

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

FABIANA OLIVEIRA NOTÁRIO

**EFEITO DO BIOFILME DE BACTÉRIAS LÁTICAS E *Bacillus* spp. NO
CRESCIMENTO DE *Campylobacter jejuni* E *Salmonella* Heidelberg**

UBERLÂNDIA – MG

DEZEMBRO/2019

FABIANA OLIVEIRA NOTÁRIO

**EFEITO DO BIOFILME DE BACTÉRIAS LÁTICAS E *Bacillus* spp. NO
CRESCIMENTO DE *Campylobacter jejuni* E *Salmonella* Heidelberg**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Medicina
Veterinária, da Universidade Federal de
Uberlândia, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Médica Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Belchiolina Beatriz
Fonseca.

UBERLÂNDIA - MG

DEZEMBRO/2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Faculdade de Medicina Veterinária
Rodovia BR 050, Km 78, Bloco 1CCG, Sala 211A - Bairro Glória, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: (34) 2512-6802 - www.famev.ufu.br - famev@ufu.br



ATA

ATA DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO II

Aos 06 dias do mês de dezembro do ano de 2019, às 14 horas, sob a presidência da Orientadora Profa. Dra. Belchiolina Beatriz Fonseca, reuniu-se a Banca Examinadora da Defesa de Trabalho de Conclusão de Curso 2 da acadêmica **FABIANA OLIVEIRA NOTÁRIO**, matrícula **11211MEV010** do Curso de Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, assim constituída por: Orientador(a): Profa. Dra. Belchiolina Beatriz Fonseca, Membro da Banca: Dra. Flávia Alves Martins e Membro da Banca: Profa. Dra. Kênia de Fátima Carrijo. Iniciados os trabalhos, o(a) acadêmico(a) submeteu-se à defesa de monografia.

Título: Efeito do biofilme de bactérias lácticas e *Bacillus spp.* no crescimento de *Campylobacter jejuni* e *Salmonella Heidelberg*

Terminada a defesa, procedeu-se ao julgamento, cujo resultado foi o seguinte:

- 1 . Profa. Dra. Belchiolina Beatriz Fonseca. Nota: 95,0 (noventa e cinco pontos)
- 2 . Dra. Flávia Alves Martins. Nota: 95,0 (noventa e cinco pontos)
- 3 . Profa. Dra. Kênia de Fátima Carrijo. Nota: 95,0 (noventa e cinco pontos)

Apuradas as notas, verificou-se que a acadêmica foi (X) Aprovado () Reprovado com a média geral de 95,0 (noventa e cinco pontos), desde que efetue as correções indicadas pela Banca Examinadora, no prazo previsto pela Coordenação do Curso de Graduação em Medicina veterinária. Para constar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora e pela Coordenadora do Curso de Graduação em Medicina Veterinária.

Uberlândia-MG, 06 de dezembro de 2019.



Documento assinado eletronicamente por **Belchiolina Beatriz Fonseca, Professor(a) do Magistério Superior**, em 06/12/2019, às 15:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flávia Alves Martins, Técnico(a) de Laboratório**, em 06/12/2019, às 15:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Kenia de Fatima Carrijo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 10/12/2019, às 15:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1711808** e o código CRC **D92DE195**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo apoio incondicional;

À minha irmã por estar presente nos momentos em que nossos pais não puderam estar;

Aos meus amigos, que me acompanharam durante toda a jornada da graduação, compartilhando os momentos de alegria e me ajudando a superar os obstáculos;

À minha orientadora, que me acolheu quando mais precisei.

A todas as pessoas que de alguma forma me auxiliaram, ainda que brevemente, e colaboraram para que eu chegasse até aqui, meus mais sinceros agradecimentos.

