

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

TACIANO DOS REIS CARDOSO

***Salmonella* MINNESOTA ISOLADOS DA CADEIA DE PRODUÇÃO AVÍCOLA:
GENES DE VIRULÊNCIA, FORMAÇÃO DE BIOFILMES E INIBIÇÃO COM
BIOCIDAS**

UBERLÂNDIA – MG

Fevereiro, 2019

TACIANO DOS REIS CARDOSO

***Salmonella* MINNESOTA ISOLADOS DA CADEIA DE PRODUÇÃO AVÍCOLA:
GENES DE VIRULÊNCIA, FORMAÇÃO DE BIOFILMES E INIBIÇÃO COM
BIOCIDAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Saúde Animal

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

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Eliane Pereira Mendonça.

UBERLÂNDIA – MG

Fevereiro, 2019

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

C268s
2019 Cardoso, Taciano dos Reis, 1977
 Salmonella Minnesota isolados da cadeia de produção avícola
 [recurso eletrônico] : genes de virulência, formação de biofilmes e
 inibição com biocidas / Taciano dos Reis Cardoso. - 2019.

Orientadora: Daise Aparecida Rossi.

Coorientadora: Eliane Pereira Mendonça.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2019.1251>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Veterinária. 2. Salmonelose. 3. Frango de corte - Doenças. 4.
Biofilmes. I. Rossi, Daise Aparecida, 1963, (Orient.). II. Mendonça,
Eliane Pereira, 1985, (Coorient.). III. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV.
Título.

CDU: 619

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947

**Salmonella MINNESOTA ISOLADOS DA CADEIA DE PRODUÇÃO AVÍCOLA:
GENES DE VIRULÊNCIA, FORMAÇÃO DE BIOFILMES E INIBIÇÃO COM
BIOCIDAS**

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

Uberlândia, 26 de fevereiro de 2019.

Prof. Dra. Daise Aparecida Rossi (Orientadora) – FAMEV/UFU

Prof. Dra. Ana Laura Grazziotin – FAMEV/UFU

Prof. Dra. Daiane Silva Resende – BIÓLOGA

Prof. Dra. Mônica Hitomi Okura – ICTE/UFTM

Prof. Dra. Roberta Torres de Melo – FAMEV/UFU

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

TACIANO DOS REIS CARDOSO, nascido em 20 de dezembro de 1977, na cidade de Uberaba-MG, filho de Edmo dos Reis Cardoso e Vilma de Fátima Cardoso. Realizou o curso de Bacharel em Biomedicina, com o início em agosto de 2001 e conclusão em agosto de 2006, pela Universidade de Uberaba - UNIUBE. Em outubro 2007 deu início ao curso de Pós-graduação – *Stricto-sensu* em Odontologia – Área Biopatologia, concluído em setembro de 2009 pela Universidade de Uberaba - UNIUBE, na qual foi bolsista durante o mesmo período pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Iniciou o Doutorado em Ciências Veterinárias, na área de Clínica Médica e Investigação Etiológica no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária na Universidade Federal de Uberlândia em 2014. Atualmente atua como professor e coordenador do curso de Biomedicina da Faculdade de Patos de Minas-FPM.

Dedico essa tese a minha esposa Desirée Clary, a pessoa que sempre esteve ao meu lado nos bons e maus momentos, uma companheira de garra e amorosa. Sempre me dando conselhos e exigindo o melhor de mim (Te amo). Ao Taciano Filho que nos faz pensar na necessidade de crescimento profissional, moral (você é minha luz).

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Grande Arquiteto do Universo, pelo sopro da vida, e por estar sempre ao meu lado orientando nos caminhos difíceis da evolução do espírito. Por proporcionar estar no ceio de uma família maravilhosa, com princípios de moral, ética e amor. Por fazer parte de uma fraternidade de homens livres e de bons costumes, aonde cada dia vamos lapidando nossa moral nos princípios de caridade.

A minha amada esposa Desirée Clary, que é minha luz, meu caminho, minha força, meu exemplo de pessoa de garra e de fé em Deus. Sua dedicação a nossa família me deu a possibilidade de estar terminando mais este obstáculo. Sem você isto não seria possível. Te amo...

Ao meu Taciano Filho, digo que cada dia que te vejo meu mundo se alegra e que preciso ser um bom exemplo de pai e homem. Você, meu filho, é meu orgulho, minha dádiva divina. Te amo...

Aos meus pais, Edmo e Vilma (por ter-me concedido à existência para minha evolução espiritual), pelo amor, carinho e pelas palavras de incentivo.

À minha madrinha Wilma e minha avó Carmelita, que sempre estiveram presentes na minha educação e na caminhada da vida. Sempre preocupadas e dispostas a ajudar. Sempre serei grato. Amo vocês...

Ao meu avô, Francisco Cardoso "*in memoriam*", meu exemplo de pessoa homem. Te amo "vô".

À minha orientadora, Daise, pela paciência, dedicação e ensinamentos. Uma pessoa maravilhosa de um grande coração e uma excepcional profissional. Ensinou-me que devemos ter garra e dedicação para alcançar nossos objetivos. Muito obrigado por ser este anjo em meu caminho. Que Deus a ilumine sempre e cuide de você e toda sua família.

À minha co-orientadora Eliane por sempre me receber com um sorriso, carinho e me ajudar neste percurso. Pessoa incrível e competente.

À Roberta que tanto me ajudou com seus conselhos, dedicação e ensinamentos. Uma pessoa especial que sempre está com bom humor e uma profissional fora do comum. Obrigado por tudo.

Phelipe (amigo) que esteve presente em tudo me ajudando na pesquisa e falando "Vai dar Certo". Quantas ligações ou mensagens foram enviadas para essas

pessoas. Vocês são pessoas especiais e merecem o melhor do mundo.

Ao meu amigo Saulo, que tanto me ajudou nas conferencias das referências, formatação dos artigos e da tese. “Quem tem amigos nunca está só”. Obrigados por tudo...

À família LABIO, Marcelo, Silvia, Guilherme e tantos outros que deixaram um pouco da sua contribuição. Obrigado a todos, e Deus possa iluminar sempre vocês.

Ao Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada da Universidade Federal de Uberlândia (LABIO-UFU) por disponibilizar o espaço físico e condições para que o projeto pudesse ser executado.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À Fundação Instituto Oswaldo Cruz no Estado do Rio de Janeiro (IOC/FIOCRUZ, RJ, Brasil), pelas cepas isoladas de *Salmonella* Minnesota.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao CNPq e FAPEMIG.

Aos professores que aceitaram compor esta banca de defesa, Daiane, Mônica, Roberta, Ana Laura, Fernanda e Bia. Obrigada por se disponibilizarem a realizar a leitura, correções e avaliação deste trabalho.

Muito obrigado a todos.

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”

Francisco do Espírito Santo

“Leve na sua memória para o resto de sua vida, as coisas boas que surgiram no meio das dificuldades. Elas serão uma prova de sua capacidade em vencer as provas e lhe darão confiança na presença divina, que nos auxilia em qualquer situação, em qualquer tempo, diante de qualquer obstáculo”

Chico Xavier

Salmonella MINNESOTA ISOLADOS DA CADEIA DE PRODUÇÃO AVÍCOLA: GENES DE VIRULÊNCIA, FORMAÇÃO DE BIOFILMES E INIBIÇÃO COM BIOCIDAS

CARDOSO, Taciano dos Reis. **Salmonella Minnesota Isoladas da Cadeia de Produção Avícola: Genes de Virulência, Formação de Biofilmes e Inibição com Biocidas**. 2019. 77 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2019. Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias.

Resumo

O gênero *Salmonella* destaca-se pela alta prevalência entre os micro-organismos mais frequentemente incriminados em surtos de doenças transmitidas por alimentos. Dentre os sorovares, *S. Minnesota* vem apresentando um constante crescimento no número de isolamentos ao longo de toda cadeia de produção avícola brasileira e também na União Europeia e nos Estados Unidos, o que demonstra sua importância e a necessidade de investigar as características de sua emergência para estabelecer medidas de controle mais efetivas. A tese foi dividida em três capítulos, sendo o primeiro referente às considerações gerais dos tópicos abordados nos demais capítulos. O segundo capítulo objetivou avaliar em 20 cepas de *S. Minnesota*, isoladas nos anos de 2009, 2010 e 2014 em plantas de abate de frangos de corte de duas empresas brasileiras, a presença de genes de virulência e de adaptação ambiental para inferir o perigo potencial que representam, e também estabelecer a relação filogenética por PFGE entre os isolados. Foi avaliada a presença dos genes associados a apoptose (*avrA*), estresse oxidativo (*sodC*), invasão (*invA*), os ligados à adesão (*agfA*), à formação de biofilmes (*lpfA*) e ao processo de *quorum-sensing* (*luxS*). Os perfis de virulência gerados demonstraram que as cepas são potencialmente patogênicas e o PFGE demonstrou grande diversidade genética, com 14 pulsotipos, sendo três deles com similaridade maior que 80%. O terceiro capítulo objetivou determinar o índice de formação de Biofilme (IFB) para as 20 cepas de *S. Minnesota* em três temperaturas (4°C/25°C/36°C), assim como, investigar a ação dos agentes biocidas clorexidina 1%, hipoclorito de Sódio 1% e ácido peracético 0,8% na inibição dos biofilmes formados. Os resultados demonstraram que a capacidade de *S. Minnesota* produzir biofilme nas diferentes temperaturas é variável e cepa dependente, mas que as temperaturas de 25 e 36°C são mais favoráveis à sua formação. Todas as cepas apresentaram resistência ao hipoclorito de sódio 1% enquanto que o uso de ácido peracético e cloroxidina demonstraram a mesma eficiência na redução das contagens das cepas resistentes. A existência de cepas tolerantes aos biocidas testados é preocupante e sugere uma possível expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo e/ou a existência de exposição a concentrações subletais no ambiente de produção avícola, representando um potencial real para o desenvolvimento de mecanismos de adaptação. A inclusão de medidas mais rigorosas para impedir a instalação e para garantir a remoção de biofilmes de *S. Minnesota*, aliado a protocolos de monitoramento deve ser uma estratégia na indústria avícola para garantir a inocuidade do alimento produzido.

Palavras-chave: Biocidas, Biofilmes, Frango de corte, Gene, PFGE, Salmonelose.

***Salmonella* MINNESOTA ISOLATED FROM THE POULTRY PRODUCTION CHAIN: VIRULENCE GENES, BIOFILM FORMATION AND INHIBITION WITH BIOCIDES**

CARDOSO, Taciano dos Reis. ***Salmonella* Minnesota Isolated Poultry Production Chain: Virulence Genes, Biofilm Formation and Inhibition with Biocides**. 2019. 77 f. Thesis (Doctorate in Veterinary Science) - Federal University of Uberlândia. Uberlândia, 2019. Graduate Program in Veterinary Sciences.

Abstract

The *Salmonella* genus stands out for its high prevalence among the microorganisms most often found in outbreaks of foodborne diseases. Among the serovars, *S. Minnesota*, has been showing a constant growth in the number of isolations along the entire Brazilian poultry production chain and also in the European Union and the United States, which demonstrates its importance and the necessity to investigate the causes of its emergence to establish more effective control measures. The thesis was divided in three chapters, the first referring to the general considerations of the topics covered in the other chapters. The second chapter aimed to evaluate the presence of virulence genes and environmental adaptation in 20 strains of *S. Minnesota*, isolated in the years 2009, 2010 and 2014, in broiler slaughter plants of two Brazilian companies, in order to infer the risk potential that they represent, and also to establish the phylogenetic relationship among isolates. The presence of genes associated with apoptosis (*avrA*), oxidative stress (*sodC*), invasion (*invA*), adhesion-related (*agfA*), biofilm formation (*lpfA*) and quorum-sensing process (*luxS*) was evaluated. The virulence profiles generated showed that the strains are potentially pathogenic and PFGE showed great genetic diversity, with 14 pulse types, three of them with homology greater than 80%. The third chapter aimed to determine the Biofilm formation index (IFB) for the 20 strains of *S. Minnesota* at three temperatures (4°C / 25°C / 36°C), as well as to investigate the action of the following biocidal agents: 1% chlorhexidine, 1 % sodium hypochlorite and 0.8% peracetic acid in inhibition of formed biofilms. The results demonstrated that the ability of *S. Minnesota* to produce biofilm at different temperatures is variable and strain dependent, but temperatures of 25 and 36°C are more favorable to their formation. All strains were resistant to 1% sodium hypochlorite whereas the use of peracetic acid and chlorhexidine demonstrated the same efficiency in reducing counts of resistant strains. The presence of tolerant strains to the biocides tested is of concern and suggests a possible expression of genes related to oxidative stress and / or exposure to sublethal concentrations in the poultry production environment, representing a real potential for the development of adaptation mechanisms. The inclusion of stricter measures to prevent the installation and to ensure the removal of *S. Minnesota* biofilms, coupled with monitoring protocols, should be a strategy in the poultry industry to ensure the safety of the food produced.

Keywords: Biocides, Biofilms, Broiler, Gene, PFGE, Salmonellosis.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II		Página
Figura 1	Dendrograma referente à avaliação dos isolados de <i>S. Minnesota</i>	66
CAPÍTULO III		
Figura 1	Comportamento da biomassa de 20 cepas <i>S. Minnesota</i> em diferentes temperaturas.....	76
Figura 2	Variação da biomassa de biofilmes de três cepas de <i>S. Minnesota</i> de acordo com o perfil do IFB.....	77
Figura 3	Contagens de biofilmes de <i>S. Minnesota</i> (Log de UFC.mL ⁻¹) antes e após manutenção por 15 minutos em solução de ácido peracético 0,8%, hipoclorito de sódio 1% e clorexidina 1%.....	77

LISTA DE TABELAS E QUADROS

CAPÍTULO II		Página
Tabela 1	Genes de virulência, concentração, números de pares de bases dos amplicons (pb), sequência dos <i>primers</i> e trabalhos de referência utilizados para os protocolos de amplificação.....	65
Tabela 2	Perfis de virulência de <i>S. Minnesota</i> isolados de plantas de abate localizadas em três estados brasileiros durante os anos de 2009, 2010 e 2014.....	65
 CAPÍTULO III 		
Quadro 1	Classificação do índice de formação de biofilme (IFB).....	75
Quadro 2	Classificação das cepas de <i>S. Minnesota</i> , de acordo com o Índice de Formação de Biofilmes (IFB) em diferentes temperaturas.....	75
Quadro 3	Perfil da formação de biofilme em diferentes temperaturas por 20 cepas de <i>S. Minnesota</i> , de acordo com o IFB.....	75
Quadro 4	Perfis de resistência aos agentes químicos testados em 20 biofilmes de <i>S. Minnesota</i>	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Als: auto - indutores

ABPA: Associação Brasileira de Proteína Animal

ATCC: American Type Culture Collection

BHI: Caldo infusão de cérebro e coração

CDC: Centers for Disease Control and Prevention

DTAs: Doenças Transmitidas por Alimentos

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DO: Densidade óptica

EFSA: European Food Safety Authority

EUA: Estados Unidos da América

FAO: Food and Agriculture Organization

FIOCRUZ: Fundação Instituto Oswaldo Cruz

H₂O: Água

IP: Ilhas de Patogenicidade

Kb: Kilobase

LABIO: Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada

LPS: lipopolissacarídeos

MAPA: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

mm: Milímetro

mM: Milimolar

ng: Nanograma

nm: Nanômetro

NaCl: Cloreto de sódio

pb: pares de base

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis

pH: Potencial Hidrogeniônico

QS: quorum –sensing

RASFF: Rapid Alert System for Food and Feed

SPI: Ilhas de Patogenicidade em *Salmonella*

SIF: Serviço de Inspeção Federal

SM: Salmonella Minnesota

TSA: Agar Triptona de Soja

U: Unidade

UE: União Européia

UFC: Unidades Formadoras de Colônias

UPGMA: Unweighted Pair Group Method With Arithmetic Mean

V: Voltagem

WHO: World Health Organization

XLD: Ágar de desoxicolato-lisina-xilose

µg: Micrograma

µl: Microlitro

µm: Micrômetro

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO I - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	17
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVOS.....	20
2.1 OBJETIVO GERAL.....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3.0 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3.1 Gênero <i>Salmonella</i>	21
3.2 <i>Salmonella</i> Minnesota: isolamentos na cadeia avícola e relação com saúde pública.....	22
3.3 Genes de virulência e adaptação ambiental no gênero <i>Salmonella</i>	24
3.4 Biofilmes de <i>Salmonella</i>	28
3.5 Processo de higienização.....	30
3.6 <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> – PFGE.....	32
REFERÊNCIAS.....	34
CAPÍTULO II - POTENCIAL VIRULENTO E DISSEMINAÇÃO DE <i>Salmonella</i> MINNESOTA ISOLADAS NA CADEIA DE PRODUÇÃO AVÍCOLA.....	45
CAPÍTULO III - INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE <i>SALMONELLA</i> MINNESOTA E EMERGÊNCIA DA SUA TOLERÂNCIA A BIOCIDAS.....	67

CAPÍTULO I

CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Salmonella* é classificado como um patógeno zoonótico capaz de infectar o homem e uma grande variedade de espécies animais de forma assintomática ou causando enfermidades, apresentando quadros clínicos de leves a graves. Casos e surtos de salmonelose envolvendo humanos e outros animais como aves e suínos resultam em prejuízos bilionários para saúde pública e para as indústrias importadoras e exportadoras de alimentos de origem animal (FAO / WHO, 2009; EFSA, 2015; LEE et al., 2015).

Nos anos de 2016 e 2017, tanto no Brasil, quanto nos Estados Unidos e na União Europeia, os surtos de salmonelose acometendo humanos e animais foram responsáveis por internações, mortes e prejuízos às indústrias, sendo necessária a emissão de alertas e medidas de controle nas importações e exportação de produtos alimentícios (BRASIL, 2016; BRASIL, 2017; CDC 2017; EFSA, 2017). Na União Europeia, 94.530 casos de salmonelose humana foram confirmados em 2016, resultando numa taxa de notificação de 20,4 casos por 100.000 habitantes (EFSA, 2017). No Brasil, mesmo com medidas adotadas pelas agências de controle promovendo a biossegurança alimentar e a adoção de normas para restringir o número de patógenos, os surtos de salmonelose no período compreendido entre 2000 a 2017 permaneceram altos, representando 32,3% dos casos de doenças transmitidas pelos alimentos (DTAs) em que o agente etiológico foi identificado (BRASIL, 2018).

Dentre as fontes de infecção por *Salmonella* aos humanos, o consumo de produtos de origem animal, em particular carne de frango e seus derivados são os alimentos mais incriminados e, por isso, seu consumo pode ser considerado como fator de risco para possíveis infecções em humanos (FAO / WHO, 2009; EFSA, 2015; EFSA, 2017).

