica circundadas por uma matriz polimérica extracelular EPS (Extracellular Polymeric Surface) secretada pelas próprias bactérias.

No ambiente, a bactéria é encontrada na forma planctônica (livre), mas quando em biofilmes, que é considerada uma estrutura de persistência microbiana, adquire a forma séssil que é imóvel.

Este tipo de organização não é necessariamente um fator de virulência, uma vez que muitos micro-organismos não patogênicos os produzem. No entanto, biofilmes formados por patógenos parecem facilitar a sobrevivência desses no ambiente e no hospedeiro (HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2005). Assim, a associação nestas comunidades são reconhecidas como um fator que pode contribuir com os surtos de toxi-infecções alimentares (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003; MAIJALA; RANTA; SEUNA, 2005; STEENACKERS et al., 2012).

Especialistas sugerem que a maioria dos surtos, cujos agentes etiológicos são transmitidos por alimentos, parece estar associada a biofilmes. Justificam tal teoria pelo fato dos surtos serem esporádicos e não contínuos, assim como somente algumas porções dos produtos estarem contaminadas, consequência do desprendimento intermitente dos micro-organismos dos biofilmes, que é dependente do período entre higienizações e outros fatores (ZOTTOLA, 2001; KASNOWSKI et al., 2010).

Quando *Salmonella* encontra-se em biofilmes está mais protegida contra agressões ambientais, fato que dificulta a sua eliminação e favorece sua adaptação em ambientes com diferentes fatores de estresse, entre eles, a exposição a antibióticos e sanitizantes (BURMOLLE et al., 2010; STEENACKERS et al., 2012).

A formação de biofilmes pela aderência de *Salmonella* spp. a superfícies e utensílios na indústria alimentar pode ocorrer em diferentes tipos de materiais abióticos como plástico, borracha, vidro, aço inoxidável, entre outros. O problema se amplifica se houver presença de matéria orgânica, longo período entre as higienizações e imperfeições nas superfícies (CHORIANOPOULOS et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009; PUI et al., 2011; TANG et al., 2012; KARACA; AKCELIK; AKCELIK et al., 2013; CORCORAN et al., 2014; De OLIVEIRA et al., 2014 ; SILVA et al., 2014 ; VIVIAN, 2014; ZIECH et al., 2016).

Estudos prévios com *S. Enteritidis* demonstraram a formação de biofilmes *in vitro* com o uso de meios de cultura comerciais ricos em nutrientes como o caldo LB (Luria Bertani) em temperatura ambiente (28°C), onde produziram uma película na interface ar-caldo cuja matriz é composta principalmente por fímbrias curli e celulose (ZOGAJ et al., 2000; SOLANO et al., 2002).

Existem quatro componentes imprescindíveis na formação de biofilmes por *Salmonella*: possuir fímbrias Curli (fímbrias agregativas finas), produzir celulose, polissacarídeos capsulares e lipopolissacarídeos (LPS) (CORCORAN, 2013). A transcrição das fímbrias Curli é ligada à biossíntese de celulose e resulta na produção da matriz extracelular e em fortalecimento das ligações entre as células e a superfície (RÖMLING et al., 2000; ZOGAJ et al., 2000).

A expressão das fímbrias Curli é controlada pelo gene *csgD* (gene da subunidade Curli), e após a deleção do mesmo, a bactéria perde a capacidade de produzir a matriz (RÖMLING et al. 2000; GERSTEL; RÖMLING, 2003). A produção de celulose é regulada pelo gene *adrA* (SOLANO et al., 2002) e co-regulada pelo gene *csgD* (GERSTEL; RÖMLING et al., 2003). A expressão destes genes *csgD* e *adrA* formam a matriz dos biofilmes, ou a matriz polimérica extracelular (GERSTEL; RÖMLING, 2003). Porém, somente possuir genes específicos para a formação e sinalização dos biofilmes como *csgD* e *adrA*, não permite afirmar que as estirpes de fato, formem biofilmes, sem uma observação das condições ambientais necessárias para sua expressão (MONDS; O'TOOLE, 2009).

Já o polissacarídeo capsular é relacionado à persistência bacteriana no ambiente, e diferentemente das expressões dos genes *csgD* e *adrA*, não está relacionado ao arranjo estrutural dos biofilmes (GIBSON et al., 2006). Porém mesmo tendo este papel importante na formação de biofilmes, o mesmo não é fundamental

para a aderência de *S. enterica* em superfícies (STEENACKERS et al., 2012; CORCORAN, 2013).

Os lipopolissacarídeos (LPS) atuam na formação de biofilmes (CORCORAN, 2013) e quando há deleção de genes relacionados à sua expressão, o resultado é a queda ou perda total da habilidade de formação de biofilmes (KIM; WEI, 2009; CORCORAN, 2013).

Além dos genes *csgD* e *adrA*, estudos sugerem que *Salmonella* spp. possui um sistema de comunicação entre células (SMITH; FRATAMICO; NOVAK, 2004; AMMOR; MICHAELIDIS; NYCHAS, 2008) denominando *quorum sensing* (QS). Este sistema é responsável por importantes funções em vários processos fisiológicos, incluindo motilidade, formação do biofilme, expressão de genes de virulência e a colonização na célula hospedeira (YOON; SOFOS, 2008; BOYEN et al., 2009; PLUMMER, 2012).

O mecanismo de QS é dependente da liberação de moléculas sinalizadoras chamadas auto-indutores (AIs), que fazem com que as bactérias coordenem a expressão gênica e iniciem uma resposta a nível de população (KELLER; SURETTE, 2006; QUINONES et al., 2009).

O gene *luxS* está associado à síntese de um auto indutor denominado IA-2 (RAJAN et al., 2005), que são moléculas com potencial para reconhecer e incluir populações mistas no biofilme, além de permitir que uma espécie bacteriana emita sinais que são reconhecidos e geram resposta em outra espécie (XAVIER; BASSLER, 2003).

A influência do QS no controle da formação e desenvolvimento do biofilme já foi observada em *S. Typhi* (PROUTY; SCHWESINGER; GUNN, 2002) e *S. Enteritidis* (CAMPOS-GALVÃO, 2012). Em *Salmonella*, esse sistema utiliza o gene *luxS* para a síntese de AI-2 (SURETTE; MILLER; BASSLER, 1999; De KEERSMAECKER; SONCH; VANDERLEYDEN, 2006). Este auto indutor está envolvido na regulação de genes específicos para a formação de biofilme por *S. Typhimurium* (STEENACKERS et al., 2012) e utilizado para comunicação intra e interespecie (SCHAUDER; BASSLER, 2001; CHEN et al., 2002).

3.3 Consequências da adesão microbiana na indústria alimentar

A automação no processamento industrial da carne de aves faz com que o alimento permaneça em contato repetido com as superfícies, aumentando assim as oportunidades de transferência e ligação de *Salmonella* spp, favorecendo a formação de biofilmes (WANG et al., 2013).

A formação de biofilmes dentro da linha de produção eleva a carga microbiana e, muitas vezes, contamina os alimentos com patógenos que compõem a estrutura do biofilme, devido ao desprendimento de porções aderidas. Diante disto, podem colocar em risco a saúde do consumidor e a qualidade do alimento atuando como fonte crônica de contaminação (CAIXETA, 2008), podendo ainda fomentar prejuízos financeiros à indústria em decorrência da diminuição da vida de prateleira e dos gastos para sua eliminação.

O biofilme inicia-se na linha de produção com a adsorção de moléculas inorgânicas e orgânicas formando um filme condicionante. As proteínas das carnes manipuladas nas superfícies são exemplos de moléculas orgânicas neste ambiente. Posteriormente, ocorre a aproximação das células microbianas, as quais se aderem, podem resistir aos tratamentos com sanitizantes e se multiplicar (TONDO, 2011).

A fixação bacteriana e a posterior formação de biofilme em uma ampla gama de superfícies comumente utilizadas no processamento de alimentos, pode ocorrer em tempos de contato tão curtos como 20 minutos, dependendo do micro-organismo e das condições ambientais (LINDSAY; VON HOLY, 1997).

A higiene na indústria de alimentos é tema de constantes estudos e programas, uma vez que erros nos procedimentos de higienização permitem que os resíduos aderidos às superfícies e aos equipamentos transformem-se em potencial fonte de contaminação. Micro-organismos aderidos às superfícies interagem com estas e iniciam o crescimento celular, dando origem a colônias e formando agregados de massa celular contendo nutrientes, resíduos e outros micro-organismos, constituindo assim o biofilme (MILLEZI, 2012).

Existem vários fatores concernentes à formação de biofilmes, entre os quais se destacam as características físico-químicas do material sobre o qual estão aderidos e a expressão de fatores de virulência por parte dos micro-organismos, como a produção de cápsula exopolimérica e fímbrias (SANTOS, 2009). Nos materiais dotados de diferentes grupos funcionais em sua composição química, a

diferença do número de células aderidas ocorre por efeito da interação bactéria-superfície, a qual depende da hidrofobicidade e carga do material (KATSIKOIANNI; MISSIRLIS, 2004).

Salmonella spp. aderem número mais elevado em materiais mais hidrofóbicos (DONLAN; CONTERTON, 2002; SINDE; CARBALLO, 2000; CUNLIFFE et al., 1999). Entre os materiais de uso na indústria, o aço inoxidável AISI (American Iron and Steel Institute) 304 é reconhecido por ser um material hidrofílico, o qual é desfavorável para a formação de biofilme, enquanto o plástico, como polipropileno e a lona (poliuretano) são hidrofóbicos (DONLAN; CONTERTON, 2002; SINDE; CARBALLO, 2000).

3.4 Higiene e sanitizantes na indústria alimentar

Biofilmes são resistentes a processos de sanitização, que normalmente são letais às células planctônicas. Por isso, é necessário evitar a adesão de células livres a superfícies, fazendo um programa de higienização eficaz dentro da indústria alimentícia. De acordo com Van Houdt e Michiels (2010), a maior resistência a biocidas, observada para células em biofilmes pode ser decorrente da interferência da matriz EPS. Estas estruturas além de limitar a difusão dos sanitizantes, podem reagir e causar a inativação dos mesmos (VIDAL; RAGOT; THIBAUT, 1997), já que alguns agentes químicos podem ter sua ação reduzida ou mesmo eliminada na presença de compostos orgânicos (GILBERT; ALISSON; MCBAIN, 2002).

Sanitizar significa restringir micro-organismos de importância para a saúde pública a níveis considerados seguros, com base em parâmetros estabelecidos, sem acometer a qualidade do produto nem a sua segurança (FDA, 2017).

O teste oficial da eficiência de sanitizantes preconiza que para atenuar a contaminação de superfícies de contato com alimentos à um nível seguro é geralmente necessário que os agentes sejam capazes de reduzir em 99,999% as contagens dos micro-organismos (5 ciclos Log) em 30 segundos (AOAC, 2009). Porém, Møretrø et al. (2009) afirmam que quando trata-se de células aderidas como em biofilmes, este nível é alcançado quando há uma redução das células aderidas a uma superfície de pelo menos 4 ciclos Log.

Assim, a sanitização é reconhecida como sendo um procedimento indispensável para prevenir a formação de biofilmes. Quanto maior a biomassa do

biofilme, mais difícil será sua inativação ou remoção, sendo importante, portanto, que o método de sanitização seja capaz de reduzir o número das células livres e de prevenir sua adesão (MILLEZI et al., 2012).

Propõem-se três diferentes estratégias para prevenir a formação de biofilmes em superfícies: a) higienização imediata, antes do desenvolvimento do biofilme; b) uso de sanitizantes para eliminar células aderidas e, c) inibição da adesão de micro-organismos pela triagem de materiais de superfícies que não permitam facilmente a adesão ou agregação de nutrientes (MEYER, 2003).

Outro fator a se preocupar é a constante exposição das bactérias, em biofilme, a concentrações subletais de agentes sanitizantes. Os procedimentos de higienização nestas condições podem ativar os mecanismos de resposta adaptativa ao estresse das bactérias, fazendo com que elas sobrevivam em ambientes inóspitos (PEREIRA, 2014).

Apesar de todos os cuidados tomados nas indústrias pela adoção das boas práticas de fabricação (BPF), ainda assim a formação do biofilme é inevitável. Desta forma, identificar o patógeno e o intervalo de tempo que este leva para estabelecer no ambiente é primordial para a escolha de um método de higienização eficiente para a eliminação de biofilmes, de modo a garantir ao consumidor um produto seguro (GARCIA, 2015).

Inúmeros agentes químicos são empregados na higienização da indústria de carnes, sendo divididos em grupos conforme seu modo de ação: a) agentes oxidantes, como por exemplo, compostos a base de cloro, peróxido de hidrogênio e ácido peracético; b) compostos que atuam na superfície, que incluem a amônia quaternário e aniônicos, e c) iodóforos, que podem penetrar na parede celular, resultando no rompimento da estrutura proteica e de ácidos nucleicos (VAN HOUTT; MICHELIS, 2010).

O hipoclorito de sódio é um oxidante forte, eficaz e de baixo custo, sendo o sanitizante mais amplamente utilizado. Acarreta ampla mortalidade microbiana, pois danifica a membrana externa, provavelmente pela perda de controle de permeabilidade e eventual lise da célula (VENKOBACHAR; IYENGAR; RAO, 1977; VIRTO et al., 2005). Todavia, suas propriedades úteis são afetadas negativamente por diversos fatores, como por exemplo, pelo uso em superfícies contendo matéria orgânica e pelo pH do produto, que deve ser mantido entre 5 a 7 para garantir uma maior quantidade de ácido hipocloroso disponível. Para aplicações sem enxague, a

concentração máxima permitida de cloro disponível é de 200 ppm. Outro fator negativo para indústria alimentar é que provocam corrosão em metais, problemas de saúde humana como irritação da pele e danos na membrana mucosa, além de contaminação ambiental (PFUNTNER, 2011).

O ácido peracético é um sanitizante altamente ativo e eficaz, que funciona bem sob condições frias (aproximadamente 4°C) e em temperatura ambiente produz uma mortalidade aceitável de micro-organismos. Sua ação se dá pela ruptura de ligações químicas dentro da membrana celular (CREMIEUX; DAVIN-REGLI, 2000). Schmidt, 2003 afirma que em comparação ao hipoclorito é mais eficaz e ativo na remoção de biofilmes, provoca poucos danos ao ambiente, além de ser menos corrosivo para o equipamento. Sua eficácia pode ser reduzida, quando utilizado em superfície contendo matéria orgânica, perdendo sua atividade à medida que o pH se aproxima de neutro. Além disto, quando concentrado pode apresentar risco de segurança (SINDE; CARBALLO, 2000; SANCHEZ-RUIZ; MARTINEZ-ROYANO; TEJERO-MONZON;1995).

Na indústria de processamento e manipulação da carne avícola no Brasil, o hipoclorito de sódio tem sido bastante utilizado, por ser eficaz contra células aderidas a superfícies, e pelo baixo custo. O ácido peracético também bastante utilizado, graças ao composto não reagir com proteínas, não produzindo compostos tóxicos ou carcinogênicos, por causar menor impacto ambiental e por alguns estudos apontarem por ser o mais eficaz na remoção de biofilmes (HOLAH; THORPE, 1990; ROSSONI; GAYLARDE, 2000).

3.5 Tipagem molecular por RAPD-PCR

O RAPD (Randomly amplified polymorphic DNA) é caracterizado como uma técnica rápida que permite detectar polimorfismos genômicos, pelo uso de iniciadores de sequência curta. A eficácia, rapidez e flexibilidade do método de tipagem permite sua ampla utilização em estudos epidemiológicos (SOTO et al., 1999).

A técnica consiste metodologicamente na amplificação do DNA utilizando sequências de iniciadores ou *primers* escolhidos aleatoriamente, com baixa complementariedade ao DNA alvo. A reação sucede em condições de baixa específicas de maneira a permitir aos *primers* se anelarem em vários locais das duas

fitas do DNA, tendo assim inúmeros fragmentos amplificados, desvendando assim a diversidade genética entre os micro-organismos (MARTINEZ; TADDEI, 2008; QUINTAES et al., 2002).

Apesar não ser o padrão ouro para diferenciar as cepas relacionadas de *S. enterica*, essa metodologia permanece como uma ferramenta de análise válida para epidemiologistas, particularmente útil em países com recursos limitados voltados para saúde pública (VÁZQUEZ-GARCIDUEÑAS et al., 2014).