RESUMO

A contaminação com microrganismos patogênicos é um dos maiores problemas enfrentados na produção de aves e indústria de alimentos no mundo todo, sendo as bactérias dos gêneros *Salmonella* e *Campylobacter* as maiores responsáveis por casos de doenças transmitidas por alimentos em diversos países; e ambas têm a carne de frango como principal fonte de transmissão. Devido à intensa resistência que microrganismos patogênicos têm desenvolvido em relação aos antibióticos e desinfetantes disponíveis no mercado, várias alternativas estão sendo pesquisadas. Uma delas é o uso de bactérias lácticas e *Bacillus* spp. (BLB) na prevenção e controle do crescimento dessas bactérias patogênicas. O objetivo deste trabalho foi, portanto, avaliar a eficácia do biofilme de BLB na prevenção e controle do crescimento de *Campylobacter jejuni* e *Salmonella* Heidelberg (SH). Para fazer essa avaliação, foi inoculado BLB em placa de poliestireno e após 24 horas, o patógeno foi introduzido. Após 24 e 48 horas, uma contagem foi feita e as espécies, confirmadas por PCR. Duas cepas de *C. jejuni* foram avaliadas com menor quantidade de inóculo inicial e com dois tempos a mais (72 e 96 horas). Os resultados mostraram que BLB foi eficaz no controle do crescimento de SH já após 24 horas de inoculação do patógeno, porém, no caso de *C. jejuni*, o controle do crescimento foi observado apenas nas duas cepas em que o inóculo inicial menor foi utilizado. Conclui-se, portanto, que, para *C. jejuni*, o controle parece ser dependente da quantidade de inóculo inicial e da cepa envolvida.

Palavras-chave: avicultura, alternativas, carne de frango, indústria de alimentos.

ABSTRACT

Contamination by pathogenic microorganisms is one of the biggest problems faced by the food industry and farms around the world; *Campylobacter* and *Salmonella* being the two main genera responsible for diseases caused by food poisoning, especially chicken meat. Due to the great resistance found in such microorganisms to antibiotics and disinfectants available in the market, many alternatives are being researched, such as the use of lactic acid bacteria and *Bacillus spp.* (BLB) to prevent and control the pathogenic bacteria growth. Thus, the objective of this project was to evaluate the efficacy of BLB biofilm in preventing and controlling the growth of *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* Heidelberg. In order to do the evaluation, BLB was inoculated in a polystyrene plate and after 24 hours the pathogen was inserted. After 24 and 48 hours, the bacteria were counted and the species confirmed by PCR. Two strains of *C. jejuni* were evaluated using a lower amount of initial inoculum and with two extra times (72 and 96 hours). The results showed that BLB were able to control the growth of SH already at 24 hours of inoculation; however, in regards to *C. jejuni*, the control was observed only on the two strains where a lower amount of initial inoculum was used. Thus, it is concluded that its control seems to depend on the amount of the initial inoculum and the strain involved.

Key words: aviculture, alternatives, chicken meat, food industry

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	8
2.1 Avicultura no Brasil.....	8
2.2 <i>Campylobacter</i>.....	9
2.3 <i>Salmonella</i>.....	10
2.4 Uso de antibióticos e desinfetantes na produção avícola.....	11
2.5 Biofilme na indústria de aves	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
5. CONCLUSÃO.....	17
6. REFERÊNCIAS	18

1. INTRODUÇÃO

Um dos maiores problemas enfrentados na avicultura é a contaminação por microrganismos patogênicos, que levam à contaminação das aves nas granjas e, conseqüentemente, das carcaças nos abatedouros frigoríficos. Dentre os microrganismos mais importantes e, portanto, de maior preocupação, estão bactérias dos gêneros *Campylobacter* e *Salmonella*. Esses são importantes agentes patogênicos veiculados em alimentos, principalmente na carne de frango (ALTEKRUSE, 1999).

Como maior exportador e segundo maior produtor de carne de frango no mundo (ABPA, 2018), o Brasil deve ter especial cuidado com a sanidade em toda a cadeia de produção, visto que perdas indiretas podem ocorrer devido às restrições impostas por países importadores desse produto e ainda considerar a segurança dos consumidores dentro do próprio país, a fim de minimizar gastos com saúde pública devido aos inúmeros casos de intoxicação alimentar provenientes do consumo dessa carne (SHINOHARA et al., 2008).

Mundialmente, a salmonelose é uma das zoonoses de maior preocupação para a saúde pública, possui alta morbidade e é de difícil controle. Dos sorotipos desse gênero, a maioria é patogênica ao homem, causando diferentes sintomas devido à variação na patogenicidade e na resposta imune do hospedeiro. Portanto, é de grande interesse manter essa doença sob controle e trabalhar em políticas preventivas, já que sua endemicidade causa grande impacto na economia dos países afetados, tanto em gasto com saúde pública quanto nas perdas durante a produção dos produtos cárneos responsáveis pela transmissão do patógeno (LOURENÇO, REIS & VALLS, 2004; GUERIN, VOLD & AAVITSLAND, 2005).

Assim como no caso da salmonelose, a carne de frango é a principal fonte de transmissão da campilobacteriose. O controle de *Campylobacter* é essencial na indústria alimentícia, para evitar a contaminação dos alimentos produzidos, e na granja, para evitar contaminação dos animais. Durante o processo de produção, práticas sanitárias devem ser implementadas para prevenir contaminação cruzada e cuidado adequado deve ser providenciado para desinfetar instalações e ferramentas (MELO et al., 2013).