Há variações entre os sorovares de *Salmonella* envolvidos nas infecções humanas, que dependem do período de isolamento e da região geográfica, porém, os sorovares *S. Enteritidis* e *Typhimurium* permanecem entre os mais isolados. Os 28 estados membros da União Europeia em 2014 registraram 23,4 casos de salmonelose por 100.000 habitantes sendo que os sorotipos *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* representaram 44,4% e 17,4% dos isolamentos, respectivamente (EFSA, 2015). Nos Estados Unidos em 2016, dentre os 7.554 casos de salmonelose

humana confirmados, os sorotipos *S. Enteritidis* (17%), *S. Newport* (11%) e *S. Typhimurium* (9%) foram os mais prevalentes (CDC, 2017). Porém, outros sorovares tem ganhado importância, seja por sua emergência como causa de doença humana ou pelo aumento no número de isolamentos em alimentos ou animais de produção. *Salmonella* Minnesota é um dos sorovares que vem se destacando no Brasil e no mundo pelo aumento do número de isolamentos na cadeia produtiva avícola (CODA-CERVA, 2014; VOSS-RECH et al., 2015).

Na Bélgica, no ano de 2009, somente 2% dos isolados eram identificados como pertencentes ao sorovar *S. Minnesota*. Porém, em 2012, este sorovar tornou-se o segundo mais prevalente em frangos de corte, representando 17,6% do total de isolamentos (CODA-CERVA, 2014).

No Brasil, *S. Minnesota* está entre os mais notificados em aves (FREITAS, 2011). Esta emergência também foi observada por COSTA et al. (2013) em carcaças de frangos e produtos avícolas e por VOSS-RECH et al. (2015) em plantéis avícolas.

O *Rapid Alert System for Food and Feed* (RASFF) nos anos de 2012 e 2013, emitiram na Europa alertas da presença do sorovar *S. Minnesota* em carne de frango importada do Brasil (RASFF, 2012; RASFF, 2013). Novamente em 2017, novo alerta foi emitido, com *S. Minnesota* identificada em quatro amostras de peitos de frangos congelados importadas do Brasil (RASFF, 2017a; RASFF, 2017b).

CORCORAN et al. (2013) relataram que uma das hipóteses do constante aumento no número de isolamentos de *S. Minnesota* é a capacidade deste sorovar se associar em comunidades na forma de biofilmes, o que facilitaria a sua perpetuação no ambiente por longos períodos, aumentando a possibilidade de infecção das aves e da contaminação da carne. Esta hipótese foi corroborada por estudos conduzidos no Brasil por MACHADO et al. (2017) em duas plantas de abate, em que em uma delas, *S. Minnesota* correspondeu a 91,3% dos isolados. Os autores atribuíram a possível permanência das cepas deste sorovar por longos períodos nesta planta como indicativo da formação de biofilmes.

Novos estudos são necessários para conhecer as características de *S. Minnesota*, incluindo seu potencial perigo à saúde pública, sua disseminação, formação de biofilmes e formas para o seu controle. Estes conhecimentos poderão auxiliar no estabelecimento de medidas para a avaliação do risco de sua presença em alimentos e na implantação de medidas preventivas ou para o seu controle. Estes estudos são justificados pelo fato de que 33,1% da carne de frango produzida no

Brasil são destinadas ao mercado externo e que o país é o segundo maior produtor e maior exportador mundial (ABPA, 2018), e ainda, que a presença de *Salmonella* é uma barreira sanitária à exportação (FAO / WHO, 2009).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Determinar em cepas de *S. Minnesota* isoladas em duas plantas industriais brasileiras com ciclo completo de produção e sistema de integração, habilitadas pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) para o abate e comercialização de carne de frangos no comércio interno e exportação, o perfil de virulência, a biodiversidade genética, a capacidade para produzir biofilmes e a eficiência do uso de agentes químicos no seu controle, e ainda, avaliar o perigo potencial que podem representar para a saúde pública.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar nas cepas de *S. Minnesota* previamente isoladas:

- i) a presença dos genes de virulência e de adaptação ambiental associados a apoptose (*avrA*), estresse oxidativo (*sodC*), invasão (*invA*), adesão e biofilme (*agfA*, *sefA* e *lpfA*) e *quorum-sensing* (*luxS*) por meio de PCR;
- ii) os perfis gênicos, considerando o número e tipos de genes (virulência e adaptação ambiental) determinados em cada uma das cepas;
- iii) a relação filogenética entre os isolados, verificando a biodiversidade, a disseminação dos clones, agrupamento, assim como, a relação dos perfis gênicos de virulência e adaptação ambiental;
- iv) o risco potencial que as cepas representam de causar infecções, considerando a presença dos genes e a disseminação dos perfis;
- v) o potencial para formação de biofilmes de forma qualitativa e quantitativa sob diferentes temperaturas ;

vi) a atuação dos agentes químicos: clorexidina 1% , hipoclorito de sódio 1% e ácido peracético 0,8% nos biofilmes formados.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* foi primeiramente isolado pelo médico veterinário norte americano Daniel E. Salmon em 1884 de intestino de porco, e tornou-se um dos mais importantes gêneros bacterianos associado às doenças transmitidas pelos alimentos (RYAN et al., 2017).

Este gênero pertence à família Enterobacteriaceae, são bastonetes Gram negativos, não esporogênicos, aeróbicos ou anaeróbios facultativos, oxidase negativos e catalase positivos, reduzem nitrato a nitrito, formam ácido e gás a partir de glicose, não fermentam a lactose e a sacarose, produzem H₂S, não produzem indol ou hidrolisam ureia e descarboxilam lisina e ornitina (TINDALL et al., 2005).

A maioria das espécies de *Salmonella* são móveis pela presença de flagelos peritríquios, com exceção dos sorovares *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*. Sua temperatura ótima de crescimento está próxima a 36°C, no entanto, há registros de crescimento entre 2°C e 4°C, podendo chegar até a 54°C. Sobrevivem a uma ampla faixa de pH, de 3,8 a 9,5, com um crescimento ótimo entre pH 6,5 e 7,5. Necessitam de atividade de água superior a 0,94, sendo que valores inferiores a estes, inibem seu desenvolvimento. São patógenos zoonóticos capazes de infectar humanos e uma variedade de espécies animais, como aves, suínos, bovinos, animais domésticos. O gênero é amplamente distribuído, sobrevivendo em diversos ambientes e hospedeiros (HEW et al., 2005; D'AOUST; MAURER, 2007; GERMANO; GERMANO, 2008; WHO, 2015; ADLEY; RYAN, 2016).

A classificação e nomenclatura do gênero *Salmonella* passou por diversas modificações (HEYNDRIKX et al., 2005). Atualmente adota-se a presença de duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, sendo que *S. enterica* possui seis subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *indica* (TINDALL et al., 2005; GRIMONT; WEILL; 2007; LAN;

REEVES; OCTAVIA, 2009; SYLVIE ISSENHUTH-JEANJEAN et al., 2014; MIKALOVA et al., 2017).

A classificação das *Salmonellas* em sorotipos proposto por White-Kaufmann-Le Minor é amplamente empregada. *Salmonela* enterica possui mais de 2600 sorovares e *Salmonela bongori*, 22. A sorotipagem separa as cepas em diferentes grupos com base em sua composição antigênica presente na parede celular (antígenos somáticos “O”), nos flagelos (antígenos flagelares “H”) e na cápsula (antígeno capsular “Vi”), este último, ocorrendo em três sorotipos: S. Typhi, S. Paratyphi C e S. Dublin (BRENNER et al., 2000; POPOFF e LE MINOR, 2005; GRIMONT e WEILL, 2007; FERREIRA e CAMPOS, 2008; NATARO et al., 2011).

Neste estudo foi utilizado a nomenclatura proposta pelo *Centers for Disease Control and Prevention*, Atlanta, E.U.A. (CDC, 2011), em que o gênero, a espécie e subespécie são grifados em itálico e o sorovar com a primeira letra maiúscula, sem itálico, como exemplo: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sorovar Minnesota, sendo aceita a grafia somente com o nome do gênero em itálico, seguida do sorovar com a primeira letra maiúscula, sem itálico: *Salmonella* Minnesota ou S. Minnesota (CDC, 2011; RESENDE, 2015).

3.2 *Salmonella* Minnesota: isolamentos na cadeia avícola e relação com saúde pública

Salmonella Minnesota foi isolada pela primeira vez em 1936 pelo Dr. B.S. Pomeroy em uma fazenda de criação de perus no estado de Minnesota nos EUA. Após este isolamento, estudos sorológicos demonstraram se tratar de um novo sorovar de *Salmonella*, denominado S. Minnesota (EDWARDS; BRUNER, 1938).

Dentre os sorovares de *Salmonella*, S. Minnesota vem se destacando pelo aumento do número de isolamentos na cadeia produtiva avícola no Brasil e no mundo (CAMPOS et al., 2018; RASFF, 2017a; RASFF, 2017b).

No Brasil, os principais sorovares identificados e notificados a partir do isolamento de aves sofrem constantes mudanças, e incluem: *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Minnesota, *Salmonella* Agona e *Salmonella* Typhimurium (FREITAS, 2011).

Apesar de o sorovar Minnesota possuir pouco envolvimento em doença humana, STEINEBRUNNER et al. (2013) relataram o primeiro caso clínico

envolvendo este sorovar em um paciente imunodeprimido pela síndrome de Crohn's na cidade de Heidelberg, Alemanha. O paciente apresentava caso de uroseps ou seps grave, porém, por se tratar de um caso isolado, não permitiu estabelecer sua importância em saúde pública.

Mesmo ainda não tendo sido identificada sua importância em saúde pública, *S. Minnesota* tem trazido grandes preocupações às indústrias exportadoras, já que em alimentos, geralmente não se avalia o sorovar, sendo somente a presença do gênero suficiente para sua condenação. O aumento no número de isolamentos na cadeia de produção de carne de aves e o pouco conhecimento de seu potencial zoonótico pode se traduzir em barreira sanitária às exportações, deixando o país vulnerável a embargos (FREITAS, 2011; CODA-CERVA, 2014; VOSS-RECH et al., 2015).

A Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA) em seu relatório anual em 2018 relatou que 33,1% da carne de frango produzida no Brasil é destinada ao mercado externo. O Brasil com a proximadamente 13.056 mil toneladas tornou-se o segundo maior produtor de carne de frango no mundo, estando atrás apenas dos Estados Unidos, que produz 18.596 mil toneladas. Mas na exportação, o Brasil ocupa o lugar de maior exportador mundial de carne de frango e seus derivados, seguido dos EUA e UE. Os países com maior expressão de importação da carne de frango brasileira são a África do Sul, Arábia Saudita, Japão, México e UE (ABPA, 2018).

Pela importância sanitária da positividade de *Salmonella* spp na cadeia avícola, o o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (Mapa) instituiu a Instrução Normativa da Secretaria de Defesa Agropecuária no. 20 em 21 de outubro de 2016, com o objetivo de realizar um maior controle e reduzir os embargos por meio de um monitoramento extensivo de *Salmonella* spp nos estabelecimentos avícolas registrados no Serviço de Inspeção Federal – "SIF" (BRASIL, 2016).

COSTA et al. (2013) no Brasil, constataram que *S. Minnesota* foi o segundo sorovar mais prevalente, quando avaliaram 12.582 cepas oriundas de carcaças de frangos e produtos avícolas isoladas entre os anos de 2007 e 2011. O mesmo ocorreu após análise de 82 cepas de *Salmonella* spp. isoladas de plantéis avícolas brasileiros por VOSS-RECH et al. (2015) que identificaram 15 sorotipos diferentes, sendo que os mais prevalentes: *S. Minnesota* (40,24%), *S. Infantis* (14,63%) e *S. Heidelberg* (7,31%), demonstrando a emergência desses sorovares no país.

Em estudo conduzido no Brasil por Machado et al. (2017) nos anos de 2012 e 2013, duas plantas de abate de uma empresa, localizadas no estado de Mato Grosso

do Sul (planta A) e em Santa Catarina (planta B), também foi observada a emergência de *Salmonella* Minnesota, que foi o sorovar mais frequentemente isolado (91,3%) na planta A. Os autores relataram que a permanência de cepas por longo período em plantas de abate pode indicar a formação de biofilmes, devendo as empresas adotarem novas medidas de prevenção e controle.

A detecção de *Salmonella* em carne de aves produzidas no Brasil e exportadas para Portugal nos anos de 2014 e 2015 demonstrou além da presença, a resistência a cefalosporina de espectro estendido em cepas de *S. Heidelberg* e *S. Minnesota* (CAMPOS et al., 2018). A resistência antimicrobiana é um problema de saúde pública mundial.

Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO / WHO, 2009), o monitoramento e a vigilância demonstraram que a principal causa de enfermidades transmitidas por alimentos é devida a patógenos zoonóticos. Considerando que *Salmonella* é um dos agentes etiológicos mais prevalente nestas enfermidades no Brasil e no mundo, e que o sorovar *S. Minnesota* apresenta aumento na prevalência na avicultura brasileira, estudos que colaborem no entendimento de sua epidemiologia e nos métodos para seu controle trazem contribuição às indústrias, autoridades sanitárias e à segurança alimentar.

3.3 Genes de virulência e adaptação ambiental no gênero *Salmonella*

Os mecanismos pelos quais o gênero *Salmonella* interage com os hospedeiros dependem de vários fatores relacionados ao hospedeiro e à bactéria. Para resultar em doença, um dos fatores que pode ser destacado é a presença de genes associados à virulência e adaptação ambiental, entre eles, genes relacionados à presença de fímbrias, flagelos, habilidade de penetrar, replicar nas células epiteliais dos seus hospedeiros e a capacidade de formar biofilmes (VIEIRA, 2009; MENDONÇA, 2016).

O potencial patogênico de *Salmonella* spp está relacionada a presença de genes de virulência e adaptação, entretanto, a patogenicidade é variável entre os indivíduos devido às combinações de presença/ausência de determinados genes e também, na capacidade de expressá-los. A utilização de marcadores moleculares de virulência relacionados aos processos de invasão e adesão celular, formação de biofilmes e aos mecanismos de resistência às condições de estresse ambiental tem

indicado o grau de patogenicidade de estirpes isolados de frangos ou da carne destes animais e os riscos ao consumidor (OCHOA; RODRIGUES, 2005; BORGES et al., 2018).

O processo de invasão por *Salmonella* ao hospedeiro está ligado à transferência de proteínas efetoras para o interior das células eucarióticas. Estas proteínas são secretadas pelo sistema de secreção Tipo III (T3SS) que é codificada pelos genes *inv*, *spa*, *prg* e *org*, que estão localizados em ilhas de patogenicidade, como a SPI-1 (*Salmonella pathogenicity island I*), que é a ilha de patogenicidade mais bem estudada das 17 ilhas de patogenicidade em *Salmonella*. A SPI-1 também codifica o antígeno Vi presente apenas nos sorotipos de *Salmonella* (*S. Typhi*, *S. Paratyphi* e *S. Dublin*), e SPI-2 que está relacionado a infecções sistêmicas e codifica o sistema de secreção Tipo III (SCHMIDT e HENSEL, 2004; FERREIRA e CAMPOS, 2008; HARAGA; OHLSON; MILLER, 2008).

As bactérias Gram-negativas desenvolveram cinco sistemas de secreção (I, II, III, IV e V) para facilitar a passagem das proteínas efetoras pela membrana externa até ao interior das células dos hospedeiros. A expressão do sistema de secreção tipo III parece ser altamente conservado no gênero *Salmonella* e é ativado pelo contato da bactéria com a célula do hospedeiro, permitindo que as proteínas efetoras se desloquem para o interior da célula (TEMME et al., 2008; FERREIRA e CAMPOS, 2008). A interiorização das proteínas efetoras leva a mudanças no citoesqueleto de actina formando ondulações nas superfícies das células do hospedeiro, denominado “*ruffles*”, permitindo a proliferação intracelular de *Salmonella* spp. (OCHOA e RODRIGUES, 2005; FERREIRA e CAMPOS, 2008; VIEIRA, 2009).

Para infectar um hospedeiro, *Salmonella* necessita invadir as células do epitélio intestinal. GALAN e CURTISS (1989) identificaram um operon *inv* (invasibility) composto de três genes, *invABC*, que estavam relacionados a capacidade de *S. Typhimurium* invadir células em cultivo celular. Posteriormente, os mapeamentos genéticos de *S. Typhimurium* demonstraram 15 genes para o operon *inv* (*invABCDG* até *invO*), onde o gene *invA* é o primeiro no operon, e parece ser essencial na invasão de células epiteliais por sorotipos de *Salmonella enterica*, e é também, altamente conservado (PORTER; CURTISS, 1997).

No Egito foram analisadas 100 amostras de carnes coletadas em supermercados, sendo 50 de carne bovina e 50 de aves, e delas, 16% foram positivas para *Salmonella*. A positividade foi de 26% (13/50) na carne bovina e 6% (3/50) na

carne de aves. Todos os isolados de *Salmonella* foram positivos para o gene *invA* (100%), e isto levou os autores a afirmar que o gene *invA* parece ser bastante conservado em todos os sorovares de *Salmonella* (KARMI, 2013).

BORGES et al. (2013) analisaram nove genes (*invA*, *agfA*, *lpfA*, *sefA*, *avrA*, *hilA*, *sopE*, *spvC* e *sivH*) associados à virulência em 84 cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas entre 1996 e 2010 de diferentes fontes aviárias, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Estes autores constataram 100% da presença dos genes *invA*, *sefA*, *avrA*, *hilA* e *sivH*, 99% das cepas possuíam os genes *sopE* e *lpfA*, 96% continham o gene *agfA* e 92% dos isolados possuía o gene *spvC*.

Em estudo realizado no Brasil em 237 cepas de *Salmonella enterica* isoladas de alimentos (ROWLANDS et al. 2014), também determinaram 100% de presença para os genes *invA* e *avrA* nas cepas analisadas.

Ao investigarem 300 amostras de carne bovina na Tunísia (OUESLATI et al. 2016), observaram presença de *Salmonella* spp. em 5,7% (17/300). Seis sorotipos foram identificados, incluindo *S. Montevideo* (8/17), *S. Anatum* (3/17), *S. Minnesota* (2/17), *S. Amesterdam* (2/17), *S. Kentucky* (1/17) e *S. Brandenburg* (1/17). Todas as cepas isoladas apresentavam 100% de presença do gene *invA*.

Outra importante característica de patogenicidade para o gênero *Salmonella* é a fixação da bactéria à célula hospedeira, já que para a invasão, necessitam entrar anteriormente em contato, aderir e se fixar a um ou mais tipos celulares do tecido intestinal. Estas bactérias utilizam o repertório de fimbrias, as quais estão relacionadas à adesão em diferentes células epiteliais e a matriz extracelular, formação de biofilmes e motilidade. As mais frequentes são fimbria tipo 1 (codificadas pelo gene *fim*), fimbria fina agregativa (codificada pelo gene *agf*), fimbria plasmideal (codificada pelo gene *pef*) e fimbria polar longa (codificada pelo gene *lpf*) (GIBSON et al., 2007; FERREIRA e CAMPOS, 2008).

As fimbrias possuem especificidades variadas em relação aos hospedeiros, sendo as características das fimbrias tipo 1 ainda pouco conhecidas. Já as fimbrias finas agregativas são codificadas pelo operon *agfBAC* cujo gene *agfA* promove a interação entre o patógeno e o epitélio intestinal do hospedeiro, ligando-se a proteínas que irão auxiliar na adesão, formação da matriz extracelular, formação de biofilme, persistência ambiental e auto-agregação de *Salmonella* spp, entre elas, a fibronectina, permitindo a sobrevivência da bactéria (COLLINSON et al., 1996; WHITE et al., 2006; GIBSON et al., 2007).