Turki et al. (2014) ao compararem cinco diferentes técnicas de análise filogenética (PFGE, RAPD, ERIC, ribotipagem e perfil plasmidial) em pesquisa de cepas de *Salmonella enterica* sorovar Kentucky, demonstraram um maior poder discriminatório para as técnicas de RAPD e ERIC. Os autores constataram que a rapidez, a simplicidade do processo aliados ao sucesso na rotina laboratorial referente ao elevado grau discriminatório, fazem dessas metodologias adequadas para a detecção de novas cepas, para a investigação epidemiológica e para a análise de diversidade genética.

Estudos que correlacionam cepas de mesma espécie utilizando ferramentas como o RAPD são de extrema importância na identificação de cepas semelhantes ao longo do processo produtivo de frangos, na constatação de perfis homólogos disseminados em locais distintos e na investigação da causa de surtos de origem alimentar. Permitindo avaliar o nível de disseminação do agente ao longo da cadeia produtiva de frangos e analisar os perfis circulantes no país (RESENDE, 2015).

O estudo de cepas de *Salmonella* ao longo do processo produtivo de frangos, de perfis genéticos semelhantes disseminados em diferentes locais e a investigação da causa de surtos de origem alimentar são importantes em estudos epidemiológicos, que utilizam como ferramenta o RAPD. (SOTO et al., 2000; DE CESARE et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2007; SMITH et al., 2011; REZK et al., 2012 ; NAWAR; KHEDR, 2014; TURKI et al., 2014; VÁZQUEZ-GARCIDUEÑAS et al., 2014).

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO DE BIOFILMES DE *S. Minnesota* DE ORIGEM AVÍCOLA

Artigo a ser publicado no periódico

Pesquisa Veterinária Brasileira

Caracterização de biofilmes de *S. Minnesota* de origem avícola¹

Silvia C. Brasão², Eliane P. Mendonça², Roberta T. Melo², Renata R. Prado², Guilherme P. Monteiro², Phelipe A.B.M. Peres², Daise A. Rossi².

ABSTRACT - Brasão S.C., Mendonça E.P., Melo R.T., Prado R.R., Monteiro G.P., Peres P.A.B.M., Rossi D.A. 2017. [Characterization of biofilms of *S. Minnesota* of poultry origin]. Caracterização de biofilmes de *S. Minnesota* de origem avícola. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Ceará s/n, Bloco 2D, sala 43, Bairro Umuarama, Uberlândia, MG, 38402-018, Brasil. E-mail: silvia.brasao@ufu.com.br

The aim of this study was to evaluate the formation of biofilms, the presence of *csgD*, *adrA* and *luxS* genes and the genetic similarity of 29 strains of *S. Minnesota* isolated from food and environmental samples in two poultry industries with complete production cycle during the years 2009 to 2014. The strains were classified as strong, moderate, weak or nonexistent for the production of biofilms by the analysis of the biomass and the sessile cells were quantified. Gene analysis was performed by the PCR technique and phylogenetic analysis by RAPD-PCR analysis. Among the strains, 28/29 (97.0%) presented the genes linked to the formation of biofilms (*adrA* and *csgD*) and 27 (93.0%) the *luxS* gene. Regarding biomass formation, 19/29 strains (66.0%) were able to form biofilms and classified as: weak 9/19 (47.0%); moderate 6/19 (32.0%) and strong 4/19 (21.0%). The quantification of the sessile cells showed differences with the classification of biomass indicating that not only the number of cells in biofilm influences its intensity, but also the amount of matrix produced. The mean counts after biofilm formation increased approximately 1 log cycle. In molecular typing *S. Minnesota* showed low genetic heterogeneity, six clonal groups with 100% homology and three clusters with homology above 80% were identified and therefore considered as of the same genotype. Only seven different genotypes were observed. The study was able to demonstrate the presence of *S. Minnesota* biofilm producers in broiler slaughterhouses, indicating that these communities may contribute to the persistence of this serovar throughout the production chain.

INDEX TERMS: Biofilm, RAPD-PCR, Salmonellosis.

RESUMO - Objetivou-se avaliar a formação de biofilmes, a presença dos genes *csgD*, *adrA* e *luxS* e a similaridade genética de 29 cepas de *S. Minnesota* isoladas de alimentos e amostras ambientais em duas indústrias avícolas com ciclo completo de produção durante os anos de 2009 a 2014. As cepas foram classificadas como forte, moderada, fraca e inexistente para a produção de biofilmes pela análise da biomassa e as células sésseis foram quantificadas. A análise dos genes foi realizada pela técnica de PCR e a análise filogenética por meio da análise RAPD-PCR. Dentre as cepas, 28/29 (97,0%) apresentaram os genes ligados à formação de biofilmes (*adrA* e *csgD*) e 27 (93,0%) o gene *luxS*. Quanto à formação de biomassa, 19/29 cepas (66,0%) foram capazes de formar biofilmes e classificadas quanto à intensidade como fracas: 9/19 (47,0%); moderadas 6/19 (32,0%) e fortes 4/19 (21,0%). A quantificação das células sésseis mostrou divergências com a classificação da biomassa indicando que não só o número de células em biofilme influencia em sua intensidade, mas também a quantidade de matriz produzida. A média de contagens após a formação dos biofilmes aumentou aproximadamente 1 ciclo Log. Na tipagem molecular *S. Minnesota* apresentou baixa heterogeneidade genética, sendo identificados seis grupos clonais com 100% de homologia e três *clusters* com homologia superior a 80%, sendo portanto, considerados como do mesmo genótipo. Foram observados apenas sete genótipos distintos. O estudo foi capaz de demonstrar a presença de *S. Minnesota* produtoras de biofilme em abatedouros de frangos de corte, indicando que estas comunidades podem contribuir para a persistência deste sorovar ao longo da cadeia de produção.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Biofilme, RAPD-PCR, Salmonelose.

¹ Recebido em

² LABIO – FAMEV – UFU . Rua Ceara s/n sala 43 . *Autor para correspondência: silvia.brasao@ufu.br
Aceito para publicação em

INTRODUÇÃO

A salmonelose destaca-se como uma das principais zoonoses que transmitidas pelos alimentos impactam a saúde pública. A maior fonte de infecção para os humanos é a ingestão de alimentos de origem animal contaminados, principalmente a carne de aves, ovos e seus derivados (TABO et al. 2013, CDC 2016, EFSA 2016, WHO 2016). Esta zoonose também tem influência na economia, já que a positividade em carcaças de frango e seus derivados é uma das principais barreiras sanitárias à sua exportação.

Existem poucos estudos específicos envolvendo *S. Minnesota*, pois geralmente são privilegiadas pesquisas em sorovares que comprovadamente impactam a saúde humana, como *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* como exemplos, por estarem mais envolvidos nas infecções alimentares (VAZ et al. 2010, PICKLER et al. 2012, EFSA 2015, CDC 2015). Assim, pouco se conhece sobre a real importância de *S. Minnesota* em saúde pública, e até o momento, não há relatos deste sorotipo como responsável por surtos de salmonelose humana no mundo (CDC 2016, EFSA 2015).

Porém, na avaliação de alimentos, em algumas situações, existem inadequações que consistem na positividade de *Salmonella* spp, não levando em consideração o sorovar. Isso torna as informações sobre prevalência, características, disseminação e potencial virulento de sorovares emergentes individualmente, importantes tanto para a saúde pública, como para a economia.

No Brasil e no mundo, alguns estudos tem demonstrando aumento nos isolamentos de *S. Minnesota* na cadeia avícola. Freitas (2011) demonstrou que no período de 2009 a 2010, *S. Minnesota* foi o segundo sorovar mais isolado em frangos de corte brasileiros e Voss-Rech et al. (2015) estabeleceu a emergência deste sorovar no país, que foi o mais prevalente, representando 40,24% dos isolamentos. Na Bélgica, CODA-CERVA (2014) relatou aumento representativo na ocorrência deste sorovar em frangos de corte, o qual foi o segundo sorotipo mais comumente isolado, passando de 2% em 2009 para 17,6% em 2012.

Vários fatores podem contribuir para a emergência de determinados sorovares de *Salmonella*. Entre eles, está o fato de não causarem sinais clínicos nas aves, favorecendo sua disseminação no ambiente e para outras aves (PICKLER et al. 2014). Outra situação é a capacidade de produzir biofilmes, que perpetua os micro-organismos no ambiente, que tornam-se então, fontes constantes de contaminação tanto no ambiente de criação das aves quanto nas plantas de abate (SCHERRER & MARCON 2016).

Uma vez associada a biofilmes, *Salmonella* está mais protegida contra agressões ambientais, fato que dificulta sua eliminação, pois se tornam mais tolerantes aos diferentes fatores de estresse, como o calor, frio e a ação de desinfetantes (BURMOLLE et al. 2010, STEENACKERS et al. 2012). A capacidade de associação de *Salmonella* nestas comunidades está relacionada a presença dos genes *csgD* e *adrA* e ao sistema de comunicação entre células *quorum sensing* (QS) (SMITH et al. 2004, AMMOR et al. 2008). Este sistema é responsável por importantes funções fisiológicas como a formação do biofilme, expressão de genes de virulência e colonização na célula hospedeira (YOON & SOFOS 2008, BOYEN et al. 2009, PLUMMER 2012). O mecanismo de QS em *Salmonella* spp utiliza o gene *lux S* para a comunicação intra e interespecie (De KEERSMAECKER et al. 2006, STEENACKERS et al. 2012).

O Brasil é o maior exportador e segundo maior produtor de frangos de corte do mundo (ABPA 2016), e isto faz com que haja constante necessidade da comprovação da inocuidade destes alimentos. Uma estratégia preventiva para garantir a qualidade é o monitoramento de *Salmonella* na cadeia de produção de alimentos, com identificação e caracterização de sorotipos emergentes, além de utilizar ferramentas que permitam entender sua disseminação e possíveis fontes de contaminação. Estas informações são importantes para basear medidas para o seu controle.

Assim, considerando o aumento no número de isolamentos de *S. Minnesota* em produtos avícolas e a falta de estudos sobre este sorovar, objetivou-se avaliar em estirpes provenientes da indústria avícola, a capacidade de formar biofilmes, a presença de genes específicos relacionados à sua formação e a disseminação das cepas por meio da análise filogenética.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado com 29 estirpes de *S. Minnesota* isoladas em duas indústrias avícolas distintas com ciclo completo de produção, localizadas nos estados de São Paulo (Indústria A) e Minas Gerais (Indústria B), Brasil, durante o período de 2009 a 2014. As plantas de abate possuíam serviço de inspeção federal e a carne produzida era exportada ou comercializada no mercado interno.

Os isolamentos foram realizados em amostras colhidas em todo o ciclo de produção, desde a granja até o produto final pronto para o comércio. *S. Minnesota* foi isolada de: suabes de pré abate (2), suabe de caminhão de ração (1), suabe de propé (4), suabe de caminhão do aviário (1), cortes cárneos (9), carcaça inteira (7), coração (1), pé (1), água de escaldagem (1), farinha de vísceras (1), farinha de penas (1).

Os isolados, previamente tipificados antígenicamente na Fundação Instituto Oswaldo Cruz no Estado do Rio de Janeiro (FIOCRUZ) foram enviados ao Laboratório de Biotecnologia Aplicada (LABIO) em culturas puras e devidamente identificadas quanto ao tipo de amostra em que foi isolada, data e local de isolamento.

Presença de genes específicos

Foram pesquisados os genes *adrA*, *csgD* e *luxS* envolvidos na produção de biofilme.

Para a análise, as cepas puras foram reativadas em um volume de 2mL de BHI (Difco®), incubadas por 24 horas, e após, centrifugadas a 14000 rpm /25°C/2 minutos para obtenção do *pellet*, o qual foi utilizado para extração do DNA bacteriano utilizando o kit comercial DNA Purification Kit (Promega®), de acordo com as instruções do fabricante.

A análise dos genes *adrA* e *csgD* foi realizada por PCR multiplex. A reação foi preparada em um volume final de 25µL, composto de: 3µL (30ng) de DNA, 12,5 µL de Taq Green (Promega®), 1 µL da mistura *forward* e *reverse* de cada *primer* a 10 pmol/µL (Invitrogen®) e 7,5µL de H₂O ultrapura (Promega®). No termociclador (Eppendorf®), as amostras foram submetidas inicialmente a desnaturação por 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, com extensão final a 72°C por 4 minutos.

A visualização do produto da PCR foi realizada em cuba de eletroforese (Loccus Biotecnologia®) por 90 minutos nas seguintes condições: voltagem 80 V, corrente elétrica 80 mA e potência 100 W, usando gel de agarose à 1,5% (Ludwig Biotec) em tampão de Ácido Bórico-Tris-EDTA 0,5X (TBE)(Invitrogen®), que foram revelados com Sybr Safe DNA Gel Stain (Invitrogen®). Os fragmentos de DNA foram comparados com marcadores de peso molecular de 100 pb (Ludwig Biotec) e visualizados em transiluminador UV (Loccus Biotecnologia®).

Para o gene *luxS* a reação foi preparada em um volume final de 25µL, composto de: 3µL (30ng) de DNA, 12,5 µL de Taq Green (Promega®), 1 µL da mistura *forward* e *reverse* do *primer* a 20 pmol (Invitrogen®) e 8,5µL de H₂O ultrapura (Promega®). No termociclador (Eppendorf®), as amostras foram submetidas inicialmente a desnaturação por 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de: desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 62°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 90 segundos, com extensão final a 72°C por 10 minutos.

A visualização do produto da PCR foi realizada em cuba de eletroforese (Loccus Biotecnologia®) por 120 minutos nas mesmas condições descritas anteriormente. Os fragmentos de DNA foram comparados com marcadores de peso molecular de 100 pb (Ludwig Biotec) e visualizados em transiluminador UV (Loccus Biotecnologia®).

Os *primers* utilizados para cada um dos genes estudados estão descritos na tabela 1. A cepa de referência de *S. Typhimurium* ATCC 14028 foi utilizada como controle positivo e água destilada ultrapura foi o controle negativo.

Produção de Biofilme

A capacidade de produzir biofilmes foi realizada de forma qualitativa e quantitativa.

A análise qualitativa foi realizada conforme recomendações de Naves et al (2008) e Kudirkiene et al (2012), com modificações. O teste foi realizado em placas de poliestireno de 96 poços (KASVI®), com inóculo padronizado para todas as cepas em aproximadamente 10⁷ UFC/mL (DO₆₀₀= 0,22 a 0,28) em meio Tryptic Soy Broth TSB (Merck®). Aliquotas de 200 µL de cada estirpe foram cultivadas em oito poços da microplaca, juntamente com oito controles negativos, composto apenas do meio de cultivo. As microplacas foram incubadas durante 24 horas a 37°C sob agitação (100 rpm), lavadas três vezes com solução de NaCl 0,9% e secas em estufa à 55°C por 50 min. A biomassa foi medida após fixação com violeta cristal 1% (LaborClin®) durante 5 min, seguido da eluição com solução álcool-acetona (80:20 v/v etanol- acetona) (Dinamica®). O material dissolvido foi removido de cada poço e colocado numa nova placa de microtitulação para leitura da DO₆₀₀ (DNM-9602 microplate reader Perlong®). Os ensaios foram feitos com oito réplicas para cada linhagem em três repetições.

A classificação da cepa quanto à capacidade de produzir biofilmes foi realizada de acordo com Stepanovic et al. (2000) a partir dos resultados da leitura da DO₆₀₀. Utilizou-se como ponto de corte (DOc), o valor médio da DO₆₀₀ equivalente a 0,044, obtido somando a média da densidade óptica dos controles negativos (que foi 0,007) ao valor do desvio padrão multiplicado por três (0,0124 x 3). A classificação dos biofilmes foi determinada da seguinte forma: a) inexistente: DO₆₀₀ ≤ 0,044, ou seja, menor que DOc; b) fraco: DO₆₀₀ >0,044 e ≤ 0,088, ou seja, até duas vezes maior que DOc; c) moderado: DO₆₀₀ >0,088 e ≤ 0,176, ou seja, entre duas a quatro vezes o valor de DOc e, d) forte: DO₆₀₀ >0,176, ou seja, maior que quatro vezes o valor de DOc.