Baseado no exposto, novas formas de prevenção e controle estão sendo pesquisadas, já que muitos antibióticos presentes no mercado, bem como desinfetantes, já não são mais eficazes contra esses microrganismos devido à sua grande habilidade de adaptação a diversos obstáculos impostos pelo meio (MENDONÇA, FONSECA & MONTEIRO, 2016).

Uma alternativa para a prevenção da contaminação de granjas de frango por *Salmonella* e *Campylobacter* é o uso de bactérias lácticas e *Bacillus* spp. (BLB), que são inofensivas a animais e humanos e atuam no controle da multiplicação de bactérias patogênicas (GUERRIERI et al., 2009; SPERANZA, SINIGAGLIA & CORBO, 2009).

O objetivo desse trabalho, portanto, foi avaliar a eficácia do biofilme de BLB na prevenção da multiplicação de *Campylobacter jejuni* e *Salmonella* Heidelberg (SH).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Avicultura no Brasil

A avicultura se tornou uma importante atividade econômica no Brasil há muitos anos, sendo aperfeiçoada com a chegada de imigrantes e ganhando impulso durante a Segunda Guerra Mundial, quando houve considerável aumento do consumo da carne de frango internamente (COSTA, 2011).

Após o período de guerra, o Brasil passou por uma forte crise cambial e lutava para expandir sua economia para que seus produtos chegassem ao mercado internacional. O governo, então, criou uma instituição profissional para fazer a gestão do comércio exterior, a Carteira de Comércio Exterior do Banco do Brasil (Cacex). Essa instituição controlava a importação e promovia a exportação, tornando-se um agente importante no estímulo do pensamento exportador (COSTA, 2011).

Já no fim da década de 50, vários avicultores, que até então se dedicavam apenas à produção de ovos para consumo, começaram a mudar de orientação. Nessa época, o frango já atingia o máximo de peso comercial em menor tempo e com o mínimo de alimentação (ESPÍNDOLA, 2012; SANTOS, 2014). A avicultura, no entanto, se estabeleceu realmente como atividade comercial apenas na década de 60, quando surgiu o sistema de produção integrado, que criou uma parceria entre a indústria e os produtores (COSTA, 2011).

Atualmente, a carne de frango brasileira já está presente em mais de 150 países e, em várias regiões brasileiras, representa a principal atividade econômica. Segundo dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), em 2011, esse setor movimentava, em média, 1,5 % do PIB nacional e, até aquele ano, era responsável por 3,6 milhões de empregos diretos e indiretos.

Em 2017, o Brasil produziu mais de 13 milhões de toneladas de carne de frango, em que quase 67% foram voltados para o mercado interno e 33% para exportações. O consumo *percapita* foi de aproximadamente 42 kg/hab. Nesse mesmo ano, as exportações da carne de frango geraram mais de 7 bilhões de dólares em receita (ABPA, 2018). Só em janeiro deste ano, a produção de frango foi a segunda atividade pecuária com maior valor bruto de produção, com mais de 59 milhões de reais arrecadados, de acordo com o MAPA (2019).

Uma pesquisa realizada pelo Centro de Assessoria e Pesquisa de Mercado (CEAP) com famílias de todo o país mostrou que em 100% dos lares entrevistados, há consumo de carne de frango, sendo que a maioria a consome de 2 a 3 vezes por semana (COSTA, 2011). Embora este não tenha sido o principal motivo apontado pelas famílias para justificar o grande consumo da carne de frango, esse alimento, juntamente com ovos, ambos produtos da avicultura, são as fontes de proteína animal mais baratas presentes no mercado (RECK & SCHULTZ, 2016).

Todos os dados apontam para a grande importância socioeconômica representada pelas atividades do setor avícola para a população brasileira, principalmente. Assim sendo, pode-se perceber o quão imprescindível são os cuidados com a sanidade durante a cadeia de produção (TALAMINI et al., 2018).

À medida que a produção avícola foi crescendo e as exportações expandindo, foi necessário melhorar as práticas de manejo para adequá-las às normas de biossegurança. Um conjunto de procedimentos foi colocado em ação para prevenir e controlar a contaminação dos rebanhos avícolas por agentes infecciosos que impactam tanto a produtividade quanto a saúde de quem consome os produtos posteriormente (ESPÍNDOLA, 2012).