A fímbria polar longa está entre as maiores fimbrias relatadas, e é codificada pelo gene *lpfA*, foi identificada inicialmente em uma cepa de *S. Typhimurium*, e está localizada na região mais polar da bactéria. O operon *lpfABCDE* possui cinco genes e é observado apenas no gênero *Salmonella*. O operon *lpf* está associado ao tropismo pelas placas de Peyer do intestino e à imunidade cruzada entre diferentes sorovares de *Salmonella* nos diferentes hospedeiros (NORRIS; BÄUMLER, 1999; OCHOA, RODRÍGUES, 2005).

MOURA et al. (2014) analisaram 86 cepas de *Salmonella* spp. isoladas de três lotes de suínos em granja de terminação sob inspeção oficial no Brasil e analisaram separadamente a presença de três genes de virulência: *invA*, *agfA* e *lpfA*. A co-ocorrência dos três genes foi identificada em 73,34% dos isolados, enquanto que genes *invA* e *agfA* foram detectados em 100% das cepas e o gene *lpfA* em 80,63%.

A presença da fímbria SEF14, foram observadas por (CLOUTHIER et al., 1993) ao avaliarem cepas de *S. Enteritidis*, estas fimbrias são formadas e expressas pela presença do operon *sef*, com três subunidades *sefA*, *sefB* e *sefC*. Já estudo desenvolvido por COLLINGHAN e WOODWARD (2001) identificaram mais dois genes *sefD* e *sefE* no operon *sef*. O gene *sefA* codifica as fimbrias, *sefB* codifica uma proteína da membrana externa, *sefC* é o maior componente da fímbria, e *sefD* codifica uma adesina. Esta fímbria está relacionada com adesão e invasão à placa de Peyer no intestino delgado e a sobrevivência em macrófagos. Na ausência do gene *sefA*, os genes *sefB* e *sefC* não se expressam (MIRMOMENI et al., 2008).

ZOU et al. (2012), nos Estados Unidos, entre os anos de 2009 e 2010, avaliaram 425 isolados clínicos de *S. Enteritidis* de origem humana responsáveis por surtos de salmonelose devido ao consumo de ovos contaminados. A maioria dos isolados (422/425; 99,3%) apresentou os genes de virulência *invA* e *sefA*.

Estudos genômicos comparativos entre os sorovares de *Salmonella enterica*, demonstraram que sua patogenicidade está relacionada a proteínas expressas pelos genes presentes em suas ilhas de patogenicidade específicas, auxiliando esses patógenos na capacidade de invasão, adesão, manutenção no meio ambiente e formação de biofilmes (JACOBSEN et al., 2011; MCWHORTER e CHOUSALKAR, 2015).

HARDT e GALA (1997) demonstraram em estudos com cepas de *S. Typhimurium*, a presença do gene *avrA* na ilha de patogenicidade tipo III. A proteína

efetora *avrA* possui um papel importante na adaptação ao meio com a inibição do processo inflamatório e leva a apoptose em culturas de células. Outros pesquisadores demonstraram que a proteína *avrA*, faz um processo de translocação para o interior da célula do hospedeiro alterando sua resposta imune frente ao micro-organismo e que esta resposta pode estar ligada a SPI-1 e SPI- 2, podendo ser localizada ou sistêmica. O gene *avrA* está presente em aproximadamente 80% das cepas de *Salmonella enterica*, com exceção de *S. Typhi* e *S. Paratyphi*, que não possuem este gene (GIACOMODONATO et al. 2014).

3.4 Biofilmes de *Salmonella*

Biofilmes são comunidades bacterianas nas quais as células de uma ou de diferentes espécies se aderem umas às outras a uma superfície viva ou inerte. Estas células são envolvidas em uma matriz polimérica extracelular composta principalmente exopolissacarídeo (EPS), proteínas e ácidos nucléicos. As formações destes biofilmes podem impactar na saúde pública, onde estes microrganismos sésséis podem se tornar resistentes os vários antimicrobianos se tornando fontes constantes de contaminação (HALL-STOODLEY e STOODLEY, 2009; FLEMMING e WINGENDER, 2010; AZEVEDO e CERCA, 2012).

A formação de biofilmes de patógenos ou deteriorantes em superfícies de contato com alimentos é uma grande preocupação para as indústrias, podendo levar a perdas econômicas e embargos sanitários. Dentre os fatores que podem ser facilitadores para a colonização ambiental e consequente formação de biofilmes podem ser destacadas, a falta de higienização adequada, falta do rodizio no uso de bases desinfetantes e deficiências nas instalações pela presença de equipamentos inadequados com bordas e frestas, que dificultam a higienização (GRAM et al., 2007; HUNG, HENDERSON, 2009; SERENO et al., 2017; BORGES et al., 2018).

Uma das dificuldades no controle de *Salmonella* no ambiente está ligada à sua capacidade de formação de biofilmes. Esta estrutura confere maior resistência aos antimicrobianos, aos agentes químicos, às condições adversas do ambiente, às variações de temperatura, às concentrações de oxigênio e de privação de nutrientes (STEENACKERS et al., 2012; BORGES et al., 2018).

A formação de biofilme pelos micro-organismos geralmente é uma resposta adaptativa dos mesmos às injurias do ambiente, incluindo aí alterações no pH,

tensão de oxigênio, temperatura, nutriente e osmolaridade. A resposta ao estresse pode ser regulada pela expressão de genes específicos e pela formação de uma matriz extracelular, que leva à maior sobrevivência e contaminação dos alimentos (GERSTEL; RÖMLING, 2003; MILAN; TIMM, 2015a).

BORGES et al. (2018) avaliaram no Brasil, a capacidades de formação de biofilmes por 243 cepas de *Salmonella enterica*, pertencentes a 11 sorotipos, isolados de aves ou de alimentos envolvidos em surtos de salmonelose. Os ensaios foram realizados em quatro diferentes temperaturas de incubação (36°C, 28°C, 12°C e 3°C). Os autores verificaram que a formação de biofilme foi influenciada pela aderência à superfície e temperatura.

Uma vez que a fixação de bactérias é estabelecida, elas começam a formar um microambiente por meio do recrutamento de outras bactérias do ambiente circundante e replicam-se constantemente. Esta comunidade bacteriana cresce rapidamente e evolui para um formato tridimensional. Quando o biofilme atinge a maturidade, algumas células são liberadas, se tornam planctônicas e migram para outros locais adequados para a colonização e para o estabelecimento de um novo biofilme (WATNICK, P e KOLTER., 2000; BRANDA et al., 2005). Estas estruturas tornam-se pontos constantes de contaminação.

As células dentro de um biofilme expressam genes de maneira bastante distinta quando comparadas às formas planctônicas (AN, PARSEK, 2007). As diferentes fases da formação de biofilme são caracterizadas pela expressão de genes distintos. A fixação inicial requer a expressão de pili e fímbrias para auxiliar no contato com a superfície e ajudar as células bacterianas a superar as forças eletrostáticas que a superfície terá sobre elas. Essa fase inicial é reversível e as células podem facilmente desprender-se e voltar ao estado planctônico. Para aderir de forma irreversível, às bactérias devem diminuir a expressão dos genes de motilidade e induzir a expressão de genes que codificam os componentes da matriz extracelular (PETROVA; SAUER, 2012).

Nos processos de formação de biofilmes por *Salmonella* a “fimbria fina agregativa” ou Curli, estão associadas a resíduos hidrofóbicos nas quais auxiliam na adesão a superfícies, invasão do hospedeiro e à formação da matriz extracelular “EPS” (FERREIRA e CAMPOS, 2008; STEENACKERS et al., 2012; CORCORAN, 2013).

As fímbrias Curli são sintetizadas a partir dos genes *csgD*, organizado em dois

operons *csgBAC* / *csgDEFG* e estão presentes na superfície de bactérias Gram-negativas (GERSTEL & RÖMLING, 2003). ZAKIKHANY et al. (2010) avaliaram a importância do gene *agfD*, que também atua indiretamente no gene *adrA*, a fim de regular a produção de “celulose” bacteriana, um polímero de glicose que auxilia na adesão a superfícies abióticas e no desenvolvimento do biofilme.

Os polissacarídeos capsulares e os lipopolissacarídeos (LPS) desempenham um importante papel na formação de biofilmes, onde a deleção dos genes relacionados aos lipopolissacarídeos pode resultar na diminuição ou perda total dessa habilidade (RÖMLING, 2007; CORCORAN, 2013).

3.5 Processo de higienização

O Brasil é o segundo maior produtor de carne de frango e ocupa o primeiro lugar como maior exportador mundial (ABPA, 2018), e assim, para manter as condições de biossegurança no processo produtivo adota diferentes programas de controle e monitoramento das condições higiênico-sanitárias desde a produção primária até o abate.

O programa de higienização industrial é composto de duas etapas: a limpeza e a sanitização. O processo de limpeza reduz o acúmulo de materiais orgânicos e inorgânicos e também atua na remoção de células bacterianas que ainda se encontram na fase inicial reversível de adesão, quando sofrem a ação de forças de interações hidrofóbicas, eletrostática e não estão totalmente aderidas a superfícies, sendo facilmente removidas pela ação mecânica e uso de detergentes (WATNICK, KOLTER, 2000; ANDRADE, 2008; KASNOWSKI et al., 2010). Assim, a limpeza é um processo importante da manutenção da inocuidade do alimento e também visa mitigar a formação de biofilmes (ANDRADE, 2008).

A sanitização é realizada após a limpeza com o objetivo que reduzir a contaminação microbiológica e é realizada com o uso de biocidas como o ácido peracético, hipoclorito de sódio, clorexidina, amônia quaternária, entre outros, que são necessários para reduzir e/ou eliminar os micro-organismos presente nas superfícies. Os biocidas devem possuir características químicas e físicas de baixa toxicidade, serem alergênicos, possuir baixa corrosividade, resistir a altas temperaturas e reduzir a adesão e eliminar os micro-organismos das superfícies (MØRETRØ et al., 2012; SINDE CARBALLO, 2000).

Apesar da adoção de programas de controle e monitoramento das condições higiênico-sanitárias, doenças transmitidas pelos alimentos são relatadas em diversos países (BRASIL, 2018). Uma das prováveis causas da presença de patógenos em alimentos é a formação de biofilmes em superfícies de equipamentos e a sua difícil remoção. Isso, por que as células sésseis apresentam características diferentes das formas planctônicas, como interações por pontes de hidrogênio, ligações hidrofóbicas, outras ligações químicas e produção de substâncias poliméricas extracelulares. Além disso, quando associadas nestas comunidades, as bactérias possuem maior facilidade na aquisição de genes de virulência e de adaptação ambiental, além de estarem fisicamente protegidas pela matriz polimérica extracelular. Após a maturação do biofilme, os micro-organismos se desprendem das estruturas e contaminam outras superfícies ou os alimentos (JOSEPH et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2010; KASNOWSKI et al., 2010).

Pesquisadores têm avaliado o uso de agentes químicos na redução ou eliminação de micro-organismos aderidos a superfície. Rossoni e Gaylard (2000) avaliaram os efeitos do hipoclorito de sódio e ácido peracético na redução e/ou eliminação *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. aureus* isoladas de carcaças de frango, e posteriormente aderidas sobre superfície de aço inoxidável. Concluíram que o uso de hipoclorito de sódio é mais eficaz que o ácido peracético para eliminar ou reduzir a formação de biofilmes (VIRTO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2010).

CABEÇA et al. (2006) avaliaram a ação de sanitizantes utilizados na indústria alimentícia (iodo, biguanida, compostos quaternários de amônio, ácido peracético e hipoclorito de sódio) na redução ou eliminação do número de células de *Listeria monocytogenes* aderidas à superfície de aço inoxidável durante 24, 72 e 120 horas. Concluíram que todos agentes químicos testados foram capazes de reduzir a formação do biofilme, porém, nenhum deles foi capaz de eliminar todas as células bacterianas. O agente químico mais eficiente na redução de células de *L. monocytogenes* foi o hipoclorito de sódio.

No Brasil, MILAN et al. (2015b) isolaram 20 cepas de *Salmonella enterica* subsp. *enterica* de carcaças de frangos e avaliaram sua capacidade em formar biofilme nas superfícies de alumínio, polietileno e vidro na temperatura de 36°C por 24 horas. Apenas duas cepas do sorotipo *Salmonella* Enteritidis foram capazes de formar biofilme nas três superfícies testadas. Posteriormente, analisaram a ação dos biocidas hipoclorito de sódio e iodo na remoção destes biofilmes e constataram que

ambos os biocidas foram capazes de reduzir o biofilme, mas que com o uso do hipoclorito a redução foi maior. Também observaram que a ação dos biocidas pode ser cepa dependente, não eliminando todos os micro-organismos.

Também no Brasil, COLLA et al. (2012) avaliaram 20 cepas de *Salmonella* Heidelberg frente aos agentes químicos clorexidina, amônia quaternária e ácido peracético em contato por 5, 10, 15 e 20 minutos, isoladas de água, carcaças de frango e seus derivados no período de 2005 (14 cepas) e 2009 (6 cepas). As cepas foram isoladas no mesmo abatedouro de aves. Todas as 20 cepas de *S. Heidelberg* foram susceptíveis ao ácido peracético 1% em todos os tempos de tratamento, enquanto que a clorexidina e a amônia quaternária não apresentaram a mesma eficiência, já que não reduziram significativamente o número de células bacterianas. Os autores enfatizaram a necessidade de alternância entre os biocidas nas indústrias de alimentos para evitar possível transferência de resistência ou seleção de cepas resistentes.

3.6 Pulsed Field Gel Electrophoresis - PFGE

A avaliação da disseminação de patógenos ao longo da cadeia produtiva de alimentos é importante para que as indústrias possam atuar na prevenção e na implantação de programas mais eficazes de controle. A utilização de métodos moleculares de subtipagem para a caracterização e agrupamento de micro-organismos baseados em suas características genotípicas tem se tornado comum em laboratórios de saúde pública. Dos muitos métodos moleculares atualmente disponíveis, a análise de macrorrestrição por eletroforese em gel de campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* - PFGE) demonstrou ser particularmente útil para o agrupamento e diferenciação de muitos patógenos (STREULENS; DE RYCK; DEPLANO, 2001). Embora a sensibilidade e o poder discriminatório de PFGE dependam do micro-organismo a ser subtipado e da enzima de restrição utilizada, sua alta relevância epidemiológica tem feito esta técnica o "padrão ouro" para subtipar patógenos bacterianos de origem alimentar (GOERING, 2004; YANG et al., 2013).

PFGE é o método subtipagem molecular mais amplamente utilizado para *Salmonella* (BARRETT; GERNER-SMIDT; SWAMINATHAN, 2006) e é utilizado rotineiramente pelo CDC e departamentos de saúde estaduais nos Estados Unidos,

bem como no Canadá, América Latina, Ásia e Europa pelo sistema PulseNet (SWAMINATHAN et al., 2001, 2006). Os dados comparativos de subtipos de *Salmonella* e diversidade PFGE entre cepas isoladas de humanos com doença clínica e cepas isoladas de animais e alimentos são fundamentais para facilitar estudos epidemiológicos e de rastreamento da fonte da infecção, além de identificar subtipos restritos a um hospedeiro.

O CDC utiliza amplamente esta técnica para estudos de investigação epidemiológica, a qual permite fazer associação entre cepas isoladas dos doentes e dos alimentos envolvidos, e assim, concluir a possível fonte comum, responsável pela ocorrência do surto. Como exemplo, pode-se citar um surto ocorrido no estado de Minnesota, nos EUA, em decorrência de *S. Enteritidis*, no qual pelo uso do PFGE foi possível concluir que a carne de frango foi a provável fonte de infecção (CDC, 2015).

O estudo de cepas de *Salmonella* ao longo do processo da produção de frangos, com o estabelecimento de perfis genéticos semelhantes disseminados em diferentes locais, assim como, a investigação da causa de surtos de origem alimentar, são importantes em estudos epidemiológicos, sendo ferramentas como o PFGE importantes para o seu estabelecimento (SMITH et al., 2011; CDC, 2013; TURKI et al., 2014; MACHADO et al., 2017).

O rastreamento de patógenos pode ser útil em programas de prevenção e controle de *Salmonella*, que exigem conhecimento científico da diversidade fenotípica e genotípica dos sorotipos presentes nas granjas e indústrias. Nas últimas décadas, os métodos tradicionais de tipagem de *Salmonella* como a sorotipagem e a tipagem de fagos foram complementados por ensaios moleculares que proporcionam maior discriminação e reprodutibilidade (TENOVER et al., 1995; VERGE, P.; CLOECKAERT, A.; BARROW, P., 2005). Dentre estes, a PFGE é considerada o padrão ouro para a subtipagem molecular de *Salmonella* spp, com contribuição comprovada para investigações sobre a origem e disseminação do patógeno (RIBOT et al., 2006; FAVIER et al., 2013; YANG et al., 2013).

REFERÊNCIAS

- ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório anual ABPA 2018**. São Paulo, 176p. 2018. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/storage/files/relatorio-anual-2018.pdf>>. Acesso em: 14 julho 2018.
- ADLEY, C.; RYAN, M. P. **The nature and extent of foodborne disease**. in Antimicrobial Food Packaging, J. Barros-Velazquez, 1^ª Ed., chapter 1, pp. 1–10, Academic Press, San Diego, Calif, USA, 2016. doi:10.1016/b978-0-12-800723-5.00001-2
- AN, D.; PARSEK, M. R. The promise and peril of transcriptional profiling in biofilm communities. **Current Opinion in Microbiology**, Amsterdã. v. 10, n. 3, p. 292-296, 2007. doi:10.1016/j.mib.2007.05.011
- ANDRADE, N. J. **Higiene na Indústria de Alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos**, São Paulo: Varela, p.181-226, 2008.
- AZEVEDO, N. F.; CERCA, N. **Biofilmes: Na Saúde, no Ambiente, na Indústria**. 1 ed. Porto: Publindústria Edições Técnicas: 2012. 396p.
- BARRETT, T. J.; GERNER-SMIDT, P.; SWAMINATHAN, B. Interpretation of pulsed-field gel electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance. **Foodborne Pathogens and Disease**. V. 3. N. 1. 2006. P. 20-31. doi:10.1089/fpd.2006.3.20
- BORGES, K. A. et al. Detection of virulence-associated genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from chicken in South of Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 12, p. 1416-1422, 2013. doi: 10.1590 / s0100-736x2013001200004
- BORGES, K. A. et al. Biofilm formation by *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium isolated from avian sources is partially related with their in vivo pathogenicity. **Microbial Pathogenesis**, v. 1, n. 12, p. 14-21, 2018. doi: 10.1016/j.micpath.2018.03.039
- BORGES, Karen A. et al. Biofilm formation capacity of *Salmonella* serotypes at different temperature conditions. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. Rio de Janeiro. v. 38. n. 1. 2018b. p. 71-76. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-5150-pvb-4928>.
- BRANDA, S. S., VIK, A.; FRIEDMAN, L. and KOLTER, R. Biofilms: the matrix revisited. **Trends in Microbiology**. v. 13, n. 1, p 20-26, 2005. doi: 10.1016 / j.tim.2004.11.006

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. (2016).