Os testes quantitativos de adesão e biofilme foram realizados pela enumeração das células sésseis em UFC, que foram incubadas a 37°C por 2 horas para a adesão e 24 horas para a formação do biofilme. Os biofilmes foram formados nas mesmas condições descritas para o teste qualitativo com três réplicas por repetição, além dos controles negativo e positivo. Após, os poços foram lavados duas vezes com uma solução NaCl 0,9% estéril e a biomassa imersa em salina foi retirada por meio de raspagem dos poços durante 90 segundos. A suspensão celular obtida foi submetida a diluições decimais seriadas e semeada em placas de ágar Trypticase Soy Agar TSA (Merck®) pelo método de gota (MILLES& MISRA 1938, MACHADO, 2007), que foram incubadas a 37°C por 24 horas. As colônias foram contadas e multiplicadas pela recíproca da diluição para obtenção do número de UFC. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, em três ocasiões independentes.

Tipagem por RAPD-PCR

Para a análise gênica foi empregada técnica do *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD-PCR) utilizando o protocolo descrito por Oliveira et al. (2007). Foi utilizado o DNA previamente extraído e o *primer* descrito por Lin et al. (1996): P1254: (5' - CCGCAGCCAA - 3'). *S. Typhimurium* ATCC 14028 foi utilizada como controle.

A análise foi realizada a partir de um volume final de 25 µL contendo 2 µL de DNA na concentração de 50 ng/ µL, 2,5 µL de tampão 10x, 0,75 µL de 50 mM MgCl₂, 1,25 µL do *primer* a 10 pmol/µL, 0,25 µL de 20 mM do mix de dNTPs, 0,25 µL de Taq Platinum (50/µL) e 18,0 µL de H₂O ultrapura (Invitrogen®). A reação de PCR foi conduzida dentro das seguintes condições: 94°C por 5 minutos; 4 ciclos de: 94°C por 4 minutos, 35°C por 4 minutos, 72°C por 4 minutos; 30 ciclos de: 94°C por 1 minuto, 35°C por 1 minuto, 72°C por 5 minutos e extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os produtos amplificados nas reações RAPD foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% por 120 minutos nas condições já descritas anteriormente e utilizando-se o marcador de 100pb (Invitrogen®).

Análise dos resultados

Os resultados qualitativos e quantitativos obtidos nas análises dos biofilmes foram tabulados e sua normalidade verificada por meio do programa estatístico GraphPad Prism, versão 6.0101 (GraphPad Software, Estados Unidos). Para os dados quantitativos, os resultados foram transformados para Log₁₀ para posterior utilização na análise de variância (ANOVA) ou Kruskal-Wallis para os dados paramétricos e não paramétricos, respectivamente.

Os resultados dos genes de virulência foram analisados por meio de estatística descritiva, com cálculo das porcentagens.

Para a análise da similaridade genética entre as cepas utilizou-se análise computacional pelo Programa GelCompar II (Comparative Analysis of Electrophoresis Paattens), versão 1.5, Applied Maths Korthrijk, Belgium. Os perfis de bandas obtidos no gel foram considerados na análise e a matriz de similaridade foi obtida por comparação entre pares de cepas, usando o coeficiente de similaridade de Dice, adotando-se 1% de tolerância para o *primer* estudado. A construção do dendograma foi realizada pelo método UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 29 cepas de *S. Minnesota* analisadas, 28 (97,0%) apresentaram dois dos genes ligados à formação de biofilmes (*adrA* e *csgD*). A exceção cabe à cepa SM 07, isolada de farinha de penas no frigorífico localizado em Minas Gerais (B).

Resultados semelhantes foram observados por Baptistão et al. (2012) e De Oliveira et al. (2014) ao analisarem *Salmonella* spp isoladas de carcaças de frangos comercializadas em açougues e supermercados na região de Botucatu, São Paulo. Os autores encontraram positividade de 93% e 100%, respectivamente, para os genes *adrA* e *csgD*. Ziech et al. (2016) também detectaram a presença desses genes em todas as cepas de *Salmonella* spp isoladas de esteiras transportadoras de salas de corte em plantas processadoras de aves no Paraná.

A presença dos genes *adrA* e *csgD* indicam que as cepas de *Salmonella* apresentam potencial para produzir biofilmes de forte intensidade, uma vez que estão ligados com a expressão da matriz de celulose e de um fator de aderência fimbrial, ambos envolvidos na integridade da estrutura sésil (Spiers & Rainey 2005).

O gene *luxS* foi identificado em 27/29 (93,0%) cepas estudadas. As duas cepas que não apresentaram esse gene foram SM 05, isolada de carcaça inteira no frigorífico localizado em Minas Gerais (B) e SM 79, de peito salgado, proveniente do frigorífico localizado em São Paulo (A).

O gene *luxS* está relacionado à produção de auto-indutores envolvidos no mecanismo de QS bacteriano, que são fundamentais para a maturação dos biofilmes (SMITH et al., 2004, AMMOR et al. 2008).

Apesar da importância da presença de genes envolvidos com a formação de biofilmes, a análise genotípica não é suficiente para caracterizar estas comunidades. Isto porque, esta forma de vida representa uma atividade social controlada por fatores genéticos aliados às condições ambientais, como temperatura, disponibilidade de nutrientes e atuação do sistema QS, que influenciam de forma decisiva na expressão da característica (KOLTER & GREENBERG 2006, MONDS & O'TOOLE 2009, CASTELIJN et al. 2012).

O ensaio fenotípico qualitativo identificou que 10/29 cepas (34,0%) não foram capazes de formar biofilme, 9/19 (47,0%) foram classificadas como produtoras de biofilmes de fraca intensidade, 6/19 (32,0%) foram moderadas e 4/19 (21,0%) fortes produtoras (Tabela 2).

O teste quantitativo de células sésseis mostrou que houve divergências entre ao número de bactérias em biofilme e sua classificação qualitativa no ensaio com Cristal-Violeta. Isso indica que a quantidade de matriz produzida pelas cepas, e que determina as distintas classificações, não foi proporcional aos resultados do teste

quantitativo. Logo, não só o número de células em biofilme influencia em sua intensidade, mas também a quantidade de matriz produzida.

A partir de um inóculo inicial constante ($p > 0,05$) em todos os ensaios, observou-se decréscimo nas contagens após período de duas horas (adesão) e aumento significativo após 24 horas, na formação de biofilme (Tabela 3).

A diminuição nas contagens no período de adesão, realizada após duas horas da inoculação, revela a dificuldade de manutenção e desenvolvimento da estrutura inicial do biofilme. Este resultado é esperado, já que esta é considerada uma fase de transição, de uma adesão reversível para irreversível. Alguns estudos indicam que a adesão irreversível de células bacterianas, como *Salmonella*, pode acontecer em um intervalo de minutos até horas, dependendo da estirpe (HOOD & ZOTTOLA 1995, SMOOT & PIERSON 1998, BOARI 2008, CHIA et al. 2009). Esse perfil de adesão mais lento pode também indicar uma menor capacidade de adquirir a forma sésil ou a necessidade de um período de contato mais prolongado com a superfície para levar à uma aderência futura mais forte.

A existência de cepas com potencial genético e fenotípico para produzir biofilmes na indústria corrobora com a hipótese de que sua persistência na cadeia de produção pode representar o principal problema de contaminação do produto final. De acordo com Van Houdt & Michiels (2010), os biofilmes de *Salmonella* spp representam reservatórios persistentes de contaminação, comprometendo a segurança alimentar e a saúde humana.

A análise de similaridade de *S. Minnesota* pelo dendograma demonstrou proximidade genética entre as cepas (Fig. 1). Foram detectados seis grupos clonais com 100% de homologia (1 a 6), três clusters com homologia superior a 80%, e, portanto considerados pertencentes ao mesmo genótipo (A, B, C), e sete genótipos distintos. Estes resultados evidenciaram a baixa heterogeneidade genética de *S. Minnesota*.

Os grupos clonais apresentaram em comum o fato de pertencerem à mesma indústria (A), com exceção do grupo 3, que englobou cepas de ambas as indústrias estudadas, demonstrando a disseminação do mesmo genótipo em diferentes regiões e anos distintos (2009 e 2014).

A propagação de genótipos desde o aviário até o abatedouro só não foi identificada para o grupo 2, composto de cepas isoladas somente na granja e no grupo 3, que englobou cepas isoladas somente durante o abate.

A persistência de clones de *Salmonella* ao longo do processamento em uma mesma empresa também foi relatada por Vestby et al. (2009) em estudo com vários sorovares de *Salmonella* na Noruega. Santos (2003) também detectou a presença de clones de *S. Enteritidis* de diferentes origens em uma indústria avícola do Rio Grande do Sul, no Brasil. Faria (2014) constatou que todas as cepas de *S. Minnesota* isoladas de amostras ambientais em diferentes lotes em uma empresa do estado de Mato Grosso do Sul apresentaram homologia filogenética maior que 85%.

A origem da contaminação por *Salmonella* pode ser tanto no ambiente do aviário quanto em locais próximos. Condições de higiene inadequadas, presença de insetos e roedores também são considerados como de risco para a manutenção destes micro-organismos na cadeia produtiva de frangos (Cardoso & Tessari 2008). Além disso, as condições ambientais dos aviários e abatedouros também podem contribuir para a presença e permanência dos genótipos, entre eles, a persistência em equipamentos como bebedouros e comedouros, falhas no processamento e a contaminação cruzada (Mead et al. 2000, Cardoso & Tessari 2008, Carrasco et al. 2012).

A associação de clones nas diferentes indústrias pode indicar a capacidade de difusão de *S. Minnesota*. A presença de cepas similares em diferentes regiões também foi registrada por Franco et al. (2015) ao analisar cepas de *S. Infantis* isoladas de carne de frangos nos períodos de 2011 a 2014.

Quanto às características genotípicas ligadas à presença dos genes relacionados à formação de biofilmes, identificou-se no grupo 3, duas cepas que não apresentavam o gene *luxS*, diferindo das demais do mesmo grupo clonal. Hilton et al. (1996) afirmam que embora os fragmentos de amplificação do DNA aparentemente tenham o mesmo peso molecular, estes não são necessariamente fragmentos idênticos, o que justifica a nomenclatura de clones com características distintas relacionadas à presença do gene *luxS*. Deve-se considerar também, que os resultados gerados pelo RAPD devem ser interpretados com cautela, pois a ocorrência de eventos genéticos aleatórios, como mutação pontual, inserção e deleção de DNA, pode alterar os padrões RAPD (Smith et al. 2011).

A presença de determinantes genéticos ligados à formação de biofilmes nas cepas permite inferir que há manutenção desses micro-organismos sob a forma sésil e que a contaminação do produto final pode ser devida à contaminação cruzada com os utensílios ou com o próprio ambiente do abatedouro.

O cluster A é composto pelos grupos clonais 1 e 2, com seis cepas com homologia de 87,6%, todas oriundas da empresa abatedoura de frangos localizada em São Paulo (A). Esse perfil esteve presente no período do segundo semestre de 2009, nas carcaças e nas amostras ambientais (propé e suabe pré abate). Portanto, é provável que a origem da contaminação estivesse no aviário e foi pontual, uma vez que o problema não persistiu por um período muito extenso.

Foram agrupadas 13 cepas no cluster B, incluindo os grupos clonais 3 e 4, com similaridade de 89,4%, provenientes tanto do frigorífico localizado no Estado de São Paulo quanto no de Minas Gerais. Esse genótipo foi identificado no segundo semestre de 2009 na indústria A (SP), e no segundo semestre do ano de 2014 na

indústria B (MG). Incluiu cepas isoladas de alimentos processados (coxa, recorte de coxa, sobrecoxa, filezinho sassami, peito salgado e carcaças inteiras), de amostras ambientais (suabe pré abate e propé) e da água de escaldagem. Dessa forma, é provável que a fonte de contaminação na indústria A teve origem no aviário devido à presença desse genótipo neste ambiente, que alcançou o abatedouro e consequentemente, o produto final. Já na indústria B a contaminação ocorreu anos depois, nas etapas de processamento que geraram um produto final contaminado.

O *cluster* C é composto por três cepas com similaridade de 83,3%, observado na empresa A, tanto no aviário quanto no abatedouro, que inclui o grupo clonal 5. Vale ressaltar que a presença no abatedouro foi identificada somente em 2009 e que no ano de 2010 esse genótipo só foi detectado no aviário. Este resultado pode indicar práticas higiênico-sanitárias adequadas e medidas de controle eficientes durante o abate na indústria, que não permitiram que o genótipo presente no aviário levasse à positividade de amostras no abatedouro em 2010.

A presença de *S. Minnesota* tanto no ambiente do aviário quanto do abatedouro sugere negligência às normas de biossegurança em ambas as unidades de produção. O extenso período de permanência de cepas clones indica que pode ter ocorrido infecção em lotes sucessivos, provavelmente ligados à persistência da contaminação ambiental no aviário.

De acordo com Carrasco et al. (2012) a contaminação das carcaças estão relacionadas, na maioria das vezes, às más práticas de sanitização ambiental e ao controle deficiente das indústrias.

As falhas nos procedimentos de higienização das superfícies de processamento de alimentos permitem que os resíduos aderidos aos equipamentos transformem-se em potencial fonte de contaminação. Sob determinadas condições, os micro-organismos se aderem, interagem com as superfícies e iniciam o crescimento celular que promove as sucessivas contaminações (STEPANOVIC et al. 2004, NITSCHKE & COSTA 2007, MACEDO 2000).

Mead (1989) afirma que diversos fatores explicam a complexidade no controle da disseminação da *Salmonella* spp durante o abate, tais como: as aves manterem estreita proximidade ao longo do processo, as limitações da planta de abate, ineficiente desinfecção de equipamentos, dificuldade em lavar a cavidade abdominal de forma eficaz após evisceração e a retenção de água pela pele, o que mantém bactérias nas fendas e folículos das penas.

CONCLUSÕES

O estudo foi capaz de demonstrar a presença de *S. Minnesota* produtoras de biofilme nas granjas e nos abatedouros de frangos de corte, indicando que estas comunidades podem contribuir para a persistência deste sorovar ao longo da cadeia de produção, incluindo sua presença nos alimentos produzidos. Nestas cepas, os genes *csgD*, *adrA* e *luxS*, que são associados à formação de biofilmes, estavam presentes na maioria das cepas.

Os isolados demonstraram alta similaridade genética ao longo do período estudado, confirmando sua persistência no ambiente, o que embasa a hipótese de uma disseminação clonal associada a biofilmes como fonte de contaminação por esse sorovar nas indústrias, que contribui para o aumento do número de isolamentos no ambiente e nos alimentos produzidos.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e a FAPEMIG pelo auxílio financeiro para execução do estudo.

REFERÊNCIAS

- ABPA- Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório anual 2016. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf> Acesso em; 18/072017.
- Ammor M.S, Michaelidis C, Nychas G. J. 2008. Insights into the role of quorum sensing in food spoilage. *Journal of Food Protection*.71:1510-1525.
- Baptistão L.G, Budri P.E, Júnior J.P.A & Rall V.L.M.2012. Presença dos genes *csgD* e *adrA*, responsáveis pela formação de biofilme em *Salmonella* sp. Anais do XXVI Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, São Paulo.
- Boari C.A. 2008. Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de cultivo. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 80 f.
- Boyen F, Eeckhaut V, Van Immerseel F, Pasmans F, Ducatelle R & Haesebrouck F. 2009. Quorum sensing in veterinary pathogens: mechanisms, clinical importance and future perspectives. *Vet Microbiol* .135:187–195.
- Burmolle M, Thomsen T.R, Fazli M, Dige I, Christensen I & Homoe P.2010. Biofilms in chronic infections-a matter of opportunity monospecies biofilms in multispecies infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 59: 324-336.