2.2 Campylobacter

Dentro do gênero *Campylobacter* há diversas espécies que causam doença em humanos e animais domésticos, mas as principais são *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* em se tratando de importância para saúde pública, pois são responsáveis pela maior parte dos casos confirmados de campilobacteriose em humanos (GILLISS et al., 2013). Além de quadros de gastroenterite, *C. jejuni* também é associada a neuropatias como as Síndromes de Guillain-Barré e Miller-Fisher (SALLOWAY et al., 1996; NACHAMKIN et al., 1998), onde ocorre uma mimetização entre os lipooligosacarídeos da bactéria e gangliosídeos humanos, levando a uma resposta autoimune no organismo do hospedeiro (NACHAMKIN et al., 1998; YUKI, 1997).

A incidência de campilobacteriose varia de país para país (ANÔNIMO, 2014). O número de casos reportados representa apenas aqueles que foram confirmados e, portanto, ainda há anualmente inúmeros casos não reportados. Os alimentos mais implicados nesses casos são carnes, principalmente de frango (OYARZABAL & FERNANDÉZ, 2016).

Em frangos, principalmente de corte, a colonização ocorre predominantemente por *Campylobacter jejuni* (HOEPERS et al., 2016). Essas aves são naturalmente infectadas por via fecal-oral. Esse microrganismo coloniza principalmente o ceco e cólon e, em menor extensão, intestino delgado. Há relatos de isolamento de *Campylobacter* em fígado, baço e sangue, sugerindo uma possível invasão do epitélio intestinal e, assim, a colonização se torna sistêmica (KNUDSEN et al., 2006).

Embora *Campylobacter* tenha sido considerada um componente inofensivo da microbiota intestinal de galinhas, relatos sugerem que ela é capaz de induzir dano ao epitélio intestinal através do comprometimento das *tight-junctions* intracelulares, controlando as funções de barreira, e estimulando uma resposta inflamatória insatisfatória por parte do hospedeiro (REES et al., 2008; AWAD et al., 2015; HUMPHREY et al., 2014).

Apesar de *C. jejuni* ser extremamente difundida, ela não se multiplica em ambiente natural aeróbico devido à sua característica de crescimento microaerófilo. Ainda que nem todo ambiente natural onde ela habite seja necessariamente aeróbico, é difícil explicar a alta incidência de infecção, particularmente pelo fato de que, quando comparada com vários outros patógenos gastrointestinais, *C. jejuni* raramente é transmitida entre humanos. (MAN, 2011).

2.3 Salmonella

Salmonella spp. é um dos patógenos transmitidos por alimentos mais importantes no mundo (NGUYEN, YANG & YUK, 2014). Apesar de doenças causadas pela ingestão de alimentos contaminados não serem reportadas em sua totalidade no Brasil, dados do Ministério da Saúde (2014) indicam que, nos últimos anos, *Salmonella* spp. foi o principal agente encontrado em surtos de doenças transmitidas por alimentos.

Bactérias desse gênero estão entre os patógenos de maior destaque na avicultura, já que a carne de frango é a maior fonte, através da qual, humanos adquirem salmonelose, e por isso vêm sendo amplamente estudadas dentro da cadeia de produção. As aves acometidas podem desenvolver doença clínica ou ficarem assintomáticas, nesse caso servindo como reservatório

e se tornando uma fonte em potencial de transmissão para humanos (SILVA & DUARTE, 2002).

Superfícies contaminadas com *Salmonella* podem servir como fontes de contaminação para alimentos através de contaminação cruzada. Sua sobrevivência em tais superfícies pode ser explicada pela produção de biofilme, assim como a permanência em ambientes onde há processamento de alimentos, que são contaminados durante o processamento da carne de aves que possuíam o patógeno previamente (CORCORAN et al., 2013; SIMÕES, SIMÕES & VIEIRA, 2010; VESTBY et al., 2009).

Uma alternativa para o controle de *Salmonella* é combater sua contaminação/infecção antes do abate. Fazer um trabalho preventivo, evitando que as aves se infectem e as granjas e instalações de processamento da carne se contaminem com a bactéria em primeiro lugar, pode se tornar mais eficaz no controle da contaminação de alimentos posteriormente (FUNK et al., 2001). Por, claramente, não ser uma ação de fácil aplicabilidade, muitas pesquisas vêm sendo feitas no sentido de abordar o problema por esse ângulo (JALILSOOD et al., 2015; BARUZZI et al., 2011); por exemplo, através do uso das BLB, que é o foco deste trabalho.