Disponível em:

<<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta-o-Surtos-DTA-2016.pdf>> Acesso em: 03 jul. 2018

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa da Secretaria de Defesa Agropecuária n.20 de 21 de outubro de 2016. Controle e o monitoramento de *Salmonella* spp. nos estabelecimentos avícolas comerciais de frangos e perus de corte e nos estabelecimentos de abate de frangos, galinhas, perus de corte e reprodução, registrados no Serviço de Inspeção Federal (SIF). *Diário Oficial da União, Brasília, DF*, 25 out. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil**. (2017). *Diário Oficial da União, Brasília, DF*. V. 6. P. 1-818.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. (MS/SVS/DEVIT/CGDT). **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil – SDTA**. São Paulo, SP, 2018.

BRENNER, F. W. et al. *Salmonella* nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2465-2467, 2000.

CABEÇA, T. K; PIZZOLITTO, A. C; PIZZOLITTO, E. L. Assessment of action of disinfectants against *Listeria monocytogenes* biofilms. **Alimentos e Nutrição**; v. 17, n.2, p. 121-5, 2006.

CAMPOS, J. et al. Imported poultry meat as a source of extended-spectrum cephalosporin-resistant CMY-2-producing *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Minnesota in the European Union, 2014–2015. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, Elsevier, v. 51, n. 1, p.151-154, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.09.006>.

CDC - **Salmonella Surveillance Overview**. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2011.

CDC – CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Outbreak of Salmonella Enteritidis Infections Linked to Raw, Frozen, Stuffed Chicken Entrees Produced by Aspen Foods (Final Update)**. 2015. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/frozen-chicken-entrees-part2-07-15/index.html>>. Acesso em: 13 abril 2018.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Standard Operating Procedure for PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC), *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*.** PNL05. 2017.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. MARDER, Eilyn P. et al. Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food and the Effect of Increasing Use of Culture-Independent Diagnostic Tests on Surveillance — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2013–2016. **Mmwr. Morbidity And Mortality Weekly Report**, [s.l.], v. 66, n. 15, p.397-403, 21 abr. 2017. Centers for Disease Control MMWR Office. <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6615a1>.

CHOI, J.; SHIN, D.; RYU, S. Implication of quorum sensing in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium virulence: the luxS gene is necessary for expression of genes in pathogenicity island 1. **Infection and Immunity**, v. 75, p. 4885-4890, 2007. doi: 10.1128/IAI.01942-06

CLOUTHIER, S C et al. Characterization of three fimbrial genes, sefABC, of *Salmonella enteritidis*. **Journal Of Bacteriology**, [s.l.], v. 175, n. 9, p.2523-2533,1993. <http://dx.doi.org/10.1128/jb.175.9.2523-2533.1993>.

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

COLLINGHAN, R. J.; WOODWARD, M. J. The SEF14 fimbrial antigen of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis is encoded within a pathogenicity islet. **Veterinary Microbiology**. v. 80. p.235-245, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(01\)00309-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(01)00309-1)

COLLINSON, S. K.; CLOUTHIER, S. C.; DORAN, J. L.; BANSER, P. A.; KAY, W. W. *Salmonella enteritidis* agfBAC operon encoding thin, aggregative fimbriae. **Journal of Bacteriology**. V. 178 n. 3, p 662–667, 1996. doi: 10.1128/jb. 178.3.662-667.1996

COLLA, Fernanda Lúcia 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**, [s.l.], v. 32, n. 4, p.289-292, abr. 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2012000400003>.

CORCORAN, M. et al. Commonly Used Disinfectants Fail to Eradicate *Salmonella enterica* Biofilms from Food Contact Surface Materials. **Applied And Environmental Microbiology**, [s.l.], v. 80, n. 4, p.1507-1514, 20 dez. 2013. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.03109-13>.

COSTA, R. G. et al. Antimicrobial susceptibility and serovars of *Salmonella* circulating in commercial poultry carcasses and poultry products in Brazil.. **Journal of Food Protection**, v. 76, p. 2011-2017, 2013. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-164>

D'AOUST, J.; MAURER, J. **Salmonella species**, in **Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers**, M. Doyle and L. Beuchat, Eds., pp. 187–236, ASM Press, Washington, DC, USA, 3rd edition, 2007. <https://doi.org/10.1128/9781555815912.ch10>

EDWARDS, P. R.; BRUNER, D. W.. Two new *Salmonella* types isolated from fowls. **Journal Of Hygiene**, [s.l.], v. 38, n. 06, p.716-720, nov. 1938. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0022172400011566>.

EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. The european union summary report on 396 trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 397 2013. **EFSA Journal**. V. 13. 2015. p165. doi: 10.2903/j.efsa.2015.3991.

EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014**. *EFSA Journal* 2015; 13(12). doi:10.2903/j.efsa.2015.

EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY E EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2017. The European Union Summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. **EFSA Journal**, v. 15. n. 12, p.:5077, 2017. doi: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017>.

FAO-WHO - Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization. **Salmonella and Campylobacter in chicken meat**: Meeting report. Microbiological Risk Assessment Series 19, 2009.

FAVIER, Gabriela Isabel et al. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization by PCR and pulsed field gel electrophoresis (PFGE) of *Salmonella* spp. isolated from foods of animal origin in San Luis, Argentina. **Food Control**, [s.l.], v. 29, n. 1, p.49-54, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.05.056>.

FERREIRA, E. O.; CAMPOS, L. C. **Salmonella**. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. (Ed.). *Microbiologia*. 5 eds. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 329-338.

FLEMMING, H.-C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. *Nature reviews. Microbiology*, v. 8, n. 9, p. 623–33, 2010. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>

FREITAS, J. **Evolução de sorovares Modelo de Banco de Cepas. Anais do Seminário Internacional de Salmonellose Aviária**. Rio de Janeiro, RJ. (Resumo), 2011.

GALAN, J. E.; CURTISS, R. Cloning and molecular characterization of genes whose products allow *Salmonella typhimurium* to penetrate tissue culture cells. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 86, n. 16, p.6383-6387, 1989. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.86.16.6383>.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Agentes Bacterianos de Toxinfecções. Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. São Paulo: Manole, 2008. p. 277-356.

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. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2003.08.005>

GIACOMODONATO, M. N. et al. AvrA effector protein of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis is expressed and translocated in mesenteric lymph nodes at late stages of infection in mice. **Microbiology**, v. 160, p. 1191-9, 2014. doi: 10.1099/mic.0.077115-0

GIBSON, D. L. et al. AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella* Enteritidis. **Microbiology**, v. 153, n. 4, p. 1131-1140, 2007 doi: 10.1099 / mic.0.2006 / 000935-0

GOERING, R. V. **Pulsed-field gel electrophoresis**. In: PERSING, D. H. et al. (Ed.). *Molecular microbiology, diagnostic principles and practice*. Washington: ASM Press, 2004. p. 185-196.

GRAM, L.; BAGGE-RAVN, D.; VOGEL, B. F. Influence of food soiling matrix on cleaning and disinfection efficiency on surface attached *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, 2007, p. 1165-1171, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.06.014>

GRIMONT, P. A. D; WEILL, F. X. **Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars**. 9. ed. Paris: World Health Organization, Institut Pasteur, 2007. Disponível em: <<http://www.scacm.org/free/Antigenic%20Formulae%20of%20the%20Salmonella%20Serovars%202007%209th%20edition.pdf>>. Acesso em: 02 jul. 2018.

HALL-STOODLEY L.; STOODLEY P. Evolving concepts in biofilm infections. **Cellular Microbiology**, v. 11, p.1034-1043, 2009. doi:10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x

HARAGA, A.; OHLSON, M. B.; MILLER, S. I. *Salmonellae* interplay with host cells. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p 53–66, 2008. doi:10.1038/nrmicro1788

HARDT, W. D.; GALAN, J. E. **A secreted *Salmonella* protein with homology to an avirulence determinant of plant pathogenic bacteria**. *ATT. USA*. 1997. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.18.9887>

HEW, M.; et al. Survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 in chorizos. **Journal of Food Protection**. v. 68. n. 10, p. 2039– 2046, 2005. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.10.2039>

HEYNDRICKX, M.; et al. Recent changes in *Salmonella* nomenclature: the need for clarification. **The Veterinary Journal**, v. 68, n. 10, p. 2039– 2046, 2005.

HUNG, C. S.; HENDERSON, J. P. Emerging concepts of biofilms in infectious diseases. **Missouri State Medical Association Journal**, v. 106, p. 292-296, 2009.

JACOBSEN, A. et al. The *Salmonella enterica* pan-genome. **Microbial Ecology**, v. 62, n. 3, p. 487-504, 2011. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9880-1>

JOSEPH B, OTTA SK, et al. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, v. 64,3,p 367-72, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00466-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00466-9)

KARMI, M. Detection of virulence gene (InvA) in *Salmonella* isolated from meat and poultry products **International Journal of Genetics**, v. 3, p. 7-12, 2013.

KASNOWSKI, M. C.; et al. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 15, p. 01-14, 2010.

LAN, R.; REEVES, P. R.; OCTAVIA, S. Population structure, origins and evolution of major *Salmonella enterica* clones. **Infection, Genetics and Evolution**, [s.l.], v. 9, n. 5, p.996-1005, 2009. <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2009.04.011>.

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. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.011>

MACHADO, Sca et al. Serotyping and Genotyping of *Salmonella* Strains Isolated From Broilers, Chicken Carcasses Before and After Chilling, and Frozen Chicken Breasts Produced in The States of Mato Grosso do Sul and Santa Catarina, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.135-142, mar. 2017. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1806-9061-2016-0371>.

MCWHORTER, A. R.; CHOUSALKAR, K. K. Comparative phenotypic and genotypic virulence of *Salmonella* strains isolated from Australian layer farms. **Frontiers in Microbiology**. v. 6. N. 12, p.1-14, 2015. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00012>

MENDONÇA, E. P. **Características de virulência, resistência e diversidade genética de sorovares de *Salmonella* com impacto na saúde pública, isolados de frangos de corte no Brasil**. 2016. 131 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.

MIKALOVA, L.; BOSAK, J.; HRIBKOVA, H.; DEDICOVA; D.; BENADA, O.; SMARDA, J.; SMAJS, D. Novel temperate phages of *Salmonella enterica* subsp. *salamae* and subsp. *diarizonae* and their activity against pathogenic *S. enterica* subsp. *enterica* isolates. **PLoS ONE**, 12. V. 1. 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170734>

MILAN, C.; TIMM, C.D. Fatores de virulência associados à formação de biofilme por *Salmonella* entérica, **Science and animal health**, v.3, n.1, p. 94-102, 2015a. doi: <http://dx.doi.org/10.15210/sah.v3i1.4329>

MILAN, C., et al. Sanitizer resistance of biofilm-forming *Salmonella* isolated from meat products. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 2, p. 642–646, 2015b. doi:10.1590/1678-7298. <https://doi.org/10.1590/1678-7298>

MIRMOMENI, M. H.; et al. Rapid Detection of *Salmonella* enteritidis by PCR Amplification of The SefA Gene and It's Cloning. Pakistan. **Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 3, p. 428-432, 2008. doi: 10.3923/pjbs.2008.428.432

MOURA, M. S. et al. Genes de virulência e diversidade genética em *Salmonella* spp. isoladas de amostras de origem suína. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 5, p.1367-1375, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-6809>.

MØRETRØ, T., et al. (2012). Control of *Salmonella* in food related environments by chemical disinfection. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 532–544, 2012. doi:10.1016/j.foodres. 2011.02.002

NATARO, J.; et al. **Escherichia, Shigella, and Salmonella**. ASM Press, Washington, DC., USA, 10th edition, 2011

NORRIS, T. L.; BÄUMLER, A. J. Phase variation of the *lpf* operon is a mechanism to evade cross-immunity between *Salmonella* serotypes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 96, n. 23, p. 13393-13398, 1999. doi:10.1073/pnas.96.23.13393

OCHOA, I. M. F.; RODRIGUEZ, A. V. Mecanismos moleculares de patogenicidade de *Salmonella* sp. **Revista Latino Americana de Microbiología**, v. 47, p. 25-42, 2005.

OLIVEIRA MMM, BRUGNERA DF, PICCOLI RH. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: Uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, p. 277–284, 2010.

OUESLATI, W., et al. Prevalence, virulence and antibiotic susceptibility of *Salmonella* spp. strains, isolated from beef in Greater Tunis (Tunisia). **Meat Science**, v. 119. p. 154–159, 2016. doi:10.1016/j.meatsci. 2016.04.037

POPOFF, M. Y.; LE MINOR, L. E. **Genus Salmonella**. In: BRENNER, D. J.; KRIEG, N. R.; STALEY, J. T. (Eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Ed. Volume 2. New York: Springer Science + Business Media Inc., 2005. p. 764-799.

PORTER, S. B.; CURTISS, R. Effect of *inv* mutations on *Salmonella* virulence and colonization in 1-day-old White Leghorn chicks. **Avian Diseases**. v.41. n.1. 1997. p.45-57. doi: 10.2307/1592442

PETROVA, O. E.; SAUER, K. Sticky situations: key components that control bacterial surface attachment. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 10, p.2413-25, 2012. <https://doi.org/10.1128/JB.00003-12>

RASFF - RAPID ALERT SYSTEM FOR FOOD AND FEED. **The rapid alert system for food and feed. Annual Report of European Commission. 60p, 2012.** Disponível em: <https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2012_en.pdf>. Acesso em: 02 maio. 2018.

RASFF - RAPID ALERT SYSTEM FOR FOOD AND FEED. **Salmonella Minnesota (presence /25g) in frozen chicken breast from Brazil, 2013.** Disponível em: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=notificationDetalleNOTIF_REFERENCE=2013.AIM>. Acesso em: 02 maio. 2018.

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.** 2017a. Disponível em: <https://webgate.ec.europa.eu/rasffwindow/portal/?event=notificationDetalleNOTIF_REFERENCE=2017.0501>. Acesso em: 02 maio. 2018.

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 2017b. 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>>. 02 maio. 2018.

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.

RIBOT, E. M.; FAIR, M. A.; GAUTOM, R. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 3, n. 01, p. 59-67, 2006. doi:10.1089/fpd.2006.3.59

RÖMLING, U. **Cellulose biosynthesis in Enterobacteriaceae**, p.107-122. In: Brown Jr RM e Saxena IM (Eds), *Cellulose: Molecular and Structural Biology*. Springer Verlag, Dordrecht, 2007. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5380-1_7

ROWLANDS, R. E. G., et al. Prevalence of drug resistance and virulence features in *Salmonella* spp. isolated from foods associated or not with salmonellosis in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 6, p. 461-567, 2014. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000600001>

ROSSONI EMM, GAYLARD CC. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 81–5, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00369-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00369-X)

RYAN, M. P., JEAN O'DWYER, A.; CATHERINE, C. A. "Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen *Salmonella*," **BioMed Research International**, v. 1, p. 378-384, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/3782182>.

SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 14-56, 2004. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.1.14-56.2004>

SERENO; M. J.; et al. Antimicrobial Susceptibility and Biofilm Production by *Salmonella* sp. Strains Isolated from Frozen Poultry Carcasses. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 19, n. 1, p. 103-108, 2017. <https://dx.doi.org/10.1590/1806-9061-2016-0268>

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.4, p. 439-47, 2000. <https://doi.org/10.1006/fmic.2000.0339>

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..

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. doi:10.1016/j.foodres.2011.01.038

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. doi:10.1099/jmm.0.059352-0

STREULENS, M. J.; RYCK, R.; DEPLANO, A. **Analysis of microbial genomic macrorestriction patterns by pulse-field gel electrophoresis (PFGE) typing**. In: DIJKSHOORN, L.; TOWNER, K. J.; STRULENS, M. (Ed.) New approaches for the generation and analysis of microbial typing data. Amsterdam: Elsevier Science B.V., 2001. p. 159-176. <https://doi.org/10.1016/B978-044450740-2/50008-3>

SWAMINATHAN, B. et al. PulseNet: the molecular subtyping network for foodborne bacterial disease surveillance, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 3, p. 382-389, 2001. <https://doi.org/10.3201/eid0703.010303>

SWAMINATHAN, B. et al. Building PulseNet International: an interconnected system of laboratory networks to facilitate timely public health recognition and response to foodborne disease outbreaks and emerging foodborne diseases. *Foodborne Pathogens and Disease*, v. 3, n. 1, p. 36-50, 2006. <https://doi.org/10.1089/fpd.2006.3.36>

SYLVIE, I. J, P.; et al. Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 165, n. 7, p. 526–530, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.r235,esmic.2014.07.004>.

TEMME, K. et al. Induction and Relaxation Dynamics of the Regulatory Network Controlling the Type III Secretion System Encoded with in *Salmonella* Pathogenicity Island 1. **Journal of Molecular Biology**, v. 377, n. 1, p. 47–61, 2008. doi: 10.1016/j.jmb.2007.12.044.

TENOVER, F. C., et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. **Jornal of Clinical Microbiology**. v. 33, p. 2233–2239, 1995.

TINDALL, J.; et al.,. “Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*,” **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 521–524, 2005. doi: 10.1099_ijs.0.63580-0

TURKI, Y. et al. Comparison of five molecular subtyping methods for differentiation of *Salmonella* Kentucky isolates in Tunisia. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 1, p. 87-98, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1414-1>

VIEIRA, M. A. M. Ilhas de patogenicidade. **O mundo da saúde**, v. 33, n.4, p. 406-414, 2009.

VOSS-RECH, D.; et al. A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. **Poultry Science**, v. 94, p. 433-44, 2015. doi: 10.3382/ps/peu081

VIRTO, R. et al. Membrane damage and microbial inactivation by chlorine in the absence and presence of a chlorine-demanding substrate. **Applied Environmental Microbiology**, v.71, p.5022–5028, 2005. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5022-5028.2005>

VERGE, P.; CLOECKAERT, A.; BARROW. P. Emergence of *Salmonella* epidemics: The problems related to *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. **Vet. Res**, v.36, p.267–288, 2005. <https://doi.org/10.1051/vetres:2005005>

WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, City of Microbes. **Journal of Bacteriology**, v.182, p. 2675-2679, 2000. doi 10.1128 / JB.182.10.2675-2679.2000. <https://doi.org/10.1128/JB.182.10.2675-2679.2000>

WHITE, A. P.; et al. Thin Aggregative Fimbriae and Cellulose Enhance Long-Term Survival and Persistence of *Salmonella*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 9, p. 3219–3227, 2006. doi:10.1128/jb.188.9.3219-3227.2006

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Salmonella**. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/salmonella/en/>>. Acesso em: 11 maio 2018.