- 353 Carrasco E, Morales-Rueda A & García-Gimeno R.M.2012. Cross-contamination and recontamination by
354 *Salmonella* in foods: A review. Food. Res. Int. 45: 545–556.
- 355 Cardoso A.L.S.P & Tessari E. N. C. 2008.Divulgação técnica - *Salmonella* na segurança dos alimentos. Biológico.
356 70(1): 11-13.
- 357 Carrasco E, Morales-Rueda A & García-Gimeno R.M. 2012. Cross-contamination and recontamination by
358 *Salmonella* in foods: A review. Food. Res. Int. 45:545–556.
- 359 Castelijn G.A, Van der Veen S, Zwietering M.H, Moezelaar, R & Abee T. 2012. Diversity in biofilm formation and
360 production of curli fimbriae and cellulose of *Salmonella* Typhimurium strains of different origin in high and
361 low nutrient medium. Biofouling.28(1):51–63.
- 362 CDC. *Salmonella*. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/index.html>>.2015. Acesso em: 23 maio 2017.
- 363 CDC 2016.Reports of *Salmonella* Outbreak Investigations from 2016.Disponível
364 em:<<https://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks-2016.html>> Acesso em: 23 maio 2017.
- 365 Chia T.W.R, Goulter R.M, Mcmeekin T, Dykes G.A & Fegan N. 2009. Attachment of different *Salmonella* serovars to
366 materials commonly used in a poultry processing plant. Food Microbiology.26: 853- 859.
- 367 Choi J, Shin D & Ryu S. 2007.Implication of quorum sensing in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium
368 virulence: the *luxS* gene is necessary for expression of genes in pathogenicity island 1. Infection and
369 Immunity. 75: 4885-4890.
- 370 CODA-CERVA (Centrum voor Onderzoek in Diergeneeskunde en Agrochemie, Centre d'Etude et des Recherches
371 Vétérinaires et Agrochimiques). 2014. *Salmonella* Serotypes Analysed at the CODA-CERVA in 2013. Federal
372 Public Service Health, Food Chain Security and Environment, Brussels, Belgium, 2014.
- 373 De oliveira D.C.V, Junior A.F, Kaneno R, Silva M.G, Araújo Júnior J.P, Silva N.C & Rall V.L,2014. Ability of *Salmonella*
374 spp. to Produce Biofilm Is Dependent on Temperature and Surface Material. Foodborne pathogens and
375 disease.11(6):478-83.
- 376 EFSA - EFSA and ECDC (European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control).
377 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-
378 borne outbreaks in 2013. EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks
379 2013.EFSA Journal.13(1):3991.. Disponível em:
380 <<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3991>>Acesso em: 28 março 2017.
- 381 EFSA - EFSA and ECDC (European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and
382 Control).The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and
383 food-borne outbreaks in 2015.EFSA Journal. 14(12):4634. Disponível em:
384 <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4634>>Acesso em: 28 março 2017.
- 385 Faria T.S. 2014 Perfil de resistência antimicrobiana e subtipagem de *Salmonella* Minnesota isoladas no. pré-
386 abate e em carcaças de frangos. 42.p, 2014. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento
387 Tecnológico de Produtos de Origem Animal)- Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, 42p.
- 388 Franco A, Leekitcharoenphon P, Feltrin F, Alba P, Cordaro G, Iurescia M, Tolli R, D'Incau M, Staffolani M, Di
389 Giannatale E, Hendriksen RS & Battisti A. 2015. Emergence of a clonal lineage of multidrug-resistant ESBL-
390 producing *Salmonella* Infantis transmitted from broilers and broiler meat to humans in Italy between 2011
391 and 2014. PLoS One.10(12):e0144802. . doi: 10.1371/journal.pone.0144802.
- 392 Freitas J. 2011. Evolução de sorovares Modelo de Banco de Cepas. Anais do Seminário Internacional de
393 Salmonellose Aviária. Rio de Janeiro, RJ. (Resumo).
- 394 Hilton A.C, Banks J.G & Penn C.W. 1996.Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) of *Salmonella*: strain
395 differentiation and characterization of amplified sequences. Journal of Applied Microbiology, Oxford.81:
396 575-584.
- 397 Hood S.K & Zottola E.A. 1995. Biofilms in food processing. Food Control.6(1):9-18.
- 398 Kolter R & Greenberg E.P. 2006. Microbial sciences: The superficial life of microbes. Nature. 441(7091):300-302.
- 399 Kudirkiene E, Cohn M.T, Stabler R.A, Strong P.C.R, Serniene L, Wren B.W, Nielsen E.M, Malakauskas M &
400 Brondsted L. 2012. Phenotypic and genotypic characterizations of *Campylobacter jejuni* isolated from the
401 broiler meat production process. Curr.Microbiol. 65:398–406.
- 402 Lin A.W., Usera A.M. Barret T.J & Goldsby R.A. 1996. Application of random amplified 562 polymorphic DNA
403 analysis to differentiate strains of *Salmonella* Enteritidis. J. Clin. 563 Microbiol. 34(4): 870-876. 564
- 404 Macedo J.A.B. 2000. Biofilmes bacterianos, uma preocupação para a indústria de farmacêutica. Revista Fármacos
405 & Medicamentos. 2(7): 19-24.
- 406 Machado T.R.M. 2007. Avaliação da aderência ao aço inoxidável e ao polietileno por três sorovares de *Salmonella*
407 e da capacidade de desinfecção dessas superfícies. 143p, 2007. Dissertação (Mestrado em Microbiologia
408 Agrícola e do Meio Ambiente)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, 143p.
- 409 Mead G.C. 1989. Hygiene problems and control of process contamination.In Processing of Poultry ed. Mead G.C. p.
410 183-220. Oxford: Elsevier Applied Science.
- 411 Mead G.C. 2000.Prospects for competitive exclusion treatment to control *Salmonellas* and other foodborne
412 pathogens in poultry. Veterinary Journal. 159:111-123.
- 413 Milles A. A. & Misra S.S. 1938.Estimation of the bactericide power of the bloods. Journal of Hygiene. 38:732-749.

- Monds R.D & O'toole G.A. 2009. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in Microbiol.* 17:73–87.
- Naves P, Del prado G, Huelves L, Gracia M, Ruiz V, Blanco J, Rodriguez-Cerrado V, Ponte M.C & Soriano F. 2008. Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. *J Appl Microbiol.* 105:585–590.
- Nitschke, M & Costa S.G.V.A de O. 2007. Biosurfactantes in food industry. *Trends Food Sci. Technol.* 18:252-259.
- Oliveira, A. de P, Sola M.C, Feistel J.C, Rezende C.S.M & Fayad, A.R. 2012. *Salmonella* sp. e o abate de frangos: pontos críticos de controle. *Enciclopédia Biosfera.* 8(14): 865.
- Oliveira F.A., Frazzon A.P.G., Brandelli A. & Tondo E.C. 2007. Use of PCR-ribotyping, RAPD, and antimicrobial resistance for typing of *Salmonella* Enteritidis involved in foodborne outbreaks in Southern Brazil. *J Infect Develop Count.* 1:170–176
- Pickler L, Hayashi R.M, Lourenço M.C, Miglino L.B, Caron L.F, Beirão B.C. B, Silva, A.V. F & Santin E. 2012. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis e Minnesota e tratados com ácidos orgânicos. *Pesquisa Veterinária Brasileira.* 32(1): 27-36.
- Pickler L, Muniz E.C, Kuritza L. N, Lourenço M.C & Santin E. 2014. Resposta imunológica e uso de ácidos orgânicos em frangos desafiados com *Salmonella* Minnesota. *Acta Scientiae Veterinariae.* 4:1203.
- Plummer, P. J. 2012. *luxS* and quorum-sensing in *Campylobacter*. *Front Cell Infect. Microbiol.* 2:1-9.
- Santos, L.R. dos . 2003. Padronização da RAPD (DNA polimórfico amplificado ao acaso) para caracterização molecular de *Salmonella* enteritidis. *Revista da FZVA Uruguaiana.* 10(1): 144-158.
- Scherrer J.V & Marcon, L. de N. 2016. Formação de biofilme e segurança dos alimentos em serviços de alimentação. *Rev. da Associação Brasileira de Nutrição.* 7(2): 91-99.
- Smith J.L, Fratafico P.M & Novak J.S. 2004. Quorum sensing: a primer for food microbiologists. *Journal of Food Protection.* 67 (5):1053-1070.
- Smith S.I, Fowora M.A, Goodluck H.A, Nwaokorie F.O, Aboaba O.O & Opere B. 2011. Molecular typing of *Salmonella* spp. isolated from food handlers and animals in Nigeria. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics.* 2(1):73–77.
- Smoot L. M & Pierson M.D. 1998. Effect of environmental stress on the ability of *Listeria monocytogenes* scott a to attach to food contact surfaces. *Journal of Food Protection.* 61:1293-1298.
- Spiers A.J & Rainey P.B. 2005. The *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader biofilm requires attachment factor, cellulose fibre and LPS interactions to maintain strength and integrity. *Microbiology.* (151)2829-2839.
- Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B & Svabic-Vlahovic M. 2000. A modified micro titer-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiology Methods.* 40:175–179.
- Stepanovic S, Cirkovic I, Ranin L & Svabic-Vlahovic M. 2004. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Letters in Applied Microbiology.* 38:428-432.
- Steenackers H, Hermans K, Vanderleyden J & De keersmaecker, S.C. 2012. *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International.* 45(2):502-531.
- Tabo D.C, Diguimbaye C.D, Granier S.A, Moury F, Brisabois A, Elgroud R, & Millemann Y. 2013. Prevalence and antimicrobial resistance of non-typhoidal *Salmonella* serotypes isolated from laying hens and broiler chicken farms in N'Djamena, Chad. *Veterinary Microbiology.* 166(1/2): 293-298.
- Van Houdt R.V & Michiels C.W. 2010. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of Applied Microbiology.* 109(4):1117-1131.
- Vaz C.S.L, Streck A.F, Michael G.B, Marks F.S, Rodrigues D.P, Dos reis E.M, Cardoso M.R & Canal C.W. 2010. Antimicrobial resistance and subtyping of *Salmonella* enterica subspecies enterica serovar Enteritidis isolated from human outbreaks and poultry in southern Brazil. *Poult.Sci.* 89:1530–1536.
- Vestby L.K., Moretro T., Langsrud S., Heir E. & Nesse L.L. 2009. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. *BMC Vet. Res.* 5: 20–26
- Voss-Rech D, Vaz C.S.L, Alves L, Coldebella A, Leão J.A, Rodrigues D.P & Back A. 2015. A temporal study of *Salmonella* enterica serotypes from broiler farms in Brazil. *Poultry Science.* 94(3):433-441.
- WHO 2016. *Salmonella* (non-typhoidal). Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>>. Acesso em: 21 novembro de 2016.
- Yoon Y & Sofos J.N. 2008. Autoinducer-2 activity of Gram-negative foodborne pathogenic bacteria and its influence on biofilm formation. *Journal of Food Science.* 73(3):141-147.
- Ziech R.E, Perin A.P, Lampugnani C, Sereno M.J, Viana C, Soares V.M, Pereira J.G, Pinto, J.P. de A & Bersot L. dos S. 2016. Biofilm-producing ability and tolerance to industrial sanitizers in *Salmonella* sp. isolated from Brazilian poultry processing plants. *Food Science and Technology.* 68:85-90.

Legendas das Figuras

Fig. 1: Dendograma gerado por análise computadorizada (Gel Compare II) de perfis de DNA de cepas de *S. Minnesota*, baseado na técnica RAPD-PCR. A análise foi realizada pelo método de Dice/UPGMA (parâmetro de tolerância de 1,0%, homologia $\geq 80\%$).

Tabelas

Tabela 1 - Sequência 5' – 3' dos *primers*, tamanho do fragmento e referência utilizados para a identificação dos genes *csgD*, *adrA* e *luxS* em cepas de *S. Minnesota*.

<i>Primer</i>	Sequência 5' – 3'	pb	Referência
<i>csgD F</i>	TGCGGACTCGGTGCTGTTGT	123	
<i>csgD R</i>	CAGGAACACGTGGTCAGCGG	123	
<i>adrA F</i>	GGGCGGCCGAAAGCCCTTGAT	92	De Oliveira et al.(2014)
<i>adrA R</i>	GCCCATCAGCGCGATCCACA	92	
<i>luxS F</i>	GGTTATGAGAAAAGCATGCACCGATCA	1080	
<i>luxS R</i>	GATAATCCTGAACTAAGCTTCTCCGC	1080	Choi et al. (2007)

571 **Tabela 2.** Classificação de biofilmes de cepas de *S. Minnesota* isoladas nos anos de 2009 a 2014 em duas
 572 empresas abatedouras de aves, de acordo com o Índice de Formação de Biofilmes.
 573

Identificação	DO	Classificação	Matriz	Indústria
SM 01	0,038	Inexistente	Carcaça Inteira	B
SM 02	0,072	Fraco	Sobrecoxa	B
SM 05	0,079	Fraco	Carcaça Inteira	B
SM 07	0,000	Inexistente	Farinha de pena	B
SM 09	0,073	Fraco	Carcaça Inteira	B
SM 10	0,039	Inexistente	Farinha de Visceras	B
SM 55	0,078	Fraco	Suabe pré Abate	A
SM 56	0,084	Fraco	Suabe pré Abate	A
SM 57	0,052	Fraco	Propé Aviário	A
SM 58	0,044	Inexistente	Propé Aviário	A
SM 59	0,121	Moderado	Propé Aviário	A
SM 61	0,146	Moderado	Suabe Caminhão de Aviário	A
SM 62	0,092	Moderado	Propé Aviário	A
SM 64	0,144	Moderado	Suabe Caminhão de Ração	A
SM 65	0,248	Forte	Carcaça Inteira	A
SM 66	0,132	Moderado	Carcaça Inteira	A
SM 67	0,027	Inexistente	Carcaça Inteira	A
SM 68	0,017	Inexistente	Carcaça Inteira	A
SM 70	0,056	Fraco	Pés <i>in natura</i>	A
SM 71	0,175	Moderado	Coxa com osso <i>in natura</i>	A
SM 73	0,221	Forte	Coxa sem osso <i>in natura</i>	A
SM 77	0,195	Forte	Filezinho Sassami	A
SM 78	0,067	Fraco	Recorte de Coxa	A
SM 79	0,274	Forte	Peito Salgado	A
SM 81	0,054	Fraco	Coração	A
SM 82	0,023	Inexistente	Água de escaldagem	A
SM 83	0,000	Inexistente	Carcaça Inteira	A
SM 85	0,016	Inexistente	Filezinho Sassami	A
SM 86	0,002	Inexistente	Filé/Peito de frango	A

574 PRP= Programa de redução de patógenos; Indústria = A (São Paulo) e Indústria B (Minas Gerais);
 575 DO_{600 nm} = Densidade óptica em comprimento de onda de 660 nanômetros; IFB: Inexistente ($\leq 0,044$ nn), Fraco ($>$
 576 $0,045$ a $< 0,088$ nn), Moderado ($< 0,176$ a $> 0,089$ nn) e Forte ($> 0,176$ nn).
 577
 578
 579

580 **Tabela 3.** Contagens médias (Log UFC) após adesão e formação de biofilmes por 29 cepas de *S. Minnesota*
 581 isoladas nos anos de 2009 a 2014 em duas empresas abatedouras de aves localizadas nos estados de Minas
 582 Gerais e São Paulo.
 583

Média das contagens \pm desvio padrão (Log de UFC)		
Inóculo inicial	Adesão	Biofilme
$6,78 \pm 0,13^A$	$6,27 \pm 0,42^{B*}$	$7,91 \pm 0,15^{C*}$

584 Letras maiúsculas diferentes na linha indica diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste ANOVA; * diferença
 585 significativa entre as contagens obtidas para cada cepa ($p < 0,05$) pelo teste ANOVA.
 586
 587
 588