2.4. Uso de antibióticos e desinfetantes na produção avícola

Dentro da pecuária, a indústria avícola foi a que mais conseguiu progresso em termos zootécnicos; conseguindo aumentar a produção em larga escala em pouquíssimo tempo com um baixo custo (COSTA, SILVA & MIRANDA, 2001). Para tal feito, além do desenvolvimento na área de melhoramento genético e nutrição, também foi necessário o uso de antibióticos como promotores de crescimento, adicionado ao seu uso terapêutico (COSTA, SILVA & MIRANDA, 2001; CORRÊA et al., 2003; BARROS, 2012).

Como consequência dessa prática, aumentou-se de forma considerável a resistência de diversas bactérias a esses agentes antibióticos; várias delas, inclusive, adquiriram multirresistência, ou seja, resistência a mais de um antibiótico simultaneamente (GARCIA-MIGURA et al., 2014). Houve uma enorme pressão seletiva resultante da quantidade de substâncias utilizadas, bem como da própria forma de administração, que consistia, em sua maioria, em doses subterapêuticas administradas por via oral e por tempo prolongado (HAWKEY, 2008).

As bactérias são selecionadas pelos seus genes de resistência já presentes ou através da aquisição de genes presentes no meio, elevando a situação a um nível mais preocupante. Essa resistência ocorre não apenas para as aves, mas também é possível que ocorra para as pessoas

que entram em contato com os produtos provenientes dos animais tratados com essas substâncias. Surge, então, uma situação de resistência cruzada: antibióticos usados para tratar infecções humanas podem perder sua eficácia (STANTON, 2013; CHANTZIARAS et al., 2014).

Outro meio de combater bactérias potencialmente patogênicas é a utilização de desinfetantes nos ambientes que entram em contato com os animais e/ou produtos provenientes dos mesmos. Esses são preparações químicas potencialmente capazes de combater microrganismos, principalmente os patogênicos, em pouco tempo de contato. No entanto, suas propriedades devem ser bem conhecidas para que se possa saber de forma precisa os métodos para sua aplicação em determinado ambiente (GREZZI, 2008; KUANA, 2009).

O desinfetante mais comumente utilizado na indústria de alimentos é o cloro e derivados, devido à sua ação germicida em amplo espectro, que atua sobre a membrana celular, causa danos no DNA, oxida proteínas celulares, e exerce outras formas de combate aos microrganismos (SHMIDT, 2003).

Assim como ocorre para os antibióticos, é possível que haja o surgimento de linhagens de microrganismos resistentes aos desinfetantes mais utilizados pela indústria alimentícia, podendo até mesmo se tratar de resistência cruzada. O processo de seleção das bactérias acontece da mesma forma, através do contato do microrganismo com quantidades insuficientes da substância para matar, servindo apenas para auxiliar na adaptação (LOPALCO et al., 2000; SHMIDT, 2003).

Todas as adaptações adquiridas por bactérias patogênicas através do uso de antibióticos e desinfetantes contribuem para os surtos de doenças originadas pela ingestão de alimento contaminado e causadas por microrganismos específicos (MACHADO et al., 2010), como bactérias do gênero *Campylobacter* e *Salmonella*. Pensando nisso, várias alternativas vêm sendo criadas para tentar burlar essas dificuldades.

2.4 Biofilme na indústria de aves

Biofilmes são comumente definidos como populações de bactérias encapsuladas em uma matriz, composta primariamente de polissacarídeos, e aderidas umas às outras e/ou a superfícies ou interfaces irreversivelmente, ou seja, não é desfeito com uma simples lavagem (COSTERTON et al., 1995; ÜNAL et al., 2011).

A adesão dos microrganismos, no entanto, pode depender das propriedades físico-químicas da superfície em questão; tendo mais chances de aderir a plásticos que a vidro ou metais, por exemplo. Isso ocorre, segundo Donlan & Costerton (2002), devido à hidrofobicidade tanto da superfície de adesão quanto das células, de forma que quanto mais hidrofóbico, mais aderido o biofilme estará.

Biofilmes têm sido de considerável interesse em se tratando de higiene alimentar. Eles são mais resistentes a antimicrobianos, temperatura, oxigênio, entre outros. Devido a essa maior resistência proporcionada pelo biofilme, aumenta-se o risco de contaminação por bactérias patogênicas em instalações de processamento de alimentos. Apesar disso, foi descoberto recentemente que alguns biofilmes possuem propriedades positivas e podem ser utilizados como agentes de biocontrole. Um exemplo é o uso de biofilme produzido por bactérias ácido-láticas e *Bacillus* spp. como agente protetor (ÜNAL et al., 2011).