YANG, B. et al. Serotyping, antimicrobial susceptibility, pulsed field gel electrophoresis analysis of *Salmonella* isolates from retail foods in Henan Province, China. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 228-235, 2013. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.022>

ZAKIKHANY, K.; HARRINGTON, C. R.; NIMTZ, M.; et al. Unphosphorylated CsgD controls biofilm formation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Molecular Microbiology**, v. 77, n. 3, p. 771–786, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07247.x>

ZOU, M.; KEELARA, S.; THAKUR, S. Molecular Characterization of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis Isolates from Humans by Antimicrobial Resistance, Virulence Genes, and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 3, p 232–238, 2012. doi: 10.1089/fpd.2011.1012.

CAPÍTULO II

POTENCIAL VIRULENTO E DISSEMINAÇÃO DE *Salmonella* MINNESOTA ISOLADAS NA CADEIA DE PRODUÇÃO AVÍCOLA

**Artigo a ser submetido ao periódico: Journal - British Poultry
Science**

1 Potencial virulento e disseminação de *Salmonella* Minnesota 2 isoladas na cadeia de produção avícola

3 T. R. Cardoso¹, R. T. Melo¹, F. A. B. M. Peres¹, D. A. Rossi¹

4 ¹ Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia,
5 Brasil

7 Resumo

- 8 1. Objetivou-se avaliar em *S. Minnesota*, a presença de genes de virulência e
9 estabelecer a relação filogenética para inferir o perigo potencial que representam
10 para a saúde humana.
11 2. Avaliou-se a presença de genes específicos em 20 cepas de *S. Minnesota*,
12 isoladas nos anos de 2009, 2010 e 2014, em plantas de abate de frangos de corte
13 de duas empresas brasileiras por PCR e a disseminação utilizando PFGE.
14 3. Os genes associados a apoptose (*avrA*), estresse oxidativo (*sodC*), invasão (*invA*)
15 estavam presentes em 100% (20/20) das cepas; os relacionados à adesão (*agfA*), à
16 formação de biofilmes (*lpfA*) e ao processo de *quorum-sensing* (*luxS*) foram
17 identificados em 95% (19/20), 75% (15/20) e 80% (16/20) das cepas,
18 respectivamente. Os perfis de virulência gerados demonstraram que as cepas são
19 potencialmente patogênicas adaptadas e capazes de forma de biofilmes.
20 4. O PFGE demonstrou grande diversidade genética, com 14 pulsotipos, sendo três
21 deles com similaridade maior que 80%.
22 5. Os resultados revelam a necessidade de atenção especial a este sorovar na
23 produção de frangos visando ao seu monitoramento e controle.

24
25 **Palavras-chave:** Carcaça de Frango, Frango de corte, Gene, PFGE, Salmonelose.

26
27 **Contato:** Taciano dos Reis Cardoso

28 taciano.cardoso@gmail.com

29 Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada, Universidade Federal de Uberlândia, Rua Ceará s/n,
30 bloco 2D, sala 43, Campus Umuarama, Uberlândia, MG 38402-018, Brasil

31 Telefone: (34) 32132319

32
33 Roberta Torres de Melo

34 roberta-melo@hotmail.com

35 Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada, Universidade Federal de Uberlândia, Rua Ceará s/n,
36 bloco 2D, sala 43, Campus Umuarama, Uberlândia, MG 38402-018, Brasil

37 Telefone: (34) 32132319

38
39 Phelipe Augusto Borba Martins Peres

40 lipe-peres1@hotmail.com

41 Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada, Universidade Federal de Uberlândia, Rua Ceará s/n,
42 bloco 2D, sala 43, Campus Umuarama, Uberlândia, MG 38402-018, Brasil

43 Telefone: (34) 32132319

44
45 Daise Aparecida Rossi

46 daise.rossi@ufu.br

47 Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada, Universidade Federal de Uberlândia, Rua Ceará s/n,
48 bloco 2D, sala 43, Campus Umuarama, Uberlândia, MG 38402-018, Brasil

49 Telefone: (34) 32132319

50
51

INTRODUÇÃO

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

O gênero *Salmonella* destaca-se entre os micro-organismos mais frequentemente incriminados em doenças transmitidas por alimentos (DTAs), tendo sido reconhecido como importante causa de surtos nos anos de 2016 e 2017, tanto no Brasil (Brasil, 2016; Brasil, 2017), quanto nos Estados Unidos (CDC, 2017) e na União Europeia (EFSA, 2017).

O frango de corte destaca-se como reservatório deste gênero, sendo alta a frequência de infecção das aves e a contaminação das carcaças e dos cortes nos abatedouros (EFSA, 2014; EFSA, 2015). Assim, pode-se dizer que a carne de frango e seus derivados estão entre os produtos de origem animal com maior responsabilidade na transmissão de *Salmonella* ao homem e, por isso, seu consumo pode ser considerado como fator de risco para infecção humana (FAO / WHO, 2009; EFSA, 2015).

Dentre os sorovares de *Salmonella*, *S. Minnesota* vem se destacando pelo aumento do número de isolamentos na cadeia produtiva avícola no Brasil e no mundo. Costa et al. (2013), no Brasil, constataram que *S. Minnesota* foi o segundo sorovar mais prevalente entre os anos de 2007 e 2011, 22,3% quando avaliaram 12.582 cepas oriundas de carcaças de frangos e produtos avícolas. Na Europa, o *Rapid Alert System for Food and Feed* (RASFF), no ano de 2012, emitiu alerta sobre sorovares de *Salmonella* isolados de carne de frango importada do Brasil, com destaque para os sorovares *S. Heidelberg* e *S. Minnesota* (RASFF, 2012).

Voss-Rech et al. (2015) analisaram 82 cepas de *Salmonella* spp. isoladas de plantéis avícolas brasileiros e identificaram 15 sorotipos diferentes, sendo que os mais prevalentes foram *S. Minnesota* (40,24%), *S. Infantis* (14,63%) e *S. Heidelberg* (7,31%). Em estudo conduzido em duas plantas de abate, localizadas no Mato

1 Grosso do Sul (planta A) e Santa Catarina (planta B), nos anos de 2012 e 2013,
2 também foi observada a emergência de *S. Minnesota*, que foi o sorovar mais
3 frequentemente isolado (91,3%) na planta A (Machado et al., 2017).

4 No ano de 2017 há relato de quatro notificações da presença de *S. Minnesota* pelo
5 *Rapid Alert System for Food and Feed* (RASFF) em amostras de carne de frango
6 importadas do Brasil para Europa. Um dos isolados foi identificado na Eslováquia,
7 proveniente de peito de frango salgado congelado e duas cepas foram isoladas na
8 Alemanha, em amostras de filletes de peitos de frangos congelados, sendo um
9 salgado e outro natural (RASFF, 2017a; RASFF, 2017b).

10 Campos et al. (2018) relataram a presença de *Salmonella* em amostras de carne de
11 aves importadas do Brasil para Portugal nos anos de 2014 e 2015, onde observaram
12 nestes isolados, pela primeira vez, a presença de resistência a cefalosporina de
13 espectro estendido (ECS) em cepas identificadas como *S. Heidelberg* e *S.*
14 *Minnesota*.

15 Pouco se conhece sobre o envolvimento de *S. Minnesota* na infecção humana, e,
16 assim, o aumento na sua prevalência demonstra que são necessários estudos para
17 o melhor entendimento da sua epidemiologia, já que o processo de interação entre
18 *Salmonella* e o hospedeiro é complexo e envolve diversos fatores, entre eles, a
19 presença de genes de virulência e aqueles ligados à sua persistência no ambiente.

20 A identificação de genes associados a apoptose (*avrA*), estresse oxidativo (*sodC*),
21 invasão (*invA*), adesão e biofilme (*agfA*, *sefA* e *lpfA*) e *quorum-sensing* (*luxS*)
22 (Jeongjoon et al., 2007; Sanjay et al., 2010; Borges et al., 2013) pode auxiliar tanto
23 na avaliação de seu potencial patogênico quanto nas suas estratégias para se
24 perpetuar no ambiente.

25 Além dos genes, a subtipagem para a caracterização genotípica e
26 agrupamento de *S. Minnesota* pode auxiliar no entendimento de sua disseminação e

1 na identificação das fontes de infecção, e posteriormente, em medidas para o seu
2 controle. Dentre os métodos disponíveis, o *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE)
3 demonstrou ser particularmente útil e “padrão ouro” para o agrupamento e
4 diferenciação de muitos patógenos alimentares (Streulens et al., 2001; Goering,
5 2004; Yang et al., 2013).
6 Considerando a emergência de isolamentos de *S. Minnesota* na cadeia avícola e o
7 pouco conhecimento de sua epidemiologia, objetivou-se determinar em cepas deste
8 sorovar isoladas de carne de frango e do ambiente, a presença de genes de
9 virulência e de adaptação ambiental, assim como, estabelecer a relação filogenética
10 para verificar sua disseminação e o perigo potencial que podem representar para a
11 saúde humana.

12

13 MATERIAL E MÉTODOS

14

15 Amostras

16 Para o estudo foram utilizadas 20 cepas de *S. Minnesota*, isoladas nos anos de
17 2009, 2010 e 2014, em plantas de abate de frangos de corte de duas empresas
18 brasileiras (A e B), com ciclo completo de produção e sistema de integração,
19 inspecionadas pelo Serviço de Inspeção Federal - SIF, habilitadas para o comércio
20 interno e exportação. Da empresa A, localizada no estado de Minas Gerais, foram
21 utilizados nove isolados e da indústria B, com plantas de abate nos estados de São
22 Paulo e Mato Grosso do Sul, foram utilizados sete e quatro isolados,
23 respectivamente.

24 Os isolamentos foram realizados nos laboratórios das indústrias, com amostras
25 coletadas em programas de controle interno e/ou exigidos no Programa de Redução
26 de Patógenos - PRP (BRASIL, 2003). As cepas foram cedidas para o estudo após

1 identificação bioquímica, conforme recomendado pela Instrução Normativa 62
2 (BRASIL, 2003) e sorológica (Fundação Instituto Oswaldo Cruz no Estado do Rio de
3 Janeiro (IOC/FIOCRUZ, RJ, Brasil); e permaneceram estocadas na bacterioteca do
4 Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada da Universidade Federal de
5 Uberlândia (LABIO/UFU).

6

7 **Reativação das cepas e extração do DNA genômico**

8 Uma alçada de cada cepa pura mantida estocada em AN - ágar nutriente (OXOID®)
9 foi inoculada em tubos contendo 5mL de caldo BHI e incubadas a 36°C por 24
10 horas, e, posteriormente, estriadas em Agar TSA – (Agar tripton de soja - OXOID®)
11 incubadas a 36°C por 24 horas.

12 Uma colônia foi retirada do agar TSA e repicada em caldo TSB – (caldo tripton de
13 soja-OXOID®) e incubada 36°C por 24 horas, e, após uma alíquota de 1mL, foi
14 utilizada para a extração do DNA genômico utilizando-se o kit comercial Wizard®
15 Genomic DNA Purification (Promega), seguindo protocolo fornecido pelo fabricante.

16

17 **Identificação molecular de genes de virulência e adaptação**

18 As cepas de *S. Minnesota* foram analisadas por Reação de cadeia em polimerase
19 (PCR) quanto à presença dos genes ligados aos processos de apoptose (*avrA*),
20 estresse oxidativo (*sodC*), invasão (*invA*), adesão e biofilme (*agfA*, *sefA* e *lpfA*) e
21 *quorum-sensing* (*luxS*). *Primers*, o tamanho do amplicon e a referência para cada
22 gene estão descritos na tabela 1.

23 O preparo da reação de PCR constou de 12,5µL de GoTaq® Green Master Mix
24 (Promega), 1µL de DNA a 10ng/µL, 1µL do *primer* (tabela 1) e 10,5 µL de água Milli-
25 Q®. Os microtubos, contendo os reagentes da PCR, foram transferidos para o

1 termociclador (*Eppendorf*®) para amplificação, obedecendo aos ciclos: um ciclo
2 inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 94°C por
3 45 segundos, anelamento por 30 segundos a 58°C (*invA*); a 50°C (*sefA* e *lpfA*), a
4 66°C (*agfA*) e 62°C (*avrA*, *sodC* e *luxS*); extensão à 72°C por 90 segundos, com
5 extensão final a 72°C por 10 minutos. Como controle positivo das reações, foi
6 utilizada a cepa de *S. Enteritidis* ATCC 13076 e como controle negativo, água
7 ultrapura estéril.

8 Os produtos amplificados (8µL) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose
9 a 1,5%, utilizando o tampão de corrida TBE 0,5x (*Invitrogen*®) e como padrão de
10 peso molecular, o marcador de 100pb (*Invitrogen*®). Os géis de agarose
11 (*Afllymetrix*®) foram corados pela solução de SYBR® Safe DNA *gel stain*
12 (*Invitrogen*®) e visualizados sob luz UV, no transiluminador (*Loccus Biotecnologia*®)
13 após 90 minutos de corrida do gel à 100W de potência, 80V de voltagem e 80A de
14 corrente elétrica.

15

16 ***Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)***

17 Foi utilizado o protocolo Pulse Net, preconizado pelo CDC (2013). As bactérias
18 cultivadas a 36°C “overnight” em ágar TSA foram suspensas em tubos contendo 2
19 mL de solução salina fosfato tamponada (PBS: tampão fosfato 0,01 M; pH 7,2;
20 0,85% de NaCl). Após emblocamento em agarose, para digestão do DNA genômico
21 utilizou-se 30 U da enzima Xba I (*Invitrogen*) durante duas horas a 25°C.

22 Os fragmentos de DNA foram separados em gel de agarose 1% (*SeaKem Gold*) em
23 tampão TBE 0,5X no aparelho CHEF DRIII (*Bio-Rad*®), por um período de 18 horas,
24 com os seguintes parâmetros, 200v, ângulo de 120°, gradiente de 6v/cm e
25 temperatura do tampão de 14°C. Os géis foram corados com brometo de etídio e

1 fotografados sob luz UV, em transiluminador (Loccus Biotecnologia®).

2

3 **Estatísticas**

4 Os resultados dos genes de virulência foram analisados por meio de estatística
5 descritiva, com cálculo das porcentagens. A análise para construção do
6 dendrograma foi realizada utilizando o software GelCompar II. A comparação dos
7 padrões de bandas foi realizada pelo método de análise UPGMA, sob utilização do
8 coeficiente de similaridade de Dice, com homologia superior a 80% e tolerância de
9 1,5% na comparação da posição de bandas.

10

11 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

12 As 20 cepas de *S. Minnesota* apresentaram diferentes frequências de positividade
13 para os genes estudados.

14 Os genes ligados à indução de apoptose a células afetadas (*avrA*), ao estresse
15 oxidativo (*sodC*) e à invasão (*invA*) estiveram presentes em 100% (20/20) das
16 cepas. Aqueles ligados à adesão (*agfA*), à capacidade potencial de formar biofilmes
17 (*lpfA*) e ao processo de *quorum-sensing* (*luxS*) foram identificados em 95% (19/20),
18 75% (15/20) e 80% (16/20) das cepas, respectivamente.

19 As cepas foram discriminadas em quatro perfis de virulência distintos (P1, P2, P3 e
20 P4), sendo P1 positivo para todos os genes (10/20); P2 negativo apenas para *luxS*
21 (4/20); P3 negativo para *lpfA* (5/20) e P4 negativo para *agfA* (1/20). O perfil de maior
22 frequência foi P1, presente em 50% dos isolados, conforme posto na tabela 2. Estes
23 resultados indicam que as cepas isoladas são potencialmente patogênicas.

24 Para o gene *invA*, a presença em todas as cepas também foi relatada por Rowlands
25 *et al.* (2014), ao observarem 237 cepas de *Salmonella* spp. isoladas de alimentos no

1 Brasil. Zou *et al.* (2012) em um estudo realizado na Carolina do Norte (EUA), no
2 período de junho de 2009 a setembro de 2010, mostraram que 99,3% das cepas de
3 *S. Enteritidis* isoladas de surtos de salmonelose em humanos apresentavam o gene.
4 De acordo com Whang *et al.*, (2009), o gene *invA* parece ser bastante conservado
5 em *Salmonella spp.*, o que justifica sua elevada ocorrência (Tabela 2).
6 Além da capacidade de invasão, a presença do gene *sodC* sugere o potencial de
7 sobrevivência sob estresse oxidativo e de indução de apoptose nas células
8 infectadas (*avrA*). Possuir o gene *sodC* reforça o potencial patogênico e adaptativo
9 das cepas e, apesar da inexistência de casos notificados de salmonelose por este
10 sorovar, demonstra a possibilidade de causar doença em humanos. Portanto, seu
11 isolamento em amostras ambientais, carne de frango e seus derivados pode indicar
12 uma fonte de transmissão deste agente ao homem.

13 Borges *et al.* (2013) avaliaram 84 cepas de *S. Enteritidis*, isoladas entre 1996 a 2010
14 de diferentes fontes aviárias, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil, e observaram
15 resultado similar ao nosso estudo, com presença dos genes *invA* e *avrA* em 100%
16 (84/84) dos isolados e os genes *lpfA* e *agfA* identificados em 99% (83/84) e 96%
17 (81/84) dos isolados, respectivamente.

18 De forma semelhante, Ahmed *et al.* (2016) também observaram no Egito, padrões
19 semelhantes aos deste estudo em 20 isolados de *S. Typhimurium* originados de
20 frango e 10 isolados de origem humana, com frequência dos genes *invA* e *avrA* de
21 100% (30/30). Concluíram, desta forma, que uma alta frequência destes genes é
22 observada em sorovares com potencial de causar salmonelose em humanos.

23 A ausência do gene *sefA* nas cepas estudadas pode ser justificada pelo estudo
24 realizado por Amini *et al.* (2010), os quais constataram que este gene não está
25 presente em todos os sorovares, sendo restrita a salmonelas do grupo D, como os

1 sorotipos Enteritidis, Dublin, Moscow e Blegdon.

2 A presença dos genes *agfA*, *lpfA* e *luxS* demonstra que as cepas estudadas
3 possuem potencialmente capacidade de adaptar-se a condições ambientais
4 adversas por meio da aquisição da forma de vida séssil. Estudos semelhantes
5 realizados com diferentes sorotipos de *Salmonella* demonstraram a presença do gene
6 *agfA* em mais de 91,4% das cepas isoladas de aves (Borsoi *et al.*, 2009, Borges *et*
7 *al.*, 2013, Yoo *et al.*, 2013).

8 Segundo Borges *et al.* (2013), a frequência destes genes e o estabelecimento de
9 perfis genéticos podem ser utilizados para determinar os padrões de virulência dos
10 isolados podendo, deste modo, ser cruciais na prevenção e na implantação de
11 programas mais eficazes de controle pelas indústrias.

12 O dendrograma, construído a partir dos resultados do PFGE, foi comparado
13 considerando o local de isolamento, a data da coleta, e a presença ou não dos
14 genes *avrA*, *sodC*, *invA*, *agfA*, *lpfA* e *luxS*. A análise de similaridade das 20 cepas de
15 *S. Minnesota* demonstrou a presença de 14 pulsotipos (A a N) (Fig.1), em que três
16 apresentaram similaridade genotípica acima de 80% “C”, “K” e “M”.