RAPD - P1254

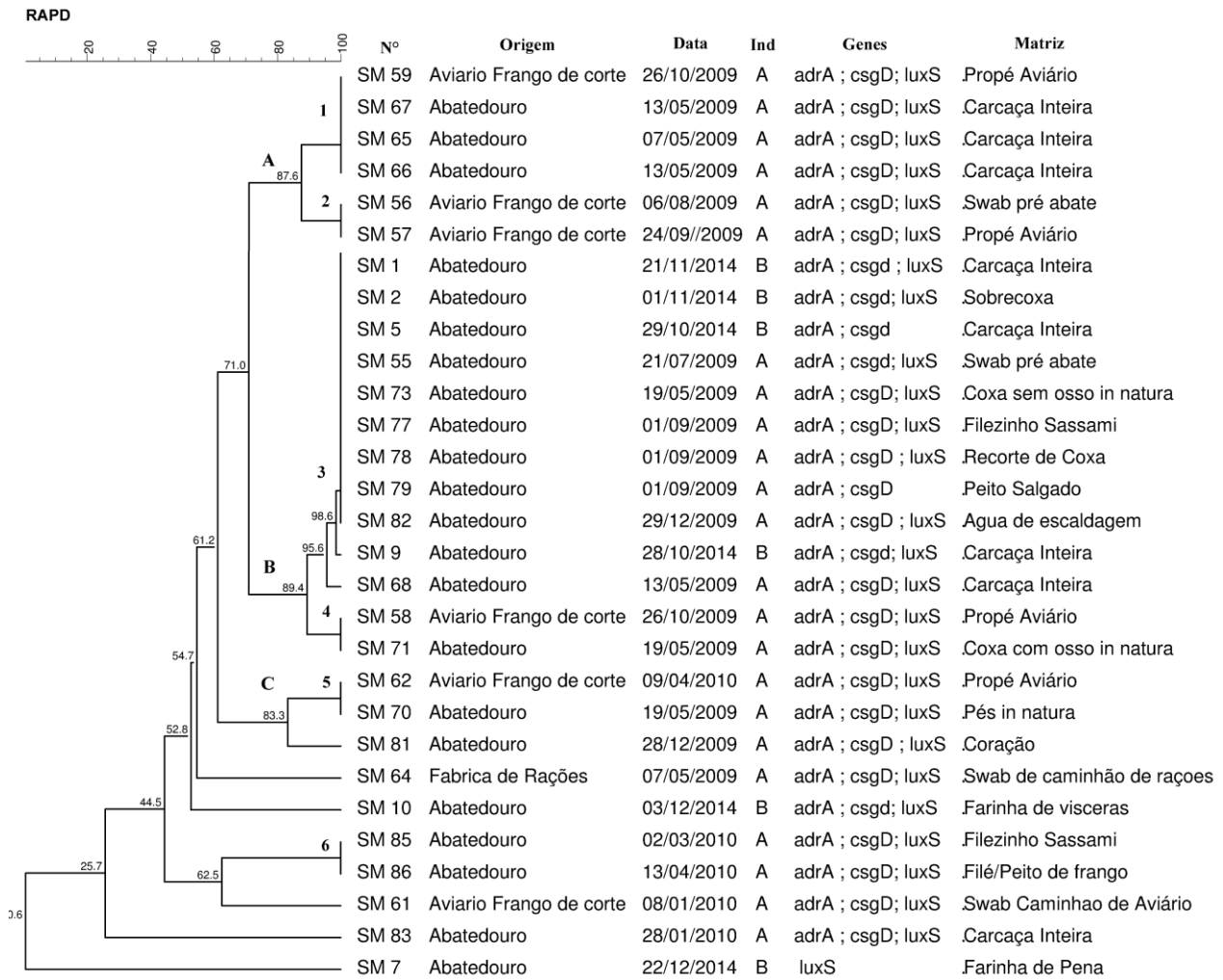


Figura 1

CAPÍTULO 3

AÇÃO DE SANITIZANTES EM BIOFILMES DE *Salmonella* Minnesota FORMADOS EM DIFERENTES TIPOS DE SUPERFÍCIES

Artigo a ser publicado no periódico
Biofouling

Ação de sanitizantes em biofilmes de *Salmonella* Minnesota formados em diferentes tipos de superfícies

Silvia Cassimiro Brasão^a, Eliane Pereira Mendonça^a, Roberta Torres de Melo^a, Renata Rezende Prado^a, Guilherme Paz Monteiro^a, Phelipe Augusto Borba Martins Peres^a, Daise Aparecida Rossi^a.

^aLaboratório de Biotecnologia Animal Aplicada, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil.

RESUMO - Biofilme pode ser uma forma de perpetuação de *S. Minnesota* no ambiente. Objetivou-se avaliar a eficiência do contato por 15 minutos do hipoclorito de sódio 1%, e ácido peracético 0,8% na inibição de biofilmes formados por três cepas distintas de *S. Minnesota* em aço, poliuretano e polipropileno e determinar a recuperação das células remanescentes. Qualitativamente houve influência na classificação dos biofilmes de acordo com a superfície. Independente da cepa e da superfície, os biofilmes mantiveram uma contagem de 6,1 Log UFC, indicando que as diferenças referem-se à matriz polimérica. O uso do hipoclorito foi capaz de destruir as células, que não foram recuperadas após reincubação. Já o ácido peracético não promoveu redução significativa. As características dos biofilmes de *S. Minnesota* se alteram dependendo do tipo de cepa e de material, porém a quantidade de células sésseis permanecem constantes. O uso do hipoclorito de sódio 1% é eficiente na sua remoção.

KEYWORDS: Agentes químicos; Desinfetantes; Higienização; Salmonelose; Vida sésseis

Introdução

Salmonella destaca-se como um dos mais importantes agentes etiológicos de doenças transmitidas pelos alimentos (BRASIL 2015; EFSA 2014; CDC 2016) e o consumo da carne

de frango e seus derivados, constitui-se na maior fonte de infecção aos humanos (EFSA 2015; CDC 2015; Milan & Timm 2015; CDC 2016).

Apesar do desconhecimento da importância de *S. Minnesota* para a saúde pública, o aumento do número de isolamentos ao longo da cadeia avícola no Brasil e no mundo (Freitas 2011; CODA-CERVA 2014; Voss-Rech et al. 2015) tem trazido preocupações e instiga estudos sobre os fatores que interferem no aumento da sua incidência. A presença do gênero em alimentos é indesejável, interfere na relação comercial entre os países e impacta as empresas, já que podem ser a causa de barreira sanitária à exportação (Back & Ishizuka 2010).

Uma teoria que pode suportar o aumento na incidência de *S. Minnesota* é sua perpetuação na forma de biofilmes, tanto no ambiente das granjas quanto nas indústrias. Nestas comunidades, *Salmonella* encontra-se mais protegida contra agressões ambientais, o que dificulta a sua eliminação e favorece sua adaptação a diferentes fatores de estresse, como o uso de sanitizantes ou a privação de nutrientes (Burmolle et al. 2010; Steenackers et al. 2012).

Van Houdt & Michiels (2010) demonstraram que biofilmes formados por *Salmonella* spp. em equipamentos e superfícies de processamento transformam-se em um reservatório persistente de contaminação, comprometendo a segurança alimentar e a saúde humana.

Entre os fatores que influenciam a associação bacteriana em biofilmes, destacam-se o tipo de superfície, o tempo de contato, os agentes químicos utilizados na higienização e o período entre higienizações (Karaca et al. 2013; Corcoran et al. 2014; Oliveira et al. 2014; Silva et al. 2014; Vivian 2014; Ziech et al. 2016). Porém, apesar de estudos sobre o gênero, não há relatos de investigações específicas que determinem a influência das superfícies, agentes químicos e período entre higienização em biofilmes por *S. Minnesota*.

Objetivou-se quantificar células viáveis e a biomassa de biofilmes formados por *S. Minnesota* em polipropileno, poliuretano e aço inoxidável antes e após o tratamento com hipoclorito de sódio 1% e ácido peracético 0,8%, e ainda, determinar se após estes tratamentos, em ambiente favorável, há recuperação do micro-organismo viável.

Material e métodos

Desenho do Estudo

Foram utilizadas três cepas de *S. Minnesota* isoladas na cadeia de produção avícola de uma empresa exportadora com ciclo completo de produção. As três cepas foram selecionadas de um total de 29 estirpes isoladas durante o período de 2009 a 2014, por serem filogeneticamente distintas na tipagem molecular e por apresentarem diferentes classificações quanto a capacidade de formar biofilmes na metodologia tradicional (fraco, médio e forte) e por possuírem os genes *csgD*, *adrA* e *luxS*, ligados à formação de biofilmes, com exceção de uma cepa produtora de biofilme de forte intensidade que não apresentou o gene *luxS*.

Os biofilmes foram formados em *slides* de aço inoxidável, poliuretano e polipropileno por 24h para avaliar alterações na intensidade da biomassa em comparação com a classificação encontrada na metodologia tradicional, e também para comparar o número de bactérias na forma séssil nos diferentes materiais.

Os biofilmes formados foram submetidos à ação dos sanitizantes hipoclorito de sódio 1% e ácido peracético 0,8% por 15 minutos para verificar qual agente biocida é mais eficiente na inibição dos biofilmes.

Para avaliar a viabilidade das células bacterianas em biofilmes após tratamento com os sanitizantes, os mesmos foram reincubados por mais 24 horas e quantificados para verificar a recuperação de células viáveis após os tratamentos.

Preparo das cepas

As cepas puras de *S. Minnesota* (Tabela 1) foram reativadas em 5mL de caldo BHI (Difco®), incubadas a 37°C por 24h e confirmadas quanto a sua pureza em ágar XLD (Fluka®). Após, foi preparado um inóculo de cada uma das cepas transportando colônias puras do ágar XLD para caldo TSB (Merck®), que foi incubado a 37° C por 24 h.

Para cada uma das cepas foi realizada a curva de crescimento bacteriano (DO_{600nm} vs contagem Log UFC) para padronizar o número de células no ensaio em 10^7 Log UFC, que foi estabelecido em uma DO_{600nm} de 0,15 a 0,20.

Formação dos biofilmes

Para produção dos biofilmes, os ensaios foram realizados em triplicata em três períodos independentes. Em cada período foram utilizados nove *erlenmeyers* estéreis de 125mL (grupo teste) com 25mL de caldo TSB contendo 10^7 Log UFC, correspondente à DO_{600nm} de 0,20.

Foram utilizados três *erlenmeyers* por cepa de *S. Minnesota* e em cada um deles adicionou-se oito slides estéreis de 1cm² dos seguintes materiais: poliuretano (PU) (HabasitCleandrive™), polipropileno (PP) (Leadmec®) e aço inoxidável (AISI 304®). A incubação foi realizada sob agitação de 100rpm em agitador orbital (Global trade ®) durante 24 h a 37°C.

Para o controle foram utilizados três *erlenmeyers* contendo 25mL de caldo TSB estéril contendo seis slides de cada um dos materiais que foram mantidos nas mesmas condições do grupo teste.

Análise qualitativa dos biofilmes

A classificação da biomassa dos biofilmes foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Peeters et al. (2008), Silagyi et al. (2009), Pui et al. (2011), com modificações.

Após a formação dos biofilmes nos materiais, dois slides de cada material e de cada cepa foram transferidos assepticamente para uma placa de poliestireno de 24 poços (Kasvi®). Esses slides foram lavados três vezes com 1 mL de água deionizada estéril e secos em estufa a 55°C por 50 min. A biomassa foi fixada pela adição de cristal violeta 1% (LaborClin®) por cinco minutos, seguido da dissolução com solução álcool-acetona (80-20, etanol-acetona, v/v) (Dinamica®). O corante dissolvido foi removido de cada slide e colocado em uma nova placa de microtitulação de 96 poços para leitura da DO₆₀₀ em espectrofotômetro (DNM-9602 microplatereaderPerlong®).

A classificação da cepa quanto à capacidade de produzir biofilmes foi realizada de acordo com Stepanovic et al. (2000) a partir dos resultados de leitura da DO₆₀₀. Foi utilizado como ponto corte o valor de 0,044, que foi calculado por meio de três desvios padrão acima da média da DO₆₀₀ dos controles negativos. Assim, em relação à DO₆₀₀ média de cada amostra, considerou-se a intensidade graduada da seguinte forma: forte (>0,176), moderada (< 0,176 e > 0,089), fraca (> 0,045 e < 0,088), inexistente (\leq 0,044).

Quantificação dos biofilmes

A contagem do número de células viáveis em biofilme foi feita com um slide de cada material em cada cepa. Os slides foram transferidos assepticamente para três placas de poliestireno de 24 poços (Kasvi®), sendo uma por material, e submetidos a três lavagens com PBS (Laborclin®) para remover as células planctônicas.

Para a contagem dos micro-organismos viáveis, as células foram removidas utilizando metodologia adaptada de Nguyen e Yuk (2013). Os slides foram assepticamente transferidos para tubos de ensaio contendo 5mL de solução de NaCl 0,85% (Synth®) e 25 esferas de vidro

estéreis de 0,5 mm de diâmetro e submetidos a agitação em vórtex durante 90 segundos. Após foram realizadas diluições decimais seriadas que foram semeadas pelo método de gota (Milles & Misra, 1938; Machado, 2007) na superfície de ágar TSA (Merck ®).

Inibição dos biofilmes por agentes sanitizantes

Os demais slides (dois por cepa) foram transferidos assepticamente para três placas de poliestireno de 24 poços (Kasvi®), sendo uma por material. Os agentes químicos testados foram o hipoclorito de sódio 1% (Sanikoll®) e ácido peracético 0,8% (Synth®) por 15 min, a fim de simular protocolos de desinfecção dentro da indústria.

Após os tratamentos, os poços contendo os slides de uma das placas foram lavados por três vezes com PBS (Laborclin®) para remover as células planctônicas. As células viáveis dos biofilmes foram quantificadas, conforme descrito no item anterior.

Recuperação dos biofilmes após sanitização

Os demais slides contendo os biofilmes das três cepas (dois slides por cepa) já tratados com os sanitizantes foram transferidos para uma segunda placa. Em cada poço foi adicionado 1mL de caldo TSB (Merck®) e placa reincubada por 24 horas a 37°C para promover o crescimento de células remanescentes. Após, foram realizadas três lavagens com PBS (Laborclin®) e contagem conforme descrito anteriormente.

Análise dos resultados

Para verificar diferenças entre cepas e entre tratamentos com os agentes químicos, os dados quantitativos foram tabulados, transformados para Log₁₀ e submetidos à análise estatística com o uso do programa GraphPadPrism versão 6.01 (GraphPad Software, Estados Unidos). A normalidade dos dados foi verificada para posterior utilização da análise de

variância (ANOVA) ou do teste Kruskal-Wallis, se paramétricos ou não paramétricos, respectivamente.

Resultados e discussão

Houve alteração na classificação da biomassa dos biofilmes formados pelas três cepas quando se comparou o uso do aço inoxidável, poliuretano e polipropileno como superfície de contato (Tabela 2). Estas variações indicam que o comportamento do biofilme é cepa dependente e influenciado pela superfície de adesão.

O aço inoxidável é o material mais frequentemente recomendado para equipamentos que entram em contato com os alimentos (Simões et al., 2010; Araújo et al. 2013). Um dos fatores que reforçam esta indicação é a baixa porosidade e resistência, com micro-estrutura que não favorece a adesão bacteriana e facilita a higienização. Isto porquê a presença de micro-ranhas e micro-fendas nas superfícies favorecem o acúmulo de micro-organismos e as condições para o desenvolvimento da vida sésil (Rossoni & Gaylarde 2000; Wirtanen & Salo2003; Bernardes et al., 2012), além de garantir proteção em situações instáveis, como atritos mecânicos e agentes desinfetantes (Katsikigianni & Missirlis 2004; Wirtanen & Salo2003; Van Houdt & Michiels 2010).

Apesar, disso, as três cepas formaram biofilmes de forte intensidade neste material, resultado não esperado e que instiga novas investigações para determinar os fatores que influenciaram na maior adesão neste material.

A maior capacidade de formar biofilmes em aço difere de resultados encontrados por Manijeh et al. (2008), Shi e Zhu (2009) e Vivian (2014). Estes autores afirmam que bactérias do gênero *Salmonella* possuem maior habilidade de se ligar a superfícies hidrofóbicas, como a borracha e plásticos (a exemplo, o polipropileno e poliuretano) com pouca ou nenhuma carga superficial, enquanto poucas bactérias se prendem às superfícies hidrofílicas e carregadas

negativamente, como as inoxidáveis. Porém, estudo realizado por Brabes et al. (2004) com *Staphylococcus* spp também constatou que o aço inoxidável proporcionou melhores condições para a formação de biofilmes quando comparado ao polipropileno.

Há controversia na literatura quanto à natureza hidrofóbica ou hidrofílica do aço inoxidável. Barnes et al. (1999) e Moretro et al. (2003) o citam como de natureza hidrofílica, porém, Sinde e Carballo (2000), Peng et al. (2001), Teixeira et al. (2005) e Boari et al. (2009) o relatam como hidrofóbico. Boari et al. (2009) argumenta que, devido à sua alta afinidade com o oxigênio, o aço inoxidável tende a se combinar com este elemento e formar uma fina camada de óxido de cromo, que é responsável pela resistência à corrosão, e também pela hidrofobicidade do aço inoxidável.

Independente da característica da superfície de contato é provável que a composição da matriz exopolimérica também influencie na afinidade pela adesão. Entretanto, a composição da biomassa não foi determinada em nosso estudo.

A cepa 1 apresentou a mesma classificação de forte produtora em todos os materiais testados, sugerindo que apresente uma melhor expressão das características envolvidas com a forma de vida sésil, independente da superfície de contato. Porém este comportamento não foi observado nas demais cepas.