Há, então, mais uma opção de controle de bactérias patogênicas proporcionada pelas bactérias ácido-láticas e *Bacillus* spp, apesar de o uso de seus metabólitos ser o método mais popular e mais estudado. Por isso, o biofilme pode ser uma alternativa a ser usada na indústria de alimentos e requer mais pesquisas (ÜNAL et al.,2011).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Três cepas de *Campylobacter jejuni* (IAL 2383 - isolada de humanos; F157; F88) e um sorovar de *Salmonella enterica* sub *enterica* sor. Heidelberg (SH) isoladas de carne de frango, e obtidas por grupos de pesquisa que as utilizaram anteriormente, foram utilizados para esse teste. A análise foi realizada em placa de poliestireno de 96 poços, sendo utilizada uma placa por bactéria.

Foi utilizado um coquetel de espécies de *Bacillus* e bactérias lácticas, doado pela própria empresa, contendo as espécies de *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pumilus* e *Pediococcus* spp. na concentração de 10,3 log UFC/g (Lalfilm Pro, Lallemand SAS, France).

Tanto para as cepas de *Salmonella* como de *Campylobacter* trabalhou-se separadamente com os seguintes grupos experimentais: (i) controle negativo, onde foi inoculado apenas BLB (ii) controles positivos, onde foi inoculada apenas a bactéria patogênica (iii) testes, onde ambos foram inoculados, BLB e bactéria patogênica. As análises foram realizadas em triplicata.

Cada poço da placa de poliestireno, com exceção dos controles positivos, foi inoculado com 9,3 log UFC/poço de BLB. Após 24 horas, inoculou-se 5,43 log UFC mL⁻¹ de *C. jejuni* IAL 2383; 5,49 log UFC mL⁻¹ de *C. jejuni* F88; 5,25 log UFC mL⁻¹ de *C. jejuni* F157; e 4,0 log UFC mL⁻¹ de SH, em suas respectivas placas, por poço, com exceção do controle negativo, diluído em 300 µL de caldo Mueller-Hinton. Após 24 e 48 horas de inoculação da bactéria, o material foi coletado com raspagem e submetido a diluições seriadas para contagem específica de *C. jejuni* e *Salmonella* Heidelberg. Contagem direta foi feita no ágar CCDA (Charcoal Cefoperozone Deoxycholate agar - Oxoid®) a 37°C em condição de microaerofilia por 48 horas e XLD (Xylose Lysine Deoxycholate agar - KASVI®) a 37°C por 24 horas, respectivamente. Uma avaliação por PCR convencional de cinco colônias de cada placa foi feita em seguida para confirmar as espécies, bem como coloração de Gram para *Campylobacter*.

Também foi pesquisada uma baixa quantidade de inóculo inicial a fim de avaliar diferentes cepas de *C. jejuni* e diferentes inóculos iniciais; duas cepas foram utilizadas (596 e 33454/1), também isoladas de galinhas e obtidas por grupos de pesquisa que as utilizaram anteriormente. Foi avaliada a ação de BLB 24, 48, 72 e 96 horas após o tratamento. Inoculou-se separadamente 3,0 log UFC/ml de *C. jejuni* 596 e 33454/1 diluídos em 200 µL por poço e assim o experimento seguiu de maneira similar à análise de *C. jejuni* IAL2383, F88 e F157 com o uso preventivo de BLB, porém sendo adicionados os tempos de 72 e 96 horas pós-tratamento.

A avaliação da PCR foi feita a partir da extração de DNA de cinco colônias típicas (acinzentadas, com brilho metálico para *C. jejuni* em CCDA e pretas para *Salmonella* spp. em XLD) de cada placa e, quando possível, de cinco colônias atípicas, usando reagentes, pares de *primer* e ciclos de amplificação, tempo e temperaturas padronizados pelo laboratório (uma etapa inicial a 94°C por 10 minutos, seguido por 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, 47°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto e uma etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos, com *primer* a 10 picomols). Para essa avaliação foram utilizados *primers* que amplificam o fragmento localizado no gene *ompC* (5'- ATCGCTGACTTATGCAATCG- 3' e 3'- CGGGTTGCGTTATAGGTCTG-5') para as supostas colônias de *Salmonella* e *primers* que amplificam o fragmento localizado no gene *flaA* (5'-ATGGGATTTTCGTATTAACAC-3'e3'- CTGTAGTAATCTTAAAACATTTTG-5') para as supostas colônias de *Campylobacter*. A PCR foi realizada utilizando-se GoTaq® Green Master Mix e a leitura das amostras amplificadas foi feita através da interpretação do gel de agarose.