17 O pulsotipo “C” agrupou duas cepas, M17 e M14, com similaridade igual a 82,8%,
18 oriundas do aviário de frango de corte da indústria B em períodos distintos, 2009 e
19 2010, com a presença dos genes *avrA*, *sodC*, *invA*, *agfA* e *luxS* em comum. Apesar
20 de pertencerem à mesma indústria (B), são cepas de filiais distintas, sendo uma no
21 estado de São Paulo e outra do Mato Grosso do Sul, indicativo de manejo improprio
22 levando a uma seleção independente de cepas similares das aves para o
23 abatedouro.

24 O pulsotipo “K” agrupou quatro cepas, sendo duas (M04 e M03) clones, isoladas do
25 abatedouro da indústria A de Minas Gerais os outros da indústria B. A falta de

1 higienização correta pode ser a justificativa da ocorrência deste perfil, uma vez que
2 foram isoladas em períodos muito próximos, ambas de novembro de 2014. A
3 presença dos genes *avrA*, *sodC*, *invA*, *agfA* e *lpfA* foi comum em ambas.

4 Demais cepas do pulsotipo K (M20 e M16) foram isoladas em 2010 tanto no aviário
5 quanto na sala de cortes da indústria B no Mato Grosso do Sul. Os genes *avrA*,
6 *sodC*, *invA* e *luxS* foram comuns entre elas. A contaminação cruzada também
7 parece ser a causa da presença do agente, porém há indícios de negligência das
8 normas de biossegurança em virtude da presença do agente tanto na área limpa
9 quanto na área suja do processamento. De acordo com Moura et al. (2014), a
10 negligência às normas de biossegurança dentro da indústria é um fator decisivo para a
11 manutenção do micro-organismo no ambiente.

12 Paralelamente, o pulsotipo K indica que houve disseminação do perfil, uma vez que
13 há cepas similares tanto em Mato Grosso do Sul quanto em Minas Gerais, em
14 diferentes indústrias.

15 O pulsotipo "M" agrupou três cepas (M08; M07 e M05) com similaridade igual a
16 83,6% do ano de 2014, provenientes do abatedouro da indústria A de Minas Gerais.
17 As cepas apresentaram os genes *avrA*, *sodC*, *invA* e *agfA* em comum.

18 Além da contaminação cruzada, é possível sugerir que há persistência de cepas
19 com similaridade maior que 80%, no ambiente do aviário ou abatedouro,
20 provavelmente, pela presença em biofilmes. A forma séssil permite o isolamento em
21 momentos distintos e também facilita a disseminação para outros ambientes da
22 indústria.

23

24

25

26

1 **CONCLUSÕES**

2 A presença dos genes de virulência, de formação de biofilmes e de adaptação ao
3 estresse oxidativo encontrada nas cepas de *S. Minnesota* indica que este sorovar
4 apresenta potencial para causar doença em humanos e adaptar-se a condições
5 adversas.

6 A análise filogenética mostrou que as cepas apresentam alta diversidade genética e
7 que a presença de cepas semelhantes está associada, provavelmente, a problemas
8 de contaminação cruzada, à disseminação entre empresas e à formação de
9 biofilmes dentro do estabelecimento.

10 A emergência do sorovar e o potencial virulento indicam a necessidade de seu
11 monitoramento tanto na produção primária quanto na indústria e sugere mais
12 investigações para determinar o risco que representam à saúde pública.

13

14 **Referências**

15

16 Ahmed, H.A., El-Hofy, F.I., Shafik, S.M., Abdelrahman, M.A. e Elsaid, G.A. (2016)
17 Characterization of virulence-associated genes, antimicrobial resistance genes,
18 and class 1 integrons in *Salmonella* enterica serovar Typhimurium isolates from
19 chicken meat and humans in Egypt. *Foodborne Pathogens And Disease*. **6**: 281-
20 288. doi: <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2015.2097>.

21

22 Amini, K., Salehi T.Z., Nikbahkht G., Ranjbar R., Amini J. e Ashrafganjooei S.B.
23 (2010). Molecular detection of *invA* and *spv* virulence genes in *Salmonella* Enteritidis
24 isolated from human and animals in Iran.420 *Afr. J. Microbiology Reserch*. **4**: 2202-
25 2210.

- 1 Borges, K.A., Furian, T.Q., Borsoi, A., Moraes, H.L.S., Salle, C.T.P. e Nascimento,
2 V.P., (2013). Detection of virulence-associated genes in *Salmonella*
3 Enteritidis isolates from chicken in Southern Brazil, *Pesquisa Veterinaria Brasileira*.
4 **33**: 1416-1422. doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2013001200004>
5
- 6 Borsoi A., Santin E., Santos L.R., Salle C.T.P., Moraes H.L.S. e Nascimento V.P.
7 (2009). Inoculation of newly hatched broiler chicks with two Brazilian isolates of
8 *Salmonella* Heidelberg strains with different virulence gene profile, antimicrobial
9 resistance and pulsed field gel electrophoresis pattern to intestinal changes
10 evaluation. *Poultry Science*. **88**: 750-758. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00466>
11
- 12 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº
13 70, de 06 de outubro de 2003. Institui o Programa de Redução de Patógenos -
14 Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp. em carcaças de Frangos
15 e Perus. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 440, 1: 9.
16
- 17 Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de
18 Vigilância das Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral de Doenças
19 Transmissíveis. Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e
20 Alimentar. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. (2017). *Diário*
21 *Oficial da União*, Brasília, DF. 6: 1-818.
22
- 23 Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de
24 Vigilância das Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral de Doenças
25 Transmissíveis. Unidade de Vigilância das Doenças de Transmissão Hídrica e

1 Alimento. *Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil*. (2016).
2 Disponível em:
3 <[http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta----o-Surtos-
5 DTA-2016.pdf](http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/junho/08/Apresenta----o-Surtos-
4 DTA-2016.pdf)> Acesso em : 03 janeiro 2018

6 Campos J.; Mourão J.; Silveira L.; Saraiva M.; Correia C.B.; Maças A.P.; Peixe L.;
7 Antunes P. (2018). Imported poultry meat as a source of extended-spectrum
8 cephalosporin-resistant *CMY-2* producing *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella*
9 Minnesota in the European Union, 2014–2015. *International Journal of Antimicrobial*
10 *Agents*. **51**: 151–154. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.09.006>

11

12 Centers for Disease Control and Prevention. Marder, E.P., Cieslak, P.R. e
13 Cronquist, A.B., (2017). Incidence and Trends of Infections with Pathogens
14 Transmitted Commonly Through Food and the Effect of Increasing Use of Culture-
15 Independent Diagnostic Tests on Surveillance — Foodborne Diseases Active
16 Surveillance Network. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. **66**: 397–403.
17 doi: <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6615a1>

18

19 Centers for Disease Control and Prevention. Standard Operating Procedure for
20 PulseNet PFGE of *Escherichia coli* O157:H7, *Escherichia coli* non-O157 (STEC),
21 *Salmonella* serotypes, *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* (2013). *PNL05*. 1-13.
22 2013.

23

24

- 1 Choi J, Shin D e Ryu S. 2007. Implication of quorum sensing in *Salmonella* enterica
2 serovar Typhimurium virulence: the luxS gene is necessary for expression of genes
3 in pathogenicity island 1. *Infection and Immunity*. **75**: 4885-4890.
4 <https://doi.org/10.1128/IAI.01942-06>
5
- 6 Collinson K., Doig P.C., Doran, J.L., Clouthier, S., Trust, T.J. e Kay, W.W. (1993).
7 Thin aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella* Enteritidis to fibronectin.
8 *Journal Bacteriology*. **175**: 12-18. <https://doi.org/10.1128/jb.175.1.12-18.1993>
9
- 10 Costa, R.G., Festivo, M.L., Araujo, M.S., Reis, E.M., Lázaro, N.S. e Rodrigues, D.P.
11 (2013). Antimicrobial susceptibility and serovars of *Salmonella* circulating in
12 commercial poultry carcasses and poultry products in Brazil. *Journal of Food*
13 *Protection*. **76**: 2011-7. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-164>
14
- 15 European Food Safety Authority e European Centre for Disease Prevention and
16 Control, 2017. The European Union Summary report on trends and sources of
17 zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal* 2017.
18 **15**: 5077, 228 doi: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5077>
19
- 20 European Food Safety Authority. Scientific report of EFSA and ECDC: The European
21 Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and
22 food-borne outbreaks in 2012. *EFSA Journal*. **12**: 312p., 2014.
23 <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3547>
24

- 1 European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and
2 sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA*
3 *Journal*. **13**(1):162 p., 2015. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.3991>
- 4 FAO / WHO – Food and Agriculture organization of the United Nations and World
5 health organization. *Salmonella* and *Campylobacter* in chicken meat: Meeting report.
6 Microbiological Risk Assessment Series 19, Rome, 56p., 2009.
- 7
- 8 GOERING, R. V. **Pulsed-field gel electrophoresis**. In: PERSING, D. H. et al. (Ed.).
9 Molecular microbiology, diagnostic principles and practice. Washington: ASM Press,
10 2004. p. 185-196.
- 11
- 12 Heuzenroeder M.W., Murray C.J. e Dalcin R.M. (2000). Molecular basis of benign
13 colonization of *Salmonella* Sofia in chickens. Rural Industries ReD Corporation,
14 *Journal of Bacteriology* **189**: 4343–4352.
- 15
- 16 Jeongjoon, C.; Dongwoo, S. e Sangryeol, R. (2007). All Rights Reserved. Implication
17 of *Quorum Sensing* in *Salmonella* enterica serovar Typhimurium Virulence: the *luxS*
18 Gene Is Necessary for Expression of Genes in Pathogenicity Island. *Infection and*
19 *Immunity*. **75**: 4885-4890. <https://doi.org/10.1128/IAI.01942-06>
- 20
- 21 Krishnakumar, R., Kim, B., Mollo, E.A., Imlay, J.A., e Slauch, J.M. (2007). Structural
22 properties of periplasmic SodCI that correlate with virulence in *Salmonella*
23 *enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Bacteriology*. **12**:4343-4352, doi:
24 <http://dx.doi.org/10.1128/jb.00010-07>.
- 25

- 1 Machado, S.C.A, Pereira, V.L.A, Aquino, M.H.C, Santos, A.F.M, Rodrigues, D.P,
2 Giombelli, A, e Nascimento, ER (2017). Serotyping and Genotyping of *Salmonella*
3 Strains Isolated from Broilers, Chicken Carcasses Before and After Chilling, and
4 Frozen Chicken Breasts Produced in the States of Mato Grosso do Sul and Santa
5 Catarina, Brazil. *Revista Brasileira de Ciência Avícola. Revista Brasileira de Ciência*
6 *Avícola*. **19**:135-142, doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1806-9061-2016-0371>.
7
- 8 Moura M.S., Oliveira R.P., Melo R.T., Mendonça E.P., Fonseca B.B. e Rossi, D.A.
9 (2014). Genes de virulência e diversidade genética em *Salmonella* spp. isoladas de
10 amostras de origem suína. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*.
11 **66**: 1367-1375. <https://doi.org/10.1590/1678-6809>
12
- 13 Oliveira S.D., Santos L.R., Schucha D.M.T., Silva A.B., Salle C.T.P. e Canal C.W.
14 (2002). Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by
15 PCR. *Veterinary Microbiology*. **87**:25-35. <https://doi.org/10.1016/S0378->
16 [1135\(02\)00028-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(02)00028-7)
17
- 18 Prager, R.; Rabsch, W.; Steckel, W.; Voigt, W.; Tietze, E.; Tschâpe, H (2003).
19 Molecular properties of *Salmonella enterica* serotype Paratyphi B distinguish
20 between its systemic and its enteric pathovars. *Journal of Clinical Microbiology*.
21 **41**:4270-7278. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4270-4278.2003>
22
- 23 RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed). Poultry meat and poultry meat
24 products 04/05/2017 2017.AUG border rejection Germany Brazil (O), Germany
25 *Salmonella enterica* ser. Minnesota (1 out of 5 samples /25g) in frozen salted chicken

1 breast fillets from Brazil Absence/25g and Poultry meat and poultry meat products
2 05/05/2017 2017.AUP border rejection Germany Brazil (O), Germany *Salmonella*
3 *enterica* ser. Heidelberg (in 1 out of 5 samples /25g) and 79 *Salmonella enterica* ser.
4 Minnesota (in 2 out of 5 samples /25g) in frozen salted chicken breasts from Brazil
5 Absence/25g. 2017 b. Disponível em <[https://s3-euwest-](https://s3-euwest-1.amazonaws.com/phytocontrol/wp-content/uploads/2017/05/09144341/09-0517.pdf)
6 [1.amazonaws.com/phytocontrol/wp-content/uploads/2017/05/09144341/09-](https://s3-euwest-1.amazonaws.com/phytocontrol/wp-content/uploads/2017/05/09144341/09-0517.pdf)
7 [0517.pdf](https://s3-euwest-1.amazonaws.com/phytocontrol/wp-content/uploads/2017/05/09144341/09-0517.pdf)>. Acesso em 02 março. 2018.

8
9 RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed). *Salmonella enterica* ser. Minnesota
10 (presença/25g) em peitos de frango salgados congelados do Brasil através dos
11 Países Baixos, 2017 a. Disponível em:
12 <[https://webgate.ec.europa.eu/rasffwindow/portal/?event=notificationDetail&NOTIF_](https://webgate.ec.europa.eu/rasffwindow/portal/?event=notificationDetail&NOTIF_REFERENCE=2017.0501)
13 [REFERENCE=2017.0501](https://webgate.ec.europa.eu/rasffwindow/portal/?event=notificationDetail&NOTIF_REFERENCE=2017.0501)> Acesso em 02 março. 2018.

14
15 RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed). *The rapid alert system for food and*
16 *feed. Annual Report of European Commission*. 60p, 2012. Disponível em:
17 [https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2012_en.p](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2012_en.pdf)
18 [df](https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/rasff_annual_report_2012_en.pdf) >. Acesso em 02 março. 2018.

19
20 Rowlands R.E.G., Ristori C.A., Ikuno A.A., Barbosa M.L., Jakabi M. e Franco
21 B.D.G.M. (2014). Prevalence of drug resistance and virulence features in *Salmonella*
22 spp. isolated from foods associated or not with salmonellosis in Brazil. *Revista do*
23 *Instituto Medico Tropical*. 56: 461-467. [https://doi.org/10.1590/S0036-](https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000600001)
24 [46652014000600001](https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000600001)

25

- 1 Sanjay, M.K, Shrideshikan, S.M, Usha, M.S, Philipraj, A, Gaddad, S.M e Shivannavar
2 C. T. (2010). Detection, amplification and sequence homology of *sodC* in clinical
3 isolates of *Salmonella* sp. *Indian Journal of Medical Research*.131:565–570.
4
- 5 Streulens, M.J.; De Ryck, R.; Deplano, A. Analysis of microbial genomic
6 macrorestriction patterns by pulse-field gel electrophoresis (PFGE) typing. *In*:
7 DIJKSHOORN, L.; TOWNER, K. J.; STRULENS, M. (Ed.) New approaches for the
8 generation and analysis of microbial typing data. Amsterdam: *Elsevier Science B.V.*,
9 2001. p. 159-176. <https://doi.org/10.1016/B978-044450740-2/50008-3>
10
- 11 Voss-Rech, D.; Vaz, C.S.L.; Alves, L.; Coldebella, A.; Leão, J. A.; Rodrigues, D.P. e
12 Back, A (2015). A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms
13 in Brazil. *Poultry Science*, 94: 433-441. <https://doi.org/10.3382/ps/peu081>
14
- 15 Whang, Y. P.; Lia, L.; Shena, J. Z.; Yangb, F. J. e Wu, Y. W. (2009). Quinolone-
16 resistance in *Salmonella* is associated with decreased mRNA expression of virulence
17 genes *invA* and *avrA*, growth and intracellular invasion and survival. *Veterinary*
18 *Microbiology*. 133: 328-334. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.07.012>
19
- 20 Yang, B., Qiao, L., Zhang, X., Cui, Y., Xia, X., Cui, S., Meng, J. (2013). Serotyping,
21 antimicrobial susceptibility, pulse field gel electrophoresis analysis of *Salmonella*
22 isolates from retail foods in Henan Province, China. *Food Control*. 32: 228-235.
23 <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.022>
24

1 Yoo A.Y., Yu J.E., Yoo H., Lee T.H., Lee W.H., Oha J.I. e Kang H.Y. (2013). Role of
2 sigma factor E in regulation of *Salmonella* Agf expression. *Biochem. Biophys.*
3 *Resvista. Commun.* **430**:131-136. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.11.025>

4

5 Zou M., Keelara S. e Thakur S. (2012). Molecular characterization of *Salmonella*
6 enterica serotype Enteritidis isolates from humans by antimicrobial resistance,
7 virulence genes, and pulsed-field gel electrophoresis. *Foodborne Pathog. Disease.* 9:
8 232-238. <https://doi.org/10.1089/fpd.2011.1012>

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

TABELAS

Tabela 1: Genes de virulência, concentração, números de pares de bases dos amplicons (pb), sequência dos *primers* e trabalhos de referência utilizados para os protocolos de amplificação.

Gene	Concentração	Amplicon (PB)*	Primer	Referência
<i>avrA</i>	20pmol	385	GTTATGGACGGAACGACATCGG ATTCTGCTTCCCGCCGCC	Prager <i>et al.</i> (2003)
<i>sodC</i>	20pmol	500	ATGAAGCGATTAAGTTTAGCGATGG TTTAATGACTCCGCAGGCGTAACGC	Sanjay <i>et al.</i> (2010)
<i>invA</i>	10pmol	284	GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	Oliveira <i>et al.</i> (2002)
<i>sefA</i>	10 pmol	488	GATACTGCTGAACGTAGAAGG GCGTAAATCAGGATCTGCAGTAGC	Oliveira <i>et al.</i> (2002)
<i>agfA</i>	10 pmol	350	TCCACAATGGGGCGGCGGCG CCTGACGCACCATTACGCTG	Collinson <i>et al.</i> (1993)
<i>lpfA</i>	10 pmol	250	CTTTCGCTGCTGAATCTGGT CAGTGTTAACAGAAACCAGT	Heuzenroeder <i>et al.</i> (2000)
<i>luxS</i>	20 pmol	1080	GATAATCCTGAACTAAGCTTCTCCGC GGTTATGAGAAAAGCATGCACCGATCA	Choi <i>et al.</i> (2007)

PCR quanto à presença dos genes associados aos processos de apoptose (*avrA*), potencial de sobrevivência sob estresse oxidativo (*sodC*), invasão (*invA*), adesão e biofilme (*agfA*, *sefA* e *lpfA*) e *quorum-sensing* (*luxS*). Análise de 20 cepas de *S. Minnesota* quanto a genes de virulência, concentração, tamanho de amplicom (pb) e sequência dos *primers*. * pb: pares de bases

Tabela 2. Perfis de virulência de 20 cepas de *S. Minnesota* isolados de plantas de abate localizadas em três estados brasileiros durante os anos de 2009, 2010 e 2014.