A classificação dos biofilmes formados em poliuretano e polipropileno foi cepa dependente e demonstra que deve haver cautela na extrapolação de resultados obtidos em diferentes superfícies. Porém, considerando os resultados de cada cepa individualmente, nossos resultados concordam com Vestby et al. (2009), Ziech et al. (2016) e Patel & Sharma (2010), que demonstraram semelhanças em biofilmes de *Salmonella* spp. formados em poliestireno e polipropileno. A diferença de moderada a fraca produtora em poliuretano e polipropileno, respectivamente, só foi observada na cepa 3 (Tabela 2).

Não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre o número de células viáveis nos biofilmes entre as diferentes cepas ou materiais (Tabela 3). A contagem média foi de 5,18 log.UFC. Isso comprova que as variações identificadas no ensaio qualitativo não refletem em alteração no número de células viáveis, mas sim, no volume de matriz produzida. Esse fato é justificável uma vez que o biofilme é constituído por 80% de matriz extracelular polimérica (EPS) e os micro-organismos por cerca de apenas 20% (Rhoads et al. 2008).

Na tabela 4 é demonstrada a média das contagens dos biofilmes formados pelas três cepas de *S. Minnesota* nos diferentes tipos de superfícies após o contato por 15 minutos com hipoclorito de sódio 1% e ácido peracético 0,8%.

Após a utilização do hipoclorito de sódio a 1% por 15 minutos observou-se remoção total das células viáveis nos biofilmes formados pelas três cepas nas três superfícies analisadas. Também não houve recuperação de bactérias após 24 horas de reincubação, comprovando a ausência de células remanescentes e a eficácia desse sanitizante.

Resultados semelhantes foram encontrados por Rossoni e Gaylarde (2000) ao testarem a inibição de biofilmes de *Escherichia coli* e *Pseudomonas fluorescens*. Os autores concluíram que o hipoclorito de sódio foi mais eficiente que ácido peracético. Nguyen et al. (2013) e Ziech et al. (2016) também demonstraram a eficiência de compostos a base de cloro (hipoclorito de sódio 50ppm e detergente alcalino clorado 4%, respectivamente) na remoção de células aderidas de *Salmonella* spp. quando comparado com o ácido peracético.

Vantagens na utilização do cloro no combate à formação de biofilmes foram descritas por Meyer (2003), que afirmou que além da ação frente aos micro-organismos, este agente também tem ação na remoção dos exopolissacarídeos das superfícies, dificultando a aderência de novas bactérias. Assim, a diferença dos clorados em relação a outros sanitizantes consiste em não se limitar à descontaminação das superfícies, mas também destruir as estruturas

residuais da matriz do biofilme, que podem facilitar o seu ressurgimento ou manutenção (Sinde & Carballo 2000; Wirtanen & Salo 2003; Machado 2005; Ohsumi et al. 2015).

Møretrø et al. (2009) afirmam que a redução de no mínimo 4 ciclos log das células sésseis comprovam a eficácia de um sanitizante, indicando que em nosso estudo, o ácido peracético 0,8% não é adequado para a inibição dos biofilmes de *S. Minnesota*. Para esse sanitizante, a redução máxima identificada foi de aproximadamente 2 ciclos log, o que comprova a ineficiência desse agente na remoção de biofilmes.

Resultados distintos foram encontrados por Souza e Daniel (2005), que apontaram o ácido peracético como mais ativo contra biofilmes de *E. coli* e *C. perfringens* na concentração 0,5% por 15 min de contato, quando comparado ao hipoclorito de sódio nas concentrações de 2 a 5 mgCl₂/L. Colla et al. (2012) e Vivian (2014) demonstraram a eficácia desse sanitizante nas concentrações 0,5% e 1,0% em contato por 15 minutos, porém, o teste foi realizado somente em células planctônicas de *Salmonella* spp., o que dificulta a comparação.

A baixa redução nas contagens com o uso do ácido peracético 0,8% pode estar relacionada à resistência adquirida pelas cepas devido à exposição a concentrações subletais, que pode ser decorrente de aplicações incorretas deste sanitizante na indústria (Gilbert et al. 2002), ou devido às variações nas concentrações dos componentes ativos dos desinfetantes comerciais após abertura da embalagem (Nguyen & Yuk 2013).

O uso do ácido peracético não foi capaz de diminuir significativamente as contagens das três cepas nos biofilmes formados na superfície do aço inoxidável. Também nos biofilmes formados em poliuretano, somente o biofilme formado pela cepa 2 teve as contagens reduzidas ($p < 0,05$) após o tratamento. Já nos biofilmes formados em polipropileno houve redução significativa ($p < 0,05$) nas contagens após tratamento com ácido peracético 0,8%, com média de redução de 2,16 ciclos log. Porém, essa diferença não reflete em eficácia conforme Møretrø et al. (2009), que recomenda redução mínima de 4 ciclos log.

Estes resultados diferem dos apresentados por Machado (2007) que avaliou a eficácia da sanitização com ácido peracético 1% em biofilmes de *Salmonella* e comprovou uma maior redução nas contagens para os biofilmes formados em aço em detrimento àqueles formados em polietileno.

As contagens de *S. Minnesota* após o uso do ácido peracético a 0,8% por 15 min demonstram que há necessidade de ações adicionais para melhorar a ação deste agente. Machado (2007) recomenda o emprego de ações mecânicas em conjunto ao uso deste composto químico e Rossoni & Gaylarde (2000) e Andrade (2008) indicam o aumento da concentração e do tempo contato como medidas para aumentar a eficiência desse agente. O aumento da concentração é pertinente uma vez que a recomendação de uso atual deste agente pode variar de 0,1 a 1,5% na indústria (FONSECA et al., 2016).

Após reincubação dos biofilmes tratados com hipoclorito não houve crescimento de nenhuma das cepas, indicando que não haviam células remanescentes. Porém, após o tratamento com ácido peracético houve aumento das contagens para todas as cepas, que atingiram um número médio de 6,10 log UFC (Tabela 5). O aumento médio nas contagens foi de 2,30 log UFC ($p < 0,05$).

O aumento nas contagens após a reincubação dos biofilmes tratados reforça a importância da obediência e avaliação dos planos de higienização. Esta situação reflete o que acontece nas superfícies que entram em contato com os alimentos e são submetidas à higienização deficiente. Quando um novo ciclo de produção é iniciado, micro-organismos remanescentes, além de contaminar o alimento, ainda têm sua multiplicação favorecida pelo contato com nutrientes. Apesar de não ter sido avaliado neste estudo, é possível que esta situação contribua para a maturação do biofilme, fazendo com que se tornem um ponto constante de contaminação.

Herrera (2004) e Fuster-Valls et al. (2008) afirmaram que células em situações de estresse, neste caso, sob ação de sanitizantes, podem apresentar diferentes repostas adaptativas, alterando sua fisiologia e protegendo-se dos efeitos adversos. Nestas situações os micro-organismos podem utilizar mecanismos como bomba de efluxo, mudança de nível de membrana e variação de fase, permitindo o aumento da população sésil e sua persistência no ambiente.

Conclusão

S. Minnesota apresentou diferentes intensidades de biofilmes quando variou a superfície de adesão e a cepa, porém, o número de células sésseis viáveis foi constante, indicando que a diferença é devido à massa da matriz exopolimérica. O uso do hipoclorito de sódio 1% foi eficiente para a inibição dos biofilmes, independente da cepa ou superfície, mas esta efetividade não foi observada com o uso do ácido peracético 0,8%.

Esses dados mostram a necessidade de monitoramento constante de cepas de *S. Minnesota* produtoras de biofilmes e que a utilização adequada de hipoclorito de sódio pode ser eficaz no combate das células sésseis.

Agradecimentos

Ao CNPq e à FAPEMIG pelo auxílio financeiro para execução do estudo.

Referências

Araújo LV, Freire DMG, Nitschke M. 2013. Biossurfactantes: propriedades anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. *Química Nova* (Impresso). 36: 848-858.

Back A, Ishizuka MM. 2010. Principais doenças de notificação obrigatória da Organização Mundial de Saúde Animal. In: *Salmonelose aviária*: 120-189. 1 ed. São Paulo: Fundação Cargill.

Barnes LM, Lo MF, Adams MR, Chamberlain AH. 1999. Effect of milk proteins on adhesion of bacteria to stainless steel surfaces. *Applied Environmental Microbiology*. 65:4543-4548.

Brabes KCS, Andrade NJ, Mendonça RC dos S, Lima JC de, Lopes FA. 2004. Avaliação de processos de adesão e formação de biofilmes por *Staphylococcus* spp. produções e pauciprodutores de enterotoxinas em superfícies utilizadas em uma indústria de laticínios. Instituto de laticínios Candido Tostes, Anais do XXI Congresso Nacional de Laticínios. Juiz de Fora. MG: EPAMIG. 59(339): 190-194.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2015. Sistema de Informação de Agravos de Notificação/Secretaria de Vigilância à Saúde Sinan/SVS. **Doenças Transmitidas por Alimentos**. Brasília. 2015. 11 p. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/09/Apresenta----o-dados-gerais-DTA-2015.pdf>> Acesso em: 06 junho 2017.

- 317 Bernardes PC, Araújo, EA, Pires AC dos S, Fialho Júnior JFQ, Lelis, CA, Andrade NJ de.,
318 2012. Work of adhesion of dairy products on stainless steel surface. Brazilian Journal of
319 Microbiology. 43(4):1261-1268.
320
- 321 Boari CA, Alves MP, Tebaldi VMR, Savian TV, Piccoli RH. 2009. Formação de biofilme em
322 aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes
323 condições de cultivo. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 29(4): 886-895.
324
- 325 Burmolle M, Thomse NTR, Fazli M, Dige I, Christensen L, Homoe P. 2010. Biofilms in
326 chronic infections-a matter of opportunity monospecies biofilms in multispecies infections.
327 FEMS Immunology and Medical Microbiology. 59:324-336.doi:10.1111/j.1574-
328 695X.2010.00714.x.
329
- 330 CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Salmonella*. 2015.
331 Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/index.html>>. Acesso em: 23 maio 2017.
332
- 333 CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Reports
334 of Salmonella Outbreak Investigations from 2016. Disponível
335 em:<<https://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks-2016.html>> Acesso em: 23 maio 2017.
336
- 337 Colla FL, Rodrigues LB, Dickel EL, Borsoi A, NVP do, Santo S LR do. 2012. Avaliação in
338 vitro de clorexidina, amônia quaternária e ácido peracético frente a amostras de *Salmonella*
339 Heidelberg isoladas de abatedouro avícola em 2005 e 2009. Pesquisa Veterinária Brasileira.
340 32(4): 289–292.doi:10.1590/S0100-736X2012000400003.
341

- 342 Corcoran M, Morris D, Lappe N de, O'connor J, Lalor P, Dockery P, Cormican M. 2014.
 343 Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella* enterica biofilm from food contact
 344 surface materials. Appl. Environ. Microbiol. 80:1507-1514. doi:10.1128/AEM.03109-13.
 345
- 346 CODA-CERVA (Centrum voor Onderzoek in Diergeneeskunde en Agrochemie, Centre
 347 d'Etude et des Recherches Vétérinaires et Agrochimiques). 2014. *Salmonella* Serotypes
 348 Analysed at the CODA-CERVA in 2013. Federal Public Service Health, Food Chain Security
 349 and Environment, Brussels, Belgium, 2014.
 350
- 351 De Andrade NJ. 2008. Higiene na indústria de alimentos: 412. São Paulo: Varela.
 352
- 353 De Oliveira DCV, Junior AF, Kaneno R, Silva MG, Araújo Júnior JP, Silva NC, Rall VL.
 354 2014. Ability of *Salmonella* spp. to Produce Biofilm Is Dependent on Temperature and
 355 Surface Material. Foodborne pathogens and disease. 11(6):478-
 356 83.Doi:10.1089/fpd.2013.1710.
 357
- 358 EFSA 2014 - EFSA and ECDC (European Food Safety Authority, European Centre for
 359 Disease Prevention and Control).**EFSA explains zoonotic diseases: *Salmonella***. 2014.
 360 Disponível em:
 361 <http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/factsheetsalmonella.pdf>. Acesso em: 26 março 2017.
 362
 363
- 364 EFSA 2015 - EFSA and ECDC (European Food Safety Authority, European Centre for
 365 Disease Prevention and Control),2015 The European Union summary report on trends and
 366 sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. EU summary report

367 on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2013 - **EFSA Journal**, v.13, n.1
368 pp.3991.2015. Disponível em: <<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3991>> Acesso
369 em: 28 março 2017.

370

371 Fonseca GR, Schneider AM, Costa SA, Sereno MJ, Pegoraro K, Bersot LS. 2016. Ação do
372 ácido peracético em biofilmes formados por *Salmonella* sp. em superfícies de polipropileno.
373 In: XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2016, Gramado, RS.
374 **Anais...** Gramado, RS.

375

376 Freitas J. 2011. Evolução de sorovares modelo de banco de cepas. In: Seminário internacional
377 de salmoneloses aviárias, 2011, Rio de Janeiro, RJ. Anais... Campinas: UBABEF.

378

379 Fuster-Valls N, Hernández-Herrero M, Marín-de-Mateo M, Rodríguez-Jerez JJ. 2008. Effect
380 of different environmental conditions on the bacteria survival on stainless surfaces. Food
381 Control. 19(3):308-314. doi: 10.1016/j.foodcont.2007.04.013.

382

383 Gilbert P, Allison DG, McBain AJ. 2002. Biofilms in vitro and in vivo: do singular
384 mechanisms imply. Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement.92:98–110.doi:
385 10.1046/j.1365-2672.92.5s1.5.x.

386

387 Herrera - Mendoza MT. 2004. El papel del biofilm e el proceso infeccioso y la resistencia.
388 Nova Publicación Científica. 2:71-80.

389

390 Karaca B, Akcelik N, Akcelik M. 2013. Biofilm-producing abilities of *Salmonella* strains
391 isolated from Turkey. Biologia. 68:1-10. doi:10.2478/s11756-012-0138-2.

- 392
- 393 Katsikogianni M, Missirlis YF. 2004. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to
394 biomaterial and techniques used in estimating bacteria-material interactions. *European Cells*
395 *and Materials*.8:37-57. doi:10.22203/eCM.
- 396
- 397 Machado SM de O. 2005. Avaliação do efeito antimicrobiano do surfactante cloreto de
398 benzalcônio no controlo da formação de biofilmes indesejáveis. Dissertação (Mestrado em
399 Tecnologia do Ambiente) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho,
400 Braga, 113f.
- 401
- 402 Machado TRM. 2007. Avaliação da aderência ao aço inoxidável e ao polietileno por três
403 sorovares de *Salmonella* e da capacidade de desinfecção dessas superfícies. 2007. Dissertação
404 (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio Ambiente) - Universidade Federal do Rio
405 Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, 143p.
- 406
- 407 Manijeh M, Mohammad J, Roha KK. 2008. Biofilm formation by *Salmonella* Enteritidis on
408 food contact surfaces. *Journal of Biological Sciences*. 8(2):502-505.
409 doi:10.3923/jbs.2008.502.505.
- 410
- 411 Meyer, B. 2003. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. *International*
412 *Biodeterioration & Biodegradation*. 51(4): 249 – 253. doi:10.1016/S0964-8305(03)00047-7.
- 413
- 414 Milan C, Timm CD. 2015. Fatores de virulência associados à formação de biofilme por
415 *Salmonella* entérica. *Rev. Science and Animal Health*. 3(1):94-102.
416 doi:10.15210/sah.v3i1.4329

417

418 Milles AA, Misra SS. 1938. Estimation of the bactericide power of the bloods. Journal of
 419 Hygiene. 38:732-749. doi: 10.1017/S002217240001158X.

420

421 Moretro T, Hermansen L, Holck AL, Sidhu MS, Rudl K, Langsrud S. 2003. Biofilm
 422 formation and the presence of the intercellular adhesion locus *ica* among *Staphylococci* from
 423 food and food processing environments. Applied and Environmental Microbiology.
 424 69(9):5648–5655.

425

426 Møretrø T, Vestby LK, Nesse LL, Storheim SE, Kotlarz K, Langsrud S. 2009. Evaluation of
 427 efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. Journal of applied
 428 microbiology. 106(3):1005–1012. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.04067.x.

429

430 Nguyen HDN, Yuk HG. 2013. Changes in resistance of *Salmonella* Typhimurium biofilms
 431 formed under various conditions to industrial sanitizers. Food Control. 29(1):236-
 432 240.doi10.1016/j.foodcont.2012.06.006.