Para análise estatística foi utilizado a análise da variância seguida pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para determinar diferenças entre as médias. Os testes foram feitos utilizando-se GraphPadPrism 704.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 mostra os resultados do uso de BLB na prevenção do crescimento de diferentes cepas de *C. jejuni* e *Salmonella* Heidelberg. *C. jejuni* multiplicou em relação ao inóculo inicial 24 e 48 horas pós-inoculação no grupo controle positivo e no grupo tratado. Não havendo diferença entre os grupos tratados e o controle positivo.

Houve multiplicação da SH no grupo controle positivo em relação ao inóculo. Entretanto, BLB foi capaz de conter a multiplicação da SH já que após 24 e 48 horas a quantidade da bactéria era igual ao inóculo inicial no grupo tratado e 2,69 e 3,73 log CFU menor que no controle positivo.

Tabela 1. Média de contagens de *C. jejuni* e SH com tratamento preventivo com BLB

	Inóculo inicial	CP 24 horas	CN 24 horas	Tratamento 24 horas	CP 48 horas	CN 48 horas	Tratamento 48 horas
<i>Campylobacter jejuni</i> IAL2383	5,43 ^a	8,3 ^b	0,00 ^c	7,65 ^b	8,00 ^b	0,00 ^c	7,93 ^b
<i>Campylobacter jejuni</i> F88	5,49 ^a	7,68 ^b	0,00 ^c	8,01 ^{bd}	9,27 ^d	0,00 ^c	8,64 ^d
<i>Campylobacter jejuni</i> F157	5,25 ^a	7,23 ^b	0,00 ^c	8,36 ^b	8,4 ^b	0,00 ^c	8,03 ^b
<i>Salmonella</i> Heidelberg	4,00 ^a	6,01 ^b	0,00 ^c	3,42 ^a	7,27 ^b	0,00 ^c	3,54 ^a

Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística. CP=controle positivo; CN=controle negativo;

Quando diminuída a quantidade do inóculo inicial e adicionados os tempos de 72 e 96 horas pós-tratamento, diferentes resultados foram observados entre as duas cepas de *C. jejuni* pesquisadas (tabela 2). Nos grupos controle positivos, a bactéria se multiplicou com o tempo em relação ao inóculo inicial. O tratamento preventivo com BLB diminuiu em 1,74 log UFC a cepa 596 de *C. jejuni* apenas 96 horas após a inoculação. Na cepa 33454/1, BLB foi capaz de diminuir a quantidade de *Campylobacter* em 1,39; 1,1 e 1,02 log CFU em 48, 72 e 96 horas após a inoculação, respectivamente.

Tabela 2. Crescimento de diferentes cepas de *Campylobacter jejuni* 24, 48, 72 e 96 horas pós-tratamento preventivo com BLB.

	Ii	CP	CN	T	CP	CN	T	CP	CN	T	CP	CN	T
		24h	24h	24h	48h	48h	48h	72h	72h	72h	96h	96h	96h
<i>C. jejuni</i>													
596	3.0 ^a	4.73 ^{bd}	0.00 ^c	4.6 ^{bd}	5.75 ^b	0.0 ^c	5.95 ^b	4.69 ^{bd}	0.0 ^c	4.9 ^{bd}	5.64 ^b	0.0 ^c	3.9 ^{ad}
<i>C. jejuni</i>3345													
4/1	3.0 ^a	4.51 ^{bde}	0.0 ^c	4.12 ^{be}	5.17 ^d	0.0 ^c	3.78 ^{ae}	4.83 ^{bd}	0.00 ^c	3.73 ^{ae}	4.28 ^{bd}	0.0 ^c	3.26 ^a

Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística ($P > 0,05$). CP = controle positivo; CN = controle negativo; T = tratamento; Ii = inóculo inicial

A eficácia de BLB para prevenir o crescimento de *C. jejuni* usando placa de poliestireno como modelo experimental parece ser dependente da quantidade inicial do inóculo e da cepa. Quando usada uma cepa isolada de humano e duas cepas isoladas de galinhas com inóculo inicial de aproximadamente 5 log CFU/poço, BLB não foi capaz de prevenir o crescimento de *C. jejuni*. No entanto, quando usado um inóculo inicial menor, de duas cepas isoladas de galinhas (aproximadamente 3 log CFU/poço), houve um decréscimo de *C. jejuni* de 48 para 96 horas em uma cepa (33454/1) e apenas 96 horas pós-tratamento na outra cepa (596). É importante mencionar que, embora a diminuição tenha sido pouca, foi usado um método com caldo Mueller-Hinton que favorece a formação de biofilme (JOSHUA et al., 2006). O comportamento de *C. jejuni* parece ser dependente da cepa em diferentes situações (MELO et al., 2016).