Genes de virulência	Perfil	N (%)
<i>avrA, sodC, invA, agfA, lpfA, luxS</i>	P1	10 (50)
<i>avrA, sodC, invA, agfA, lpfA</i>	P2	4 (20)
<i>avrA, sodC, invA, agfA, luxS</i>	P3	5 (25)
<i>avrA, sodC, invA, lpfA, luxS</i>	P4	1 (5)

Quatro perfis de virulência distintos (P1, P2, P3 e P4), sendo P1 positivo para todos os genes (10/20); P2 negativo apenas para *luxS* (4/20); P3 negativo para *lpfA* (5/20) e P4 negativo para *agfA* (1/20). O perfil de maior frequência foi P1, presente em 50% dos isolados.

1
2
3

Figura

Figura 1: Dendrograma referente à avaliação dos isolados de *S. Minnesota*



4
5
6
7
8
9
10
11

Dendrograma comparativo entre 20 cepas *S. Minnesota*, construído a partir dos resultados do PFGE considerando o local de isolamento, a data da coleta, e a presença ou não dos genes *avrA*, *sodC*, *invA*, *agfA*, *lpfA* e *luxS* utilizando o coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5% e método UPGMA com otimização de 0,80%. Presença de 14 Pulstipos (A ao N) – três apresentaram similaridades genotípica acima de 80% “C”, “K” e “M”.

CAPÍTULO III

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA NA FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE *Salmonella* Minnesota E EMERGÊNCIA DA SUA TOLERÂNCIA A BIOCIDAS

**Artigo a ser submetido ao periódico: Pesquisa Veterinária
Brasileira**

Influência da temperatura na formação de biofilmes de *Salmonella* Minnesota e emergência da sua tolerância a biocidas. ¹

Taciano R. Cardoso ^{2*}, Eliane P. Mendonça², Roberta T. Melo², Guilherme P. Monteiro², Phelipe A.B.M. Peres²; Daise A. Rossi²

ABSTRACT. –Cardoso T. R., Mendonça E.P., Melo R.T., Monteiro G.P., Peres P.A.B.M. e Rossi D.A. 2019. [Influence of temperature in *Salmonella* Minnesota's biofilm formation and emergency of its tolerance to biocides.]

Influência da temperatura na formação de biofilmes de *Salmonella* Minnesota e emergência da sua tolerância a biocidas. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada da Universidade Federal de Uberlândia (LABIO-UFU), Universidade Federal de Uberlândia, Rua Ceará, Umuarama, 38402018 - Uberlândia, MG, Brazil. E-mail: tacianoreis@hotmail.com

We evaluated in *S. Minnesota* isolates, formation capacity and biofilm formation index (BFI) at temperatures of 4°C, 25°C and 36°C, and the ability of biocidal agents to promote inhibition of the formed structure. Twenty strains of *S. Minnesota* isolated in the years 2009, 2010 and 2014 in slaughtering plants of broilers of two Brazilian companies were used, inspected by SIF and qualified for internal and external trade. The BFI was performed by the classical method, in TSB broth supplemented with 5% of chicken juice under constant agitation, at temperatures of 4°C, 25°C and 36°C. The reading was performed by absorbance (DO₆₀₀). For the inhibition test, the biofilms were formed on cellulose membranes (four membranes / strain) on TSA plates at 36°C for three consecutive days. On the third day the membranes were added to the treatments: control, 1% of chlorhexidine, 1% of sodium hypochlorite and 0.8% of peracetic acid for 15 minutes. After washing the membranes with sterile 0.9% NaCl, 1% of trypsin was added for 15 minutes, and counts of the suspended contents were performed. The ability of *S. Minnesota* to develop biofilm at different temperatures is highly variable and strain dependent. Temperatures of 25°C and 36°C allowed the formation of biofilms with the same intensity and higher than that found at 4°C. Considering the BFI, we can conclude that the maintenance of the meat processing environment at temperatures of 4°C inhibits the formation of biofilms, but there is formation of a biomass that may be sufficient for the contamination of the final product. The use of peracetic acid and chlorhexidine showed the same efficiency in the reduction of the counts for the resistant strains, with a mean reduction of 3.24 and 3.91 log cycles, respectively. The inclusion of stricter measures to prevent the installation and to ensure the removal of *S. Minnesota* biofilms, coupled with monitoring protocols, should be a strategy in the poultry industry to ensure the safety of the final product.

INDEX TERMS: Salmonellosis, disinfectants, sessis cells, sanitation.

¹Recebido em.....

Aceito para publicação em

² Universidade Federal de Uberlândia – Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Rua Ceará/n, Bloco 2D sala 43, Campus Umuarama – CEP: 38042-018 – Uberlândia, MG, Brazil. *Autor para correspondência: tacianoreis@hotmail.com

RESUMO- Nós avaliamos em isolados de *S. Minnesota*, o índice de formação de biofilme (IFB) nas temperaturas de 4°C, 25°C e 36°C, e a capacidade de agentes biocidas promoverem a inibição da estrutura formada. Foram utilizadas 20 cepas de *S. Minnesota* isoladas nos anos de 2009, 2010 e 2014, em plantas de abate de frangos de corte de duas empresas brasileiras, inspecionados pelo SIF e habilitadas para o comércio interno e externo. O IFB foi realizado pelo método clássico, em caldo TSB suplementado com 5% de *chicken juice* sob agitação, nas temperaturas de 4°C, 25°C e 36°C. A leitura foi realizada por absorbância (DO₆₀₀). Para o teste de inibição, os biofilmes foram formados em membranas de celulose (quatro membranas/cepa) em placas de TSA a 36° C durante três dias consecutivos. No terceiro dia as membranas foram submetidas por 15 minutos aos tratamentos: controle, clorexidina 1%, hipoclorito de Sódio 1% e ácido peracético 0,8%. Depois de lavar as membranas com NaCl a 0,9% estéril, adicionou-se 1% de tripsina durante 15 minutos e realizaram-se as contagens dos conteúdos suspensos. A capacidade de *S. Minnesota* para desenvolver biofilme em diferentes temperaturas foi altamente variável e cepa dependente. As temperaturas de 25°C e 36°C permitiram a formação de biofilmes com a mesma intensidade e superior ao encontrado na temperatura de 4°C. Considerando o IFB, podemos concluir que a

manutenção do ambiente de processamento de carnes em temperaturas de 4°C pode inibir a formação de biofilmes, porém há formação de uma biomassa que pode ser suficiente para a contaminação do produto final. O uso de ácido peracético e clorexidina apresentou a mesma eficiência na redução das contagens das linhagens resistentes, com redução média de 3,24 e 3,91 ciclos log, respectivamente. Das cepas estudadas, 12/20 (60%) foram resistentes a todos os biocidas testados. A inclusão de medidas mais rigorosas para impedir a instalação e garantir a remoção de biofilmes de *S. Minnesota*, juntamente com protocolos de monitoramento, deve ser uma estratégia na indústria avícola para garantir a segurança do produto final.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Salmonelose, desinfetantes, células sesséis, higienização.

INTRODUÇÃO

Salmonella é um patógeno zoonótico frequentemente incriminado em doença alimentar, que possui como maior fonte de infecção humana, a ingestão de carnes de frango ou de seus derivados (CDC, 2017; EFSA, 2017).

Dentre os diferentes sorovares envolvidos na salmonelose humana, destacam-se principalmente *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. Porém, o aumento no número de isolamentos de *S. Minnesota* na cadeia de produção de carne de aves no Brasil tem gerado preocupação perante os exportadores, uma vez que somente a presença do gênero já é motivo para embargos sanitários ou alertas internacionais. Assim, a emergência deste sorovar pode comprometer a qualidade da carne e indicar a necessidade de novas medidas de controle (FREITAS, 2011; COSTA, et al., 2013; CODA-CERVA, 2014; VOSS-RECH, et al., 2015; CAMPOS, et al., 2018).

Uma das hipóteses que podem explicar a persistência de *S. Minnesota* e o consequente aumento no número de isolamentos é sua capacidade de formar biofilmes, já que na forma sésil, geralmente os micro-organismos possuem maior potencial de sobrevivência em ambientes hostis (STEENACKERS, et al., 2012; ZIECH, et al., 2016; BORGES, et al., 2018). Os biofilmes dificultam o controle de *Salmonella* nas indústrias alimentícias (ZIECH, et al., 2016), e nesta condição, estes micro-organismos apresentam diferentes respostas aos tratamentos térmicos, biocidas e antimicrobianos, e tornam-se uma fonte constante de contaminação (CORCORAN, et al., 2013; MACHADO, et al., 2017; SILVA, et al., 2018).

Os processos de higienização com o uso adequado de agentes biocidas são indispensáveis para a prevenção da formação de biofilmes. De forma geral, bons agentes biocidas são aqueles com capacidade de reduzir o número de células livres, e também, prevenir a sua adesão às superfícies. Mørseth et al. (2009) afirmam que a redução de no mínimo 4 ciclos log das células sesséis comprovam a eficácia de um sanitizante.

Considerando a importância da formação de biofilmes na produção de alimentos, objetivou-se conhecer o comportamento de diferentes cepas de *S. Minnesota* frente a condições de temperatura que possam simular o ambiente industrial, assim como, a eficiência de agentes biocidas utilizados nos processos de desinfecção para inibi-los. Estes dados podem orientar no estabelecimento de temperaturas ideais para prevenir a formação e desenvolvimento de células sesséis e na utilização de biocidas mais eficazes.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 20 cepas de *S. Minnesota* isoladas nos anos de 2009, 2010 e 2014, em plantas de abate de frangos de corte de duas empresas brasileiras, inspecionados pelo Sistema de Inspeção Federal (SIF), habilitadas para o comércio interno e externo.

A confirmação do gênero foi realizada conforme protocolo descrito na IN 70 (BRASIL, 2003) e identificadas a nível de sorovar pelo Departamento de Bacteriologia do Laboratório de Enterobacterias da Fundação Instituto Oswaldo Cruz no estado do Rio de Janeiro (IOC/FIOCRUZ, RJ, Brasil). Antes do processamento de cada uma das cepas, todas foram confirmadas como pertencentes ao gênero *Salmonella*, utilizando os primers (F: 5' ATCGCTGACTTATGCAATCG 3', R: 5' CGGGTTGCGTTATAGGTCTG 3') referentes ao gene *ompC* (JAWAD e AL-CHARRAKH, 2016)

Índice de Formação de Biofilmes

A determinação do índice de formação de biofilme (IFB) foi realizado segundo Kudirkiene et al. (2012) e Naves et al. (2008), com modificações. As cepas foram cultivadas em caldo BHI (Oxoid®), semeadas em ágar TSA (Oxoid®) e incubadas por 24 horas a 36°C. Após a incubação, uma alçada da colônia foi acrescentada a 20 mL de caldo TSB (Oxoid®) suplementado com 5% de

chicken juice, e novamente incubada por 24 horas a 36°C sob agitação constante (175rpm) até atingir DO₆₀₀ próximo a 0,25. O material então foi centrifugado 5000 rpm /10 minutos /4°C, e o *pellet* obtido lavado com solução de NaCl 0,9% em três centrifugações sucessivas. A suspensão da última lavagem foi acrescentada ao caldo TSB (Oxoid®) suplementado com 5% de *chicken juice* na concentração de 1:100, que foi então adicionado em microplaca de poliestireno (Kasvi®), que foram incubadas por 24 horas nas temperaturas pré determinadas de 4°C, 25°C e 36°C. Como controle foi utilizada a cepa de *Salmonella* Enteritidis ATCC13076. Foram realizadas três repetições com oito réplicas para cada uma das temperaturas.

Após a incubação o conteúdo em suspensão foi submetido a leitura da absorbância DO₆₀₀. O biofilme formado no fundo dos poços foi lavado duas vezes com solução NaCl 0,9% e secadas a 55°C por 50 minutos. Após a secagem foi acrescentado em cada poço 200µL de solução de cristal-violeta a 1% (Synth®) por 5 minutos. As placas então foram lavadas três vezes com água ultrapura e secadas novamente a 55°C por 15 minutos, sendo após realizada a eluição do corante com solução de álcool-metílico (Synth®) e realizada a leitura da absorbância DO₆₀₀.

Os resultados obtidos das células em suspensão e das células aderidas foram classificados para determinação do Índice de Formação de Biofilme (IFB) utilizando a fórmula conforme Naves, et al. (2008).

$$IFB = \frac{BA - PC}{BS}$$

O IFB é o resultado do índice detectado, BA a leitura das bactérias aderidas, PC a leitura da absorbância dos poços controle sem micro-organismos e BS a leitura da absorbância das bactérias em suspensão, classificados de acordo com a Quadro 1.

Teste de Inibição da formação dos biofilmes

Foi utilizado o protocolo descrito por Lu et al. (2012). As bactérias cultivadas em ágar TSA (Oxoid®) foram adicionadas a uma solução de NaCl 0,9% até atingir a concentração 10⁷ UFC/mL e uma alíquota de 100µL foi acrescentada a membrana de celulose sobre placas de ágar TSA (Oxoid®) e incubadas por 24 horas a 36°C, sendo utilizadas quatro membranas para cada cepa.

Após a incubação, as membranas foram removidas e transferidas novamente a uma nova placa de ágar TSA (Oxoid®), incubadas nas mesmas condições e novamente esta operação repetida após 24 horas. No terceiro dia as membranas foram acrescentadas aos tratamentos em frascos estéreis, sendo o primeiro o controle com apenas caldo TSB (Oxoid®), o segundo com clorexidina 1% (Vicpharma®), o terceiro com hipoclorito de Sódio 1% (Sanikoll®) e o quarto com ácido peracético 0,8% (Synth®). Cada tratamento foi incubado por 15 minutos. Em seguida, as membranas foram lavadas com solução salina e após a lavagem foi acrescentado solução de tripsina 1% (ThermoFisher®) e mantida por 15 minutos. Foram realizadas diluições seriadas do conteúdo desprendido até a diluição 10⁻⁶, que foi então adicionado a placas de TSA (Oxoid®), incubadas a 36°C por 24 horas para realização das contagens.

Análise dos resultados

Para análise dos resultados foi utilizado o programa GraphPadPrism, versão 5.0. Foi aplicado teste de análise de variância simples (ANOVA) para os testes qualitativos e quantitativos de formação de biofilme e para comparação entre os tratamentos. Para o teste de inibição de biofilme, foi utilizado teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Todos os testes foram realizados com índice de confiança de 95%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Influência da temperatura nos biofilmes de *S. Minnesota*

Superfícies úmidas e ricas em nutrientes na produção avícola oferecem condições ideais para *Salmonella* se fixar e formar biofilmes (ARIAFAR, et al., 2016).

Do total de 20 cepas avaliadas, observou-se que todas (100%) foram incapazes de formar biofilme na temperatura de 4°C, de acordo com a classificação de Naves et al. (2008) (Quadro 2). Esses dados estão de acordo com o trabalho realizado por Dhakal et al. (2019), que encontraram valores de densidade óptica iguais ao controle negativo para seis sorovares de *Salmonella* testados, quando mantidos a temperatura de refrigeração.

Estudo realizado com uma estirpe padrão de *S. Minnesota* demonstrou que este sorovar apresenta capacidade de formar biofilmes de média intensidade em condições *in vitro* (SILVA, et al., 2018). De maneira complementar, nosso estudo indica que a classificação do IFB para este sorovar é

cepa-dependente, e que provavelmente, existem outros fatores que determinam essa variabilidade, como a presença e expressão do gene *agfA*, que codifica uma fímbria agregativa que apresenta função importante no processo de fixação na superfície facilitando a formação de biofilmes (Melo et al., 2019).

O aumento da temperatura (25°C e 36°C) favoreceu a formação do biofilme, com formação de biofilmes de fraca (6/20 cepas a 25°C e 8/20 cepas a 36°C) e média intensidade (3/20 cepas a 25°C e a 36°C) (Quadro 2). Não foi identificado IFB de forte intensidade em nenhum dos tratamentos. Isso condiz com estudo realizado por Borges et al. (2018), que avaliaram a formação de biofilmes em *S. Heidelberg*, *S. Typhimurium*, *S. Agona*, *S. Infantis*, *S. Brandenburg* e *S. Tennessee* nas temperaturas de 3°C, 12°C, 28°C e 36°C, e também não identificaram em nenhum momento IFB forte.

Foram identificados seis perfis de IFB nas cepas (A-F), sendo o mais prevalente aquele classificado como inexistente nas três temperaturas (9/20 – 45,0%) (Quadro 3).

Apesar da classificação de biofilme inexistente para todas as cepas quando mantidas a 4°C, quando consideramos a análise estatística comparada ao controle negativo, constatamos que 9/20 (45,0%) cepas apresentaram formação de biomassa à temperatura de 4°C, 19/20 (95,0%) à temperatura de 25°C e 100% à temperatura de 36°C. Esses resultados mostram que, mesmo em condições de estresse térmico sob baixas temperaturas, *S. Minnesota* consegue formar uma biomassa que permite sua viabilidade.

Os resultados encontrados em nosso estudo indicam que *S. Minnesota* pode se tornar um problema de difícil controle durante o processamento de frangos de corte na indústria. Considerando a elevada prevalência em aviários e abatedouros de frangos de corte brasileiros (VOSS-RECH, et al., 2015), é possível que essas bactérias permaneçam no ambiente industrial, mesmo sob as condições de estresse do ambiente de abate, por meio da produção de biofilme. Esta informação serve de alerta para a indústria avícola no incentivo de elaboração de medidas de controle mais rigorosas.

A avaliação da biomassa formada nas diferentes temperaturas mostrou que as temperaturas de 25°C e 36°C favorecem de forma igual a formação dos biofilmes de *S. Minnesota*, quando comparamos com a temperatura de 4°C (Fig.1).

O mesmo comportamento identificado nas temperaturas de 25°C e 36°C contraria alguns achados na literatura, que afirmaram que temperaturas inferiores à temperatura ótima de crescimento e próximas à temperatura ambiente intensificam a produção de biomassa nos biofilmes de *Salmonella* (STEPANOVIĆ et al., 2003; PIRAS et al., 2015). Já Cabarkapa et al. (2015) indicam que os fatores envolvidos na produção de biofilme têm respostas diferentes dependendo da estirpe bacteriana e de acordo com a temperatura de incubação.

A Fig.2 ilustra três exemplos de cepas de *S. Minnesota* que apresentaram comportamentos distintos e, portanto, diferentes perfis de IFB. As diferenças significativas ($p < 0,05$) dentro do mesmo sorotipo indicam que provavelmente, há influência de características intrínsecas como a presença de fímbrias, flagelos, proteínas de membrana e outras (AGARWAL, et al., 2011), que poderiam ser mais importantes que as condições ambientais para a produção de biofilme por *S. Minnesota*.

Agentes químicos reduzem o biofilme de *S. Minnesota*

Nas indústrias avícolas onde as cepas foram isoladas, os agentes químicos ácido peracético 0,8%, hipoclorito de sódio 1% e clorexidina 1% são utilizados pela equipe de controle de qualidade. Estes biocidas promoveram redução nas contagens dos biofilmes de *S. Minnesota* após exposição por 15 minutos, sendo significativa somente para o ácido peracético e a clorexidina. Para ambos os agentes observou-se que, além de reduzir as contagens, em 8/20 (40,0%) cepas não foi constatado crescimento após o tratamento.

A Fig.3 mostra os resultados quantitativos obtidos nos biofilmes não tratados, que obtiveram um valor médio de $6,87 \pm 0,38 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$ ($p > 0,05$), e dos biofilmes tratados com os diferentes produtos que apresentaram crescimento após os 15 minutos de contato.