433

434 Ohsumi T, Takenaka S, Wakamatsu R, Sakaue Y, Narisawa N, Senpuku H, Ohshima H,
 435 Terao Y, Takashi O. 2015. Residual structure of *Streptococcus mutans* biofilm following
 436 complete disinfection favors secondary bacterial adhesion and biofilm re-development. Plos
 437 one. doi:10(1):e0116647. doi:10.1371/journal.pone.0116647.

438

Patel J, Sharma M. 2010. Differences in attachment of *Salmonella* enterica serovars to cabbage and lettuce leaves. International Journal of Food Microbiology.139(1/2):41-47. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.005.

Peeters E, Nelis HJ, Coenye T. 2008. Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. Journal of Microbiological Methods.72:157-165.doi10.1016/j.mimet.2007.11.010.

Peng JS, Tsai WC, Chou CC. 2001. Surface characteristics of *Bacillus cereus* and its adhesion to stainless steel.International Journal of Food Microbiology, Amsterdam. 65:105-111.

Pui CF, Wong WC, Chai LC, Lee HY, Tang JYH, Noorlis A, Farinazleen M G, Cheah YK, Son R. 2011. Biofilm formation by *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium on plastic cutting board and its transfer to dragon fruit. International Food Research Journal.18:31-38.

Rhoads DD, Wolcott RD, Percival SL. 2008.Biofilm in wound management strategies. Journal of Wound Care. 17(11):502–508. doi:10.12968/jowc.2008.17.11.31479.

Rossoni EMM, Gaylarde CC. 2000. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. International journal of food microbiology.61:81-85. doi:10.1016/S0168-1605(00)00369-X.

- 462 Silagyi K, Kim SH, Lo YM, Wei CI. 2009. Production of biofilm and quorum sensing by
463 *Escherichia coli* O157:H7 and its transfer from contact surfaces to meat, poultry, ready-to-eat
464 deli, and produce products. Food Microbiology. 26:514-519. doi:10.1016/j.fm.2009.03.004.
465
- 466 Silva CF, Gehlen SS, Webber B, Diedrich LN, Pilotto F, Santos LR dos, Tondo EC, Do
467 nascimento VP, Rodrigues LB. 2014. *Salmonella* Enteritidis formadoras de biofilmes são
468 multirresistentes a antimicrobianos. Acta Scientiae Veterinariae. 42(1229): 1- 8.
469
- 470 Simões M, Simões LC, Vieira MJ.2010.A review of current and emergent biofilm control
471 strategies. LWT - Food Science and Technology .43: 573-583.
472
- 473 Sinde E, Carballo J. 2000. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to
474 stainless steel, rubber, and polytetrafluorethylene: The influence of free energy and the effect
475 of commercial sanitizers. Food Microbiology. 17(24):439-447.
476
- 477 Shi X, Zhu X. 2009. Biofilm formation and safety in food industries. Trends in Food Science
478 & Technology. 20:407-413.doi:10.1016/j.tifs.2009.01.054.
479
- 480 Souza JB, Daniel LA. 2005. Comparação entre hipoclorito de sódio e ácido peracético na
481 inativação de *E. coli*, colifagos e *C. perfringens* em água com elevada concentração de
482 matéria orgânica. Engenharia Sanitária e Ambiental. 10(2): 111-117. doi:10.1590/S1413-
483 41522005000200004.
484
- 485 Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic-Vlahovic M. 2000. A modified micro
486 titer-plate test for quantification of Staphylococcal biofilm formation. Journal of

487 Microbiology Methods. 40:175–179. doi: 10.1016/S0167-7012(00)00122-6.

488

489 Steenackers H, Hermans K, Vanderleyden J, De keersmaecker SC. 2012. *Salmonella*
490 biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. Food Research
491 International. 45(2): 502-531. doi: 10.1016/j.foodres.2011.01.038.

492

493 Teixeira P, Lopes Z, Azeredo J, Oliveira R, Vieira MJ. 2005. Physicochemical surface
494 characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. Food
495 Microbiology, London. 22: 247-251.

496

497 Van Houdt RV, Michiels CW. 2010. Biofilm formation and the food industry, a focus on the
498 bacterial outer surface. Journal of Applied Microbiology. 109(4): 1117-1131.
499 doi10.1111/j.1365-2672.2010.04756.x.

500

501 Vivian RC. 2014. Avaliação da formação de biofilme e sensibilidade ao ácido peracético por
502 *Salmonella* spp. isolada de abatedouro avícola. 2014. Dissertação (Mestrado) - Universidade
503 Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 84p.

504

505 Voss-Rech D, Vaz CSL, Alves L, Coldebella A, Leão JA, Rodrigues DP, Back A. 2015. A
506 temporal study of *Salmonella* enterica serotypes from broiler farms in Brazil. Poultry Science.
507 94(3):433-441. doi:10.3382/ps/peu081.

508

509 Vestby LK, Møretrø T, Langsrud S, Heir E, Nesse LL. 2009. Biofilm forming abilities of
510 *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. BMC Veterinary
511 Research. 5:20. doi:10.1186/1746-6148-5-20.

Wirtanen G, Salo S. (2003): Disinfection in food processing – Efficacy testing of disinfectants. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2: 293–306.

Ziech RE, Perin AP, Lampugnan IC, Sereno MJ, Viana C, Soares VM, Pereira JG, Pinto JP de A, Bersot L dos S. 2016. Biofilm-producing ability and tolerance to industrial sanitizers in *Salmonella* sp. isolated from Brazilian poultry processing plants. *Food Science and Technology*. 68:85-90. doi:10.1016/j.lwt.2015.12.021.

TABELAS

Tabela 1. Identificação e classificação dos biofilmes produzidos por três isolados de *S. Minnesota* filogeneticamente distintas isoladas em duas empresas brasileiras durante os anos de 2009 a 2014.

Cepa	Classificação	Origem	Amostra	Data Isolamento
1	Moderado	Abatedouro	Carcaça in natura	13/05/2009
2	Forte	Abatedouro	Peito Salgado	01/09/2009
3	Fraco	Abatedouro	Coração	28/12/2009

Tabela 2. Classificação de biofilmes (DO₆₀₀ nm) de três cepas de *S. Minnesota* isoladas em duas empresas brasileiras durante os anos de 2009 a 2014, produzidos em superfícies de aço inoxidável, poliuretano e polipropileno.

Médias das densidades ópticas						
	Cepa 1		Cepa 2		Cepa 3	
	DO	Classificação	DO	Classificação	DO	Classificação
Tradicional	0,132	Moderado	0,274	Forte	0,054	Fraca
Aço	0,583	Forte	0,287	Forte	0,326	Forte
Poliuretano	0,193	Forte	0,129	Moderado	0,089	Moderado
Polipropileno	0,201	Forte	0,146	Moderado	0,072	Fraco

Tabela 3. Contagens médias de biofilmes por cepas de *S. Minnesota* isoladas em duas empresas durante os anos de 2009 a 2014, produzidos nas superfícies de aço inoxidável, poliuretano e polipropileno.

Média das contagens (Log UFC)*			
	Aço	Poliuretano	Polipropileno
Cepa 1 – Moderado	5,2 ± 0,3	5,0 ± 0,4	5,7 ± 0,3
Cepa 2 – Forte	5,2 ± 0,2	4,9 ± 0,4	5,5 ± 0,2
Cepa 3 – Fraco	5,0 ± 0,2	4,9 ± 0,3	5,2 ± 0,2

*sem diferença significativa em todos os tratamentos (p>0,05) pelo teste de ANOVA.

Tabela 4. Contagens médias (log UFC) de biofilmes de *S. Minnesota* isoladas em duas empresas brasileira durante os anos de 2009 a 2014 (fraco, moderado e forte), em superfícies de aço inoxidável (AI), poliuretano (PU) e polipropileno (PP) após 15 minutos de contato com sanitizantes.

Superfície	Cepas	Biofilme sem tratamento	Sanitizantes	
			Hipoclorito Sódio 1%	Ácido Peracético 0,8%
AI	1*	5,09 ±0,4 ^A	SC	3,93 ±0,3 ^A
	2**	4,99 ±0,3 ^A	SC	4,02 ±0,6 ^A
	3***	4,85 ±0,3 ^A	SC	2,83 ±0,5 ^A
PU	1*	5,04 ±0,4 ^A	SC	4,24 ±0,7 ^A
	2**	4,99 ±0,4 ^A	SC	3,54 ±0,2 ^B
	3***	4,92 ±0,4 ^A	SC	4,63 ±0,3 ^A
PP	1*	5,69 ±0,3 ^A	SC	3,81 ±0,2 ^B
	2**	5,55 ±0,2 ^A	SC	2,45 ±0,3 ^B
	3***	5,36 ±0,2 ^A	SC	3,87 ±0,3 ^B

SC: sem crescimento; Produção de biofilmes: * (moderado); ** (forte); *** fraco; Letras maiúsculas diferentes nas linhas indicam diferença significativa pelo teste de Kruskal-Wallis.

Tabela 5. Contagens médias (log UFC) de biofilmes de *S. Minnesota* formados em diferentes superfícies tratadas com ácido peracético 0,8%, antes e após reincubação por 24 horas.

Superfície	Cepa	Células sésseis após tratamento	Células sésseis Após reincubação
AI	1	3,93 ±0,3 ^{Aa}	6,13 ±0,4 ^{Ba}
	2	4,02 ±0,6 ^{Aa}	6,07 ±0,3 ^{Ba}
	3	2,83 ±0,5 ^{Aa}	6,08 ±0,4 ^{Ba}
PU	1	4,24 ±0,7 ^{Aa}	6,17 ±0,3 ^{Ba}
	2	3,54 ±0,2 ^{Aa}	6,06 ±0,3 ^{Ba}
	3	4,63 ±0,3 ^{Aa}	5,94 ±0,2 ^{Ba}
PP	1	3,81 ±0,2 ^{Aa}	5,95 ±0,3 ^{Ba}
	2	2,45 ±0,3 ^{Ab}	6,11 ±0,3 ^{Ba}
	3	3,87 ±0,3 ^{Aa}	6,34 ±0,4 ^{Ba}

AI=aço inoxidável; PU=poliuretano; PP=polipropileno. 1 (moderado); 2 (forte); 3 (fraco). Letras maiúsculas diferentes nas linhas indicam diferença significativa (*Teste T student*). Letras minúsculas diferentes nas colunas indicam diferença significativa (*Kruskal Wallis*).

REFERÊNCIAS

- AMMOR, M. S.; MICHAELIDIS, C.; NYCHAS, G. J. Insights into the role of quorum sensing in food spoilage. **Journal of Food Protection**, v. 71, p. 1510-1525, 2008.
- AOAC - **International Official Methods of Analysis**. 2009. AOAC International, Gaithersburg, MD.
- BACK, A.; ISHIZUKA, M. M. Principais doenças de notificação obrigatória da Organização Mundial de Saúde Animal. In: *Salmonelose aviária*. 1 ed. São Paulo: Fundação Cargill, p. 120 -189, 2010.
- BOYEN, F. et al. Quorum sensing in veterinary pathogens: mechanisms, clinical importance and future perspectives. **Vet Microbiol.** v.135, p.187–195, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA. **Resolução RDC nº 12, de 02 de Janeiro de 2001**. Aprova o regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1, 67 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação/Secretaria de Vigilância à Saúde Sinan/SVS. **Doenças Transmitidas por Alimentos**. Brasília. 2015. 11 p. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/09/Apresenta----o-dados-gerais-DTA-2015.pdf>> Acesso em: 06 junho 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação/Secretaria de Vigilância à Saúde Sinan/SVS. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. Brasília. 2016. 19p. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta----o-Surtos-DTA-2016.pdf>>Acesso em: 06 junho 2017.
- BURMOLLE, M. et al. Biofilms in chronic infections-a matter of opportunity monospecies biofilms in multispecies infections. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**.v.59, p. 324-336, 2010.
- CAIXETA, D.S. **Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável**. 2008, 75f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Lavras. Lavras, 75f, 2008.
- CAMPOS-GALVÃO, M. E. M. **Caracterização do mecanismo de sinalização por quorum sensing em *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis**. 2012 78p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola). Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, 78p, 2012.
- CDC - PREVENTION. **Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet Surveillance Report for 2012 (Final Report)**. Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, CDC. 2014.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. ***Salmonella***. 2015. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/index.html>>. Acesso em: 23 maio 2017.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Reports of *Salmonella* Outbreak Investigations from 2016**. 2016. Disponível em:<<https://www.cdc.gov/salmonella/outbreaks-2016.html>> Acesso em: 23 maio 2017.

CHEN, X. et al. Structural identification of a bacterial quorum sensing signal containing boron. **Nature**, v. 415, p. 545–549, 2002.

CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. Biofilm formation and control in food processing facilities. Comprehensive reviews in food science and food safety. **Institute of Food Technologists**, v. 2, p. 22-32, 2003.

CHORIANOPOULOS, N.G. et al. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bacteria effect of essential oil and hydrosol of *Stureja thymbra* and comparison with standard acid-base sanitizers. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 104, n. 6, p. 1586-1596, 2008.

COLLA, F. L. et al. Avaliação in vitro de clorexidina, amônia quaternária e ácido peracético frente a amostras de *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola em 2005 e 2009. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 4, p. 289–292, 2012.

CORCORAN, M. ***Salmonella enterica* - biofilm formation and survival of disinfection treatment on food contact surfaces**. 2013, 268p. Thesis for the Doctor of Philosophy, to the National University of Ireland Galway. 268p, 2013.

CORCORAN, M. et al. Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella enterica* biofilm from food contact surface materials. **Appl. Environ. Microbiol.** v.80 ,p. 1507-1514, 2014.

CODA-CERVA (Centrum voor Onderzoek in Diergeneeskunde en Agrochemie, Centre d'Etude et des Recherches Vétérinaires et Agrochimiques). ***Salmonella* Serotypes Analyzed at the CODA-CERVA in 2013**. Federal Public Service Health, Food Chain Security and Environment, Brussels, Belgium, 2014.

CREMIEUX, A.F.J.; DAVIN-REGLI, A. Methods of Testing Disinfectants. In: BLOCK, S.S. ed. **Disinfection, Sterilization, and Preservation**. 5th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2000, p. 1305-1325.

CUNLIFFE, D. et al. Bacterial adhesion at synthetic surfaces. **Appl. Environ. Microbiol.** v.65, p.4995–5002, 1999.

D'AOUST, J.Y.; MAURER, J. *Salmonella* species. In: DOYLE, M.P.; BEUCHAT, L.R. (Ed). **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**. Washington: ASM Press, 2007.

DDTHA -DIVISAO DE DOENCAS DE TRANSMISSAO HIDRICA E ALIMENTAR DO CVE/CCD-SES. Toxinfecção alimentar por *Salmonella* em um evento científico, São Paulo, 2004. **Revista Saúde Pública**, v.39, n.3, p.515-518, 2005.

De CESARE, A.et al.Automated ribotyping and random amplified polymorphic DNA analysis for molecular typing of *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium strains isolated in Italy. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 5, p. 780–785, 2001.

De KEERSMAECKER, S. C.; SONCK, K.; VANDERLEYDEN, J. Let *LuxS* speak up in AI-2 signaling. **Trends in Microbiology**, n. 14, v. 3, p. 114–119, 2006.

De OLIVEIRA, M.E.B. **Surtos de doenças transmitidas por alimentos no estado de São Paulo, 2008-2010**. 2013, 80p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – Curso de Pós-Graduação em Saúde Coletiva. São Paulo, 80 p. 2013.

De OLIVEIRA, D. C. V. et al.Ability of *Salmonella* spp. to Produce Biofilm Is Dependent on Temperature and Surface Material. **Foodborne pathogens and disease**, p. 1–7, 2014.

DÍEZ-GARCÍA, M.; CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C. Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. **Food microbiology**, v. 31, n. 2, p. 173–80, 2012.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J.M. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Review**. Washington, v. 15, n. 2, 167-193, 2002.

EDWARDS, P.R.; BRUNER, D.W. Two new *Salmonella* isolated from Fowls. **Journal of Hygiene**, v.38, n.6, p.716-720, 1938.

EFSA - EFSA and ECDC (European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control). **EFSA explains zoonotic diseases: *Salmonella***. 2014. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/factsheetsalmonella.pdf>. Acesso em: 26 março 2017.