Já foi observado por Golden & Acheson (2002) que espécies de *Campylobacter* são capazes de autoaglutinação em caldo Mueller-Hinton, embora não tenha ficado claro se essa formação é um tipo de biofilme ou não. Considerando essa possibilidade como positiva, seria uma explicação plausível para a multiplicação observada nos dados da tabela 1, mostrando que essas cepas foram capazes de se proteger de forma muito eficaz.

Além disso, espécies de *Campylobacter* também são capazes de colonizar biofilmes preexistentes (HANNING, JARQUIN & SLAVIK, 2008; TRACHOO et al., 2002; KEEVIL, 2003), o que também poderia explicar a capacidade de algumas cepas de continuarem se multiplicando mesmo na presença de BLB e seu biofilme.

A *Campylobacter* é uma bactéria difícil de controlar em granjas e na indústria alimentícia (DOYLE, 2018) e normalmente são necessárias diferentes estratégias de controle para reduzir o índice de contaminação (TECHARUVICHIT et al., 2016). Assim, o uso de BLB na indústria de alimentos ou em granjas pode ajudar na redução desse patógeno após o uso de métodos tradicionais de desinfecção, sendo, portanto, uma alternativa segura ao uso de desinfetantes na produção animal e na indústria de alimentos ou podendo ser uma ferramenta adicional ao uso dos desinfetantes, talvez sendo eficiente ao ficar em contato com a superfície por mais tempo, visto que foi demonstrado que algumas cepas precisam de mais tempo de contato com o biofilme de BLB para que seu crescimento seja controlado.

No caso da SH, houve sucesso no uso preventivo de BLB já que houve redução da multiplicação na placa de poliestireno. É importante mencionar que a redução no crescimento foi mais eficaz após 48 horas de inoculação que 24 horas. Isso ocorreu provavelmente devido ao fato de as BLB necessitarem de mais tempo para formar um biofilme maior e mais estável.

Salmonella não tifóide pode ser de difícil controle em granjas de frango de corte, especialmente SH, que possui grande prevalência nas granjas brasileiras (VOSS-RECH et al., 2015). É provável que essas bactérias permaneçam nas granjas em forma de biofilme, bem como nas instalações de processamento da carne, suportando mesmo as situações mais hostis.

5.CONCLUSÃO

O biofilme de bactérias lácticas e *Bacillus spp.* foi capaz de controlar o crescimento de *Salmonella* Heidelberg já após 24 horas de contato com o patógeno e das cepas 33454/1 e 596 de *Campylobacter jejuni* após 48 e 96 horas, respectivamente. Considerando que o uso de

BLB não é prejudicial aos animais ou aos humanos, não deixa resíduos, e o patógeno não desenvolve resistência, essa é uma ótima alternativa a ser inserida como método de prevenção de *Salmonella* Heidelberg e algumas cepas de *Campylobacter jejuni* na indústria de aves e alimentos.

6. REFERÊNCIAS

ABPA – Associação Brasileira de Proteína Animal. **Relatório Anual**. 2018.

Disponível em: <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-aneais>.

ALTEKRUSE, S.F et al. *Campylobacter jejuni* — an emerging foodborne pathogen. **Emerging Infectious Disease**, v.5, n. 1, p. 28-35, Janeiro 1999.

AWAD, W.A. et al. *Campylobacter* infection in chickens modulates the intestinal epithelial barrier function. **Innate Immunity**,v. 21, n. 2, p.151–160, 2015.

BARROS, R. et al. Reassessing flaphospholipol effects on broiler performance. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 12, p. 2458-2462, 2012.

BARUZZI, F. et al. Antimicrobial compounds produced by *Bacillus* spp. and applications in food. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**, v. 2, p. 1102-1111, 2011.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Projeções do Agronegócio. Mundial e Brasil. Brasília: Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento; 2011.

CHANTZIARAS, I. et al. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 3, p. 827-834, 2013.

CORCORAN, M. et al. *Salmonella enterica* biofilm formation and density in the Centers for Disease Control and Prevention's biofilm reactor model is related to serovar and substratum. **Journal of food protection**, v. 76, n. 4, p. 662-667, 2013.

CORRÊA, G. S. S.et al. Utilização de antibiótico e probióticos