Todas as cepas (20/20 – 100,0%) apresentaram resistência ao hipoclorito de sódio 1%, de maneira que a contagem média ($6,57 \pm 0,55 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$) não diferiu daquela obtida no grupo controle ($p > 0,05$). Esse dado é alarmante uma vez que o hipoclorito de sódio é um dos agentes mais utilizados na indústria.

O uso de ácido peracético e clorexidina demonstrou a mesma eficiência na redução significativa das contagens, para as cepas resistentes. A quantificação média foi equivalente a $3,63 \pm 2,84$ e $2,96 \pm 2,55 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$, respectivamente. Isso indicou uma diminuição média de 3,24 e 3,91 ciclos de log, respectivamente, comparado com o grupo controle. Para ambos os agentes, a redução no número de UFC variou significativamente ($p < 0,001$) entre as cepas tolerantes, indicando que a persistência na presença desses agentes é uma característica cepa-dependente.

A existência de cepas (12/20 – 60%) com perfil de resistência a todos os agentes (perfil IV) (Quadro 4) mostra que provavelmente existem mecanismos adaptativos intrínsecos ou extrínsecos que permitem sua sobrevivência. Isso pode caracterizar um problema na indústria pela dificuldade de eliminar esses micro-organismos e pelo risco de disseminação dessa característica para outras estirpes.

A presença de cepas tolerantes aos diferentes sanitizantes sugere que o uso desses agentes na rotina do ambiente industrial de forma inadequada pode resultar na exposição subletal a estes biocidas, representando um risco real para a adaptação destas bactérias, além de influenciar positivamente na produção de biofilmes (KEERATIPBUL, Techaruwichit, 2012).

Quanto à elevada resistência observada ao hipoclorito de sódio é possível associar também o envolvimento de fatores moleculares, como os genes *RpoS* e *Dps* ligados ao estresse oxidativo. Estes são ativamente expressos em *S. Enteritidis* SE86 resistente à presença de hipoclorito de sódio a 200ppm (RITTER et al., 2012). É possível que para *S. Minnesota* haja mecanismos semelhantes atuando nesse processo.

Embora o uso de compostos químicos forneça benefícios na desinfecção, eles possuem a limitação de não destruir as estruturas residuais da matriz do biofilme que podem facilitar o seu ressurgimento ou manutenção dessas estruturas (OHSUMI et al., 2015). Assim, são necessários esforços especiais para a remoção completa de biofilmes de *S. Minnesota* adaptados aos biocidas. Provavelmente, a efetividade no controle seja possível pela associação de planos de higienização que incluem medidas de limpeza que colaboram para a eliminação da matriz extrapolimérica com a utilização de diferentes agentes aliados ao respeito aos períodos entre higienizações, além de estratégias como o rodízio periódico de sanitizantes.

CONCLUSÃO

Nossa abordagem permitiu constatar que a capacidade de *S. Minnesota* para desenvolver biofilme em diferentes temperaturas é altamente variável e dependente da estirpe bacteriana. De forma geral, as temperaturas de 25°C e 36°C permitiram a formação de biofilmes com a mesma intensidade e superior ao encontrado na temperatura de 4°C. Ao considerar o IFB, a manutenção do ambiente de processamento de carnes em temperaturas de 4°C inibe a formação de biofilmes por *S. Minnesota*, porém há formação de uma biomassa mínima que pode ser suficiente para a contaminação do produto final. A existência de cepas tolerantes aos biocidas testados faz sugerir uma possível expressão exacerbada de genes relacionados ao estresse oxidativo e/ou a existência de exposição a concentrações subletais no ambiente de produção avícola, representando um risco real para o desenvolvimento de mecanismos de adaptação, principalmente para a resistência ao hipoclorito de sódio. A inclusão de medidas de mais rigorosas para impedir a instalação e para garantir a remoção de biofilmes de *S. Minnesota*, aliado a protocolos de monitoramento deve ser uma estratégia na indústria avícola para garantir a inocuidade do produto final.

Agradecimento - À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Ao CNPq e FAPEMIG

Declaração de conflito de interesses - Os autores não têm interesses conflitantes.

REFERENCIAS

Agarwal R.K., Singh S., Bhilegaonkar K.N., Singh V.P. 2011. Optimization of microtitre plate assay for the testing of biofilm formation ability in different *Salmonella* serotypes. **Int. Food Res. J.** v. 18, p. 1493-1498.

Ariaifar M.N, Buzrul S., Akçelik N. 2016. Modeling and predicting the biofilm formation of *Salmonella* Virchow with respect to temperature and pH. **Acta Biol Hung.** V. 67, n. 99, p.111. doi:10.1556/018.67.2016.1.8

Borges K.A., et al. 2018. Biofilm formation capacity of *Salmonella* serotypes at different temperature conditions. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 38(1), 71–76. doi:10.1590/1678-5150-pvb-4928

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. Instrução Normativa Nº 70, de 06 de outubro de 2003. Institui o Programa de Redução de Patógenos - Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp. em carcaças de Frangos e Perus. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 out. 2003. Seção 1, p.9.

Cabarkapa I., Skrinjar M., Levic J., Kokic B., Blagojev N., Milanov D., Suvajdzic L. 2015. Biofilm forming ability of *Salmonella* Enteritidis in vitro. **Acta Vet., Beogr.** V. 65, p. 371-389. <https://doi.org/10.1515/acve-2015-0031>

Campos J., Mourão J., Silveira L., Saraiva M., Correia C.B., Maças A.P., Peixe L., Antunes P. 2018. Imported poultry meat as a source of extended-spectrum cephalosporin-resistant CMY-2 producing *Salmonella* Heidelberg and *Salmonella* Minnesota in the European Union, 2014–2015. **International Journal of Antimicrobial Agents.** V. 51, P.151–154. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.09.006>

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. 2017. Marder, E.P., Cieslak, P.R. e Cronquist, A.B. Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food and the Effect of Increasing Use of Culture-Independent Diagnostic Tests on Surveillance — Foodborne Diseases Active Surveillance Network. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep.** V. 66, P.397–403. doi: <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6615a1>

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

Corcoran M., Morris D., De Lappe N., O'connor J., Lalor P., Dockery P., et al. 2013. Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella* enterica biofilms from food contact surface materials. **Applied and Environmental Microbiology.** 80(4), 1507e1514. <http://doi.org/10.1128/AEM.03109-13>

Costa R.G., Festivo M.L., Araujo M.S., Reis E.M., Lázaro N.S., Rodrigues D.P. Antimicrobial susceptibility and serovars of *Salmonella* circulating in commercial poultry carcasses and poultry products in Brazil. **Journal of Food Protection.** V. 76. P. 2011-7, 2013. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-164>

Dhak J.A.L., et al. 2019. Effect of Chlorine-Induced Sublethal Oxidative Stress on the Biofilm-Forming Ability of *Salmonella* at Different Temperatures, Nutrient Conditions, and Substrates. **Journal of Food Protection.** V. 82, N. 1, p. 78-92. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-119>

EFSA - European Food Safety Authority e European Centre for Disease Prevention and Control, 2017. The European Union Summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. **EFSA Journal.** V.15, N.12, P.50-77, 2017. doi: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5077>

Freitas J. 2011. Evolução de sorovares Modelo de Banco de Cepas. Anais do Seminário Internacional de Salmonelose Aviária. Rio de Janeiro, RJ. (Resumo).

Jawad A.A, AL-Charrakh A.H. 2016. Outer Membrane Protein C (ompC) Gene as the Target for Diagnosis of *Salmonella* Species Isolated from Human and Animal Sources. **Avicenna J Med Biotechnol.** 2016;8(1):42-45.

Keeratipibul S., Techaruwichit P. 2012. Tracking sources of *Listeria* contamination in a cooked chicken meat factory by PCR-RAPD-based DNA fingerprinting. **Food Control.** V. 27, p. 64–72. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.02.026>

Kudirkiene E, Cohn M.T, Stabler R.A, Strong P.C.R, Serniene L, Wren B.W, Nielsen E.M, Malakauskas M e Brondsted L. 2012. Phenotypic and genotypic characterizations of *Campylobacter jejuni* isolated from the broiler meat production process. **Curr. Microbiol.** 65:398–406. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0170-z>

Lu, X., Samuelson, D. R., Rasco, B. A., Konkell, M. E. 2012. Elucidation of the antimicrobial effect of diallyl sulfide on *Campylobacter jejuni* biofilms. **J. Antimicrob. Chemother.** 67, 1915–1926. doi: 10.1093/jac/dks138

Machado S.C.A., Pereira V.L.A., Aquino M.H.C., Santos A.F.M, Rodrigues D.P., Giombelli, A, Nascimento, E.R. 2017. Serotyping and Genotyping of *Salmonella* Strains Isolated from Broilers, Chicken Carcasses Before and After Chilling, and Frozen Chicken Breasts Produced in the States of Mato Grosso do Sul and Santa Catarina, Brazil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola.** **Revista Brasileira de Ciência Avícola.** 19:135-142. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/1806-9061-2016-0371>.

Melo, R.T.; Ribeiro, A.; Mendonça, E.P.; Nalevaiko, P.C.; Monteiro, G.P.; Buiatte, A.B.G.; Rossi, D.A. 2019. *Salmonella* Minnesota poultry origin have virulence factors and potential risk to human. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** (prelo).

Mørreth T, Vestby LK, Nesse LL, Storheim SE, Kotlarz K, Langsrud S. 2009. Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. **J. Appl. Microbiol.** ,106 (3):1005–1012. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.04067.x.

- Naves P., Del Prado G., Huelves L., Gracia M., Ruiz V., Blanco, J. 2008. Measurement of biofilm formation by clinical isolates of *Escherichia coli* is method-dependent. **J. Appl. Microbiol.** 105, 585–590. doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03791.x
- Ohsumi T., Takenaka S., Wakamatsu, R., Sakaue Y., Narisawa N., Senpuku H., Okiji T. 2015. Residual structure of *Streptococcus mutans* biofilm following complete disinfection favors secondary bacterial adhesion and biofilm re-development. **PLOS ONE.** V.10, e0116647. doi:http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0116647
- Piras F., Fois F., Consolati S.G., Mazza R., Mazzette R. 2015. Influence of temperature, source, and serotype on biofilm formation of *Salmonella enterica* isolates from pig slaughterhouses. **J. Food Prot.** V. 8, p. 1875-1878. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-085>
- Ritter A.C. et al. 2012. Investigation of *rpoS* and *dps* genes in sodium hypochlorite resistance of *Salmonella* Enteritidis SE86 isolated from foodborne illness outbreaks in southern Brazil. **J Food Prot.** V. 75, n.3, p.437-42. doi: 10.4315 / 0362-028x.jfp-11-286
- Silva, P. L.A.P.A., Goulart, L.R., Reis, T.F.M., Mendonça,E.P., Melo R.T. 2018. Biofilm Formation in Different Salmonella Serotypes Isolated from Poultry. **Current Microbiology.** doi:10.1007/s00284-018-1599-5
- Stepanović S., Ćirković I., MIJAČ V., Švabić-Vlahović M. 2003. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. **Food Microbiol.** V.20, n.339- 343. [https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(02\)00123-5](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(02)00123-5)
- Steenackers H., Hermans K., Vanderleyden J., De Keersmaecker S.C.J. 2012. *Salmonella biofilms*: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. **Food Research International.** V. 45, n.2, p.502-531. doi:10.1016/j.foodres.2011.01.038
- 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.** V. 94, p. 433-44. doi: 10.3382/ps/peu081
- Ziech R.E., Perin A.P., Lampugnani C., Sereno M.J., Viana C., Soares V.M., Bersot L. 2016. Biofilm-producing ability and tolerance to industrial sanitizers in *Salmonella* spp. isolated from Brazilian poultry processing plants. **LWT - Food Science and Technology,** 68, 85–90. doi:10.1016/j.lwt.2015.12.021

Os Quadros

Quadro 1. Classificação do índice de formação de biofilme (IFB)

FORTE	MÉDIO	FRACO	INEXISTENTE
≥1,10	0,70-1,10	0,36-0,69	≤0,35

Fonte: Naves, et al. (2008)

Quadro 02: Classificação das cepas de S. Minnesota, de acordo com o Índice de Formação de Biofilmes (IFB) em diferentes temperaturas.

Cepas	4°C		25°C		36°C	
	Média (IFB)	Classificação	Média (IFB)	Classificação	Média (IFB)	Classificação
M01	0,159*	Inexistente	0,284*	Inexistente	0,916*	Médio
M02	0,144*	Inexistente	0,226*	Inexistente	0,217*	Inexistente
M03	0,056	Inexistente	0,175*	Inexistente	0,269*	Inexistente
M04	0,066	Inexistente	0,891*	Médio	0,539*	Fraco
M05	0,079*	Inexistente	0,493*	Fraco	0,438*	Fraco
M06	0,162*	Inexistente	0,471*	Fraco	0,431*	Fraco
M07	0,118*	Inexistente	0,550*	Fraco	0,866*	Médio
M08	0,074*	Inexistente	0,870*	Médio	0,612*	Fraco
M09	0,179*	Inexistente	0,928*	Médio	0,547*	Fraco
M10	0,039	Inexistente	0,229*	Inexistente	0,537*	Fraco
M11	0,037	Inexistente	0,039	Inexistente	0,136*	Inexistente
M12	0,067	Inexistente	0,517*	Fraco	0,421*	Fraco
M13	0,025	Inexistente	0,284*	Inexistente	0,095*	Inexistente
M14	0,059	Inexistente	0,179*	Inexistente	0,105*	Inexistente
M15	0,088*	Inexistente	0,576*	Fraco	0,644*	Fraco
M16	0,039	Inexistente	0,179*	Inexistente	0,215*	Inexistente
M17	0,056	Inexistente	0,219*	Inexistente	0,206*	Inexistente
M18	0,077*	Inexistente	0,173*	Inexistente	0,196*	Inexistente
M19	0,054	Inexistente	0,462*	Fraco	0,875*	Médio
M20	0,030	Inexistente	0,196*	Inexistente	0,118*	Inexistente

* Valores de densidade óptica distintos significativamente do controle negativo usando *Teste de Fisher* ($p < 0,05$).

Quadro 3: Perfil da formação de biofilme em diferentes temperaturas por 20 cepas de S. Minnesota, de acordo com o IFB

IFB de acordo com a temperatura			Perfil	N (%)
4°C	25°C	36°C		
Inexistente	Inexistente	Inexistente	A	9 (45,0)
Inexistente	Inexistente	Fraco	B	1 (5,0)
Inexistente	Inexistente	Médio	C	1 (5,0)
Inexistente	Fraco	Fraco	D	4 (20,0)
Inexistente	Fraco	Médio	E	2 (10,0)
Inexistente	Médio	Fraco	F	3 (15,0)

N (%): número de cepas e a respectiva percentagem.

Quadro 4: Perfis de resistência aos agentes químicos testados em 20 biofilmes de S. Minnesota

Agentes químicos		Perfil	N (%)
Hipoclorito		I	3 (15,0)
Hipoclorito	Ác. peracético	II	3 (15,0)
Hipoclorito	Clorexidina	III	2 (10,0)
Hipoclorito	Clorexidina Ác. peracético	IV	12 (60,0)

N (%): número de cepas e a respectiva percentagem.

Legendas das Figuras

Fig.1: Comportamento da biomassa de 20 cepas S. Minnesota em diferentes temperaturas.

Fig.2: Variação da biomassa de biofilmes de três cepas de S. Minnesota de acordo com o perfil do IFB.

Fig.3: Contagens de biofilmes de S. Minnesota ($\text{Log de UFC.mL}^{-1}$) antes e após manutenção por 15 minutos em solução de ácido peracético 0,8%, hipoclorito de sódio 1% e clorexidina 1%.

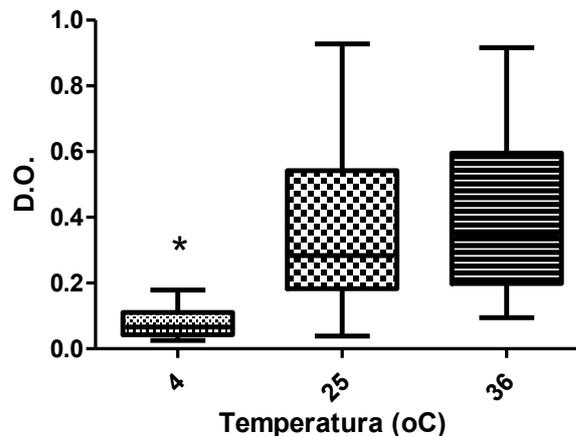


Figura 1

D.O.: Densidade óptica a 600nm. Barras de erros indicam o desvio padrão para as médias dos valores de DO obtidos para cada cepa; * $p < 0,001$ na análise comparativa entre os tratamentos, usando *one way Anova*.

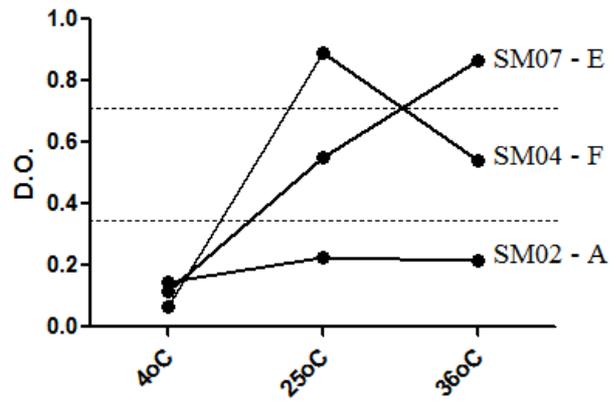


Figura 2

D.O.: Densidade óptica a 600nm. SM02, 04 e 07: identificação das cepas de *Salmonella* Minnesota. A, E e F: Perfis de IFB (Quadro 2). --: Separação entre os IFBs inexistente (<0,35), fraco (0,35-0,69) e médio (0,70-1,10).

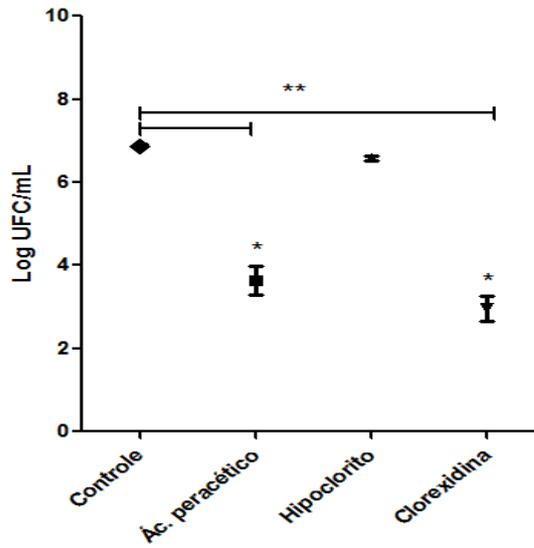


Figura 3

* $p < 0,001$ para as contagens nas amostras do mesmo tratamento; ** $p < 0,001$ na análise comparativa entre controle e tratamentos, usando *Kruskal-Wallis*.