EFSA - EFSA and ECDC (European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control). 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2013 - **EFSA Journal**, v.13, n.1 pp.3991.2015. Disponível em: <<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3991>> Acesso em: 28 março 2017.

FDA - Food and Drug Administration, USA - CFR - **Code of Federal Regulations, Title 21 Food and drugs chapter 1--food and drug administration department of health and human services subchapter b--food for human consumption -, Sec. 110.3-** General Provisions 110.3 -Definitions. Disponível em: <www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfCFR/CFRSearch.cfm> Acesso em: 25 mar 2017.

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite: fatores de virulência envolvidos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.291-296, 2005.

FREITAS, J. Evolução de sorovares Modelo de banco de cepas. In: **Seminário internacional de salmoneloses aviárias**, 2011, Rio de Janeiro, RJ. **Anais...** Campinas: UBABEF, 2011.

FINSTAD, S. et al. *Salmonella* and broiler production in the United States: relationship to foodborne salmonellosis. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 789-794, 2012.

FORSHELL, L. P.; WIERUP M. Salmonella contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. **Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.**, Uppsala, v. 25, n. 2, p. 541-554, 2006.

GARCIA, K. C. de O. D. **Utilização de bacteriófagos ambientais no controle de biofilmes de *Salmonella* spp. em superfícies na indústria de processamento e comercialização de carcaças de frango de corte e derivados.** 2015, 43p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 43p, 2015.

GERSTEL, U.; ROMLING, U. The csgD promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella* Typhimurium. **Research in Microbiology**, v.154, n.10, p.659–667, 2003.

GIBSON, D. L. et al. *Salmonella* produces an O-antigen capsule regulated by AgfD and important for environmental persistence. **Journal of Bacteriology**, v.188, p. 7722-7730, 2006.

GILBERT, P.; ALLISON, D. G.; MCBAIN, A. J. Biofilms in vitro and in vivo: do singular mechanisms imply. **Journal of Applied Microbiology** Symposium Supplement, v. 92, p. 98–110, 2002.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. **Trends in Microbiology** v.13, p.7-10, 2005.

HARRISON, J. J.; TURNER, R. J. CERI, H. Persister cells, the biofilm matrix and tolerance to metal cations in biofilm and planktonic *Pseudomonas aeruginosa*. **Environmental Microbiology**, Canada, n. 7, p. 981-994, 2005.

HOLAH, J. T.; THORPE, R. H. Cleanability in relation to bacterial retention on unused an abraded domestic sink materials. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 69, p. 599-608, 1990.

JAENISCH, F.R.F.; KUCHIISHI, S.S.; COLDEBELLA, A. Atividade antibacteriana de desinfetantes para uso na produção orgânica de aves. **Ciência Rural**, v. 2, n. 40, p. 384-388, 2010.

JOSEPH, B.; OTTA, S.K. .; KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **Int J Food Microbiol**, v.64, p.367–372, 2001.

KARACA, B.; AKCELIK, N.; AKCELIK, M. Biofilm-producing abilities of *Salmonella* strains isolated from Turkey. **Biologia**, v. 68, p. 1-10, 2013.

KASNOWSKI, M.C. et al. Formação de biofilmes na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.8, n.15, julho 2010.

KATSIKOIANNI, M.; MISSIRLIS, Y.F. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial and techniques used in estimating bacteria-material interactions. **European Cells and Materials**, Patras, v. 8, p. 37-57, 2004.

KELLER, L.; SURETTE, M. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. **Nature Reviews in Microbiology**, v. 4, n. 4, p. 248-258, 2006.

KIM, S.; WEI, C. Molecular characterization of biofilm formation and attachment of *Salmonella* enteric serovar Typhimurium DT104 on food contact surfaces. **J Food Protect**, v.72, p. 1841–1847, 2009.

LANDÍNEZ, M.P. **Ribotipificação de sequências intergênicas de isolados de *Salmonella* enterica subespécie enterica provenientes de produtos avícolas do Brasil e da Colômbia**. 2013, 168p. Tese de Doutorado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 168p, 2013.

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

LIANOU, A.; KOUTSOUMANIS, K. P. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella* enterica under various environmental conditions. **International journal of food microbiology**, v. 160, n. 2, p. 171–8, 2012.

LINDSAY, D.; VON HOLY, A. Evaluation of dislodging methods for laboratory-grown bacterial biofilms. **Food Microbiology**, v. 14, p. 383 – 390 1997.

MACHADO, T. R. M. **Avaliação da aderência ao aço inoxidável e ao polietileno por três sorovares de *Salmonella* e da capacidade de desinfecção dessas superfícies**. 2007 143p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Meio

Ambiente)- Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, 143p., 2007.

MACHADO, T. R. M. et al . Avaliação da resistência de *Salmonella* à ação de desinfetantes ácido peracético, quaternário de amônio e hipoclorito de sódio. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 4, p. 475–481, 2010.

MAIJALA, R.; RANTA, J.; SUENA, E. The efficiency of the finnish *Salmonella* control .*Food Control*, v.16, n.8, p.669-675, 2005.

MARTINEZ, M. B.; TADDEI, C. R. Métodos de diagnóstico. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). **Microbiologia**. 5 ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p.117-125.

MEYER, B. Approaches to prevention, removal and killing of biofilms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.51, n.4, p.249 – 253 2003.

MILAN, C.; TIMM, C.D. Fatores de virulência associados à formação de biofilme por *Salmonella* entérica, **Rev. Science and animal health**, v.3, n.1, p. 94-102, 2015.

MILLEZI, A.F. **Ação de óleos essenciais sobre biofilmes formados por *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli***. 2012, 112p. Tese (Doutorado em Microbiologia de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras. 112p, 2012.

MONDS, R.D.; O'TOOLE, G.A. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. **Trends in Microbiol.** v.17, p.73–87, 2009.

MØRETRØ, T. et al. Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. **Journal of applied microbiology**, v. 106, n. 3, p. 1005–12, 2009.

MUNIZ, E. C. **Salmonelas paratíficas em aves: avaliação da resposta imunológica e controle por meio de probióticos**. 2014 98 f. Tese (Doutorado em Patologia veterinária) – Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.Curitiba. 98 f. 2014.

NAWAR, E. M.; KHEDR, A. M. Molecular Studies on *Salmonella* species isolated from chicken. **Alexandria Journal Veterinary Science**, v. 43, n. 1, p. 58-64, 2014.

OLIVEIRA F.A. et al.Use of PCR-ribotyping, RAPD, and antimicrobial resistance for typing of *Salmonella* Enteritidis involved in food-borne outbreaks in Southern Brazil. **J. Infect. Dev. Ctries**, v.1, p. 170-176, 2007.

PEREIRA, A. de A. **Estudo da atividade bactericida de óleos essenciais sobre células planctônicas e sésseis de *Salmonella* spp.** 2014, 94p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 94p. 2014.

PFUNTNER, A. Sanitizers and Disinfectants: The Chemicals of Prevention. **Food Safety Magazine**, august/September, 2011. Disponível em: <<http://www.foodsafetymagazine.com/magazine-archive1/augustseptember-2011/sanitizers-and-disinfectants-the-chemicals-of-prevention/>>. Acesso:12 maio de 2017.

PICKLER, L. et al. Resposta imunológica e uso de ácidos orgânicos em frangos desafiados com *Salmonella* Minnesota. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 4, p.1203, 2014.

PLUMMER, P.J. *luxS* and quorum-sensing in *Campylobacter*. **Front Cell Infect. Microbiol.**v. 2, p. 1-9, 2012. doi: 10.3389/fcimb.2012.00022

POPOFF, M. Y.; BOCKEMÜHL, J.; GHEESLING, L. L. Supplement 2002 (nº 46) to the Kauffmann-White scheme. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 7, p. 568–570, 2004.

PROUTY, A. M.; SCHWESINGER, W. H.; GUNN, J. S. Biofilm formation and interaction with the surfaces of gallstones by *Salmonella* spp. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 5, p. 2640–2649, 2002.

PUI, C. F. et al. Biofilm formation by *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium on plastic cutting board and its transfer to dragon fruit. **International Food Research Journal**, v. 18, p.31-38, 2011.

QUINONES, B. et al. Autoinducer-2productionin *Campylobacter jejuni* contribu test o chicken colonization. **Appl. Environ. Microbiol**, v.75, p.281–285, 2009.

QUINTAES, B. R. et al. Conventional and molecular typing of *Salmonella* Typhi strains from Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 6, 2002.

RAJAN, R. et al. Crystal structure of S-ribosylhomocysteinase (LuxS) in complexwithacatalytic2- ketoneintermediate. **Biochemistry**, v.44, p. 3745–3753, 2005.

RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed).**The rapid alert system for food and feed**.Annual Report of European Comission.60p, 2012.Disponível em:<https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2012_en.pdf >.Acesso em 06 jun. 2016.

RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed).**Salmonella enterica ser. Minnesota (presença/25g) em peitos de frango salgados congelados do Brasil através dos Países Baixos**, 2017 a. Disponível em:<https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=notificationDetail&NOTIF_REFERENCE=2017.0501>.Acesso em 06 jun. 2016.

RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed).**Poultry meat and poultry meat products 04/05/2017 2017.AUG border rejection Germany Brazil (O), Germany Salmonella enterica ser. Minnesota (1 out of 5 samples /25g) in frozen salted chicken breast fillets from Brazil Absence/25g and Poultry meat and poultry meat products 05/05/2017 2017.AUP border rejection Germany Brazil (O), Germany Salmonella enterica ser. Heidelberg (in 1 out of 5 samples /25g) and**

***Salmonella enterica* ser. Minnesota (in 2 out of 5 samples /25g) in frozen salted chicken breasts from Brazil Absence/25g.** 2017 b. Disponível em: <<https://s3-eu-west-1.amazonaws.com/phytocontrol/wp-content/uploads/2017/05/09144341/09-05-17.pdf>>. Acesso em 06 jun. 2016.

RESENDE, A. R. **Fatores de patogenicidade e estudo epidemiológico de *Salmonella* Minnesota de origem avícola.** 2015, 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Uberlândia, 67 f, 2015.

REZK, N. A. et al. Typing of *Salmonella* Typhi strains isolated from Egypt by RAPD PCR. **3 Biotech**, v. 2, n. 1, p. 17-25, 2012.

RODRIGUES, L. R. et al. Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 37, n. 3, 225-230, 2009.

RÖMLING, U.; ROHDE, M.; OLSEN, A.; et al. AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella Typhimurium* regulates at least two independent pathways. **Molecular Microbiology**, v. 36, p. 10–23, 2000.

ROSADO, M. **Biofilme de *Enterococcus faecium* em superfície de aço inoxidável: caracterização tecnológica, modelagem e controle por agentes sanitizantes.** 2009, 98p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Departamento de Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 98p. 2009.

ROSSONI, E.M.M.; GAYLARDE, C.C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International journal of food microbiology**, v. 61, p. 81-85, 2000.

SANTOS, S. S. dos. **Investigação da presença e da formação de biofilmes por estafilococos em micro-usina de beneficiamento de leite.** 2009, 57p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária Preventiva) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, 57p, 2009.

SANCHEZ-RUIZ, C.; MARTINEZ-ROYANO, S.; TEJERO-MONZON, I. An evaluation of the efficiency and impact of raw wastewater disinfection with peracetic acid prior to ocean discharge. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 32, n. 7, p. 159-166, 1995.

SCHAUDER, S.; BASSLER, B. L. The language of bacteria. **Genes e Development**, v. 15, p. 1468-1480, 2001.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos.** 3ª Edição. São Paulo: Varela, 2007.

SILVA, C.F. et al. *Salmonella* Enteritidis formadoras de biofilmes são multirresistentes a antimicrobianos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 42, n. 1229, p. 1- 8, 2014.

SHIRTLIFF, M.E.; MADER, J.T.; CAMPER, A.K. Molecular Interactions in Biofilms. **Chemistry & Biology**, Cambridge, v. 9, n. 8, p. 859 -871, 2002.

SINDE, E. ; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber, and polytetrafluorethylene: The influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, v.17, n.24, p.439-447, 2000.

SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M.; NOVAK, J. S. Quorum sensing: a primer for food microbiologists. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 5, p. 1053-1070, 2004.

SMITH, S. I. et al. Molecular typing of *Salmonella* spp. isolated from food handlers and animals in Nigeria. **International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics**, v. 2, n. 1, p. 73–77, 2011.

SOLANO, C. et al. Genetic analyses of *Salmonella* Enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose. **Molecular Microbiology**, Pomplona, v. 43, n. 3, p. 793- 808 2002.

SOTO, S. M. et al. Potential of three-way randomly amplified polymorphic DNA analysis as a typing method for twelve *Salmonella* serotypes. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 11, p. 4830-4836, 1999.

SOTO, S. M. et al. Usefulness of genetic typing methods to trace epidemiologically *Salmonella* serotype Ohio. **Epidemiology and Infection**, v. 125, n. 3, p. 481–489, 2000.

STEENACKERS, H. et al. *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. **Food Research International**, v.45, n.2, p.502-531, 2012.

STEINEBRUNNER, N et al. *Salmonella* enterica serovar Minnesota urosepsis in a patient with Crohn's disease in the absence of recent or current gastrointestinal symptoms. **Journal of Medical Microbiology**. v. 62, p. 1360–1362, 2013.

SURETTE, M. G.; MILLER, M. B.; BASSLER, B. L. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 96, n. 4, p. 1639–1644, 1999.

TANG P. L. et al. Biofilm forming ability and time course study of growth of *Salmonella* typhi on fresh produce surfaces. **Inter. Food Res. J**, v. 19, n.1, p. 71-76, 2012.

TONDO, E.C. **Microbiologia e sistemas de gestão da segurança de alimentos**. Porto Alegre: Sulina, 2011

TURKI, Y. et al. Comparison of five molecular subtyping methods for differentiation of *Salmonella* Kentucky isolates in Tunisia. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 87-98, 2014.

VAN HOUDT, R. V.; MICHIELS, C. W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 4, p.1117-1131, 2010.

VÁZQUEZ-GARCIDUEÑAS, M.S. et al. Investigation of a food-borne *Salmonella* Oranienburg outbreak in a Mexican prison. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 8, n. 2, p. 143-153, 2014.

VENKOBACHAR, C.; IYENGAR, L.; RAO, A.V.S.P. Mechanism of disinfection: Effect of chlorine on cell membrane functions. **Water Research**, v.11, n.8, p.727-729, 1977.

VIANA, E. S. **Moléculas sinalizadoras de quorum sensing em biofilmes formados por bactérias psicrotróficas isoladas de leite**. 2006, 159p. Tese (Doutorado em Microbiologia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 159p, 2006.

VIDAL, D.R.; RAGOT, C.; THIBAUT, F. Bacterial biofilms and resistance to disinfectants. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v.55, n.2, p.49-54, 1997.

VIRTO, R. et al. Membrane damage and microbial inactivation by chlorine in the absence and presence of a chlorine-demanding substrate. **Appl Environ Microbio**, v.71, p.5022-5028, 2005.

VIVIAN, R.C. **Avaliação da formação de biofilme e sensibilidade ao ácido peracético por *Salmonella* spp. isolada de abatedouro avícola**. 84p, 2014. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Botucatu, 84p, 2014.

VOSS-RECH, D. et al. A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. **Poultry Science**, v. 94, n. 3, p. 433-441, 2015.

XAVIER, K. B.; BASSLER, B. L. *LuxS* quorum sensing: more than just a numbers game. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, p. 191-197, 2003.

WANG, H. et al. Occurrence, antimicrobial resistance and biofilm formation of *Salmonella* isolates from a chicken slaughter plant in China. **Food Control**, v. 33, n. 2, p. 378-384, 2013.

YOON, Y.; SOFOS, J.N. Autoinducer-2 activity of Gram-negative foodborne pathogenic bacteria and its influence on biofilm formation. **Journal of Food Science**, v.73, n.3, p.141-147, 2008.

ZIECH, R.E. et al. Biofilm-producing ability and tolerance to industrial sanitizers in *Salmonella* sp. isolated from Brazilian poultry processing plants. **Food Science and Technology**, v. 68, p.85-90, 2016.

ZOGAJ, X. et al. The multicellular morphotypes of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. **Molecular Microbiology**, v.39, p.1452-1463, 2000.

ZOTTOLA, E.A. Reflections on *Salmonella* and other “wee beasties” in foods. **Food Technology**, v.55, p.60-67, 2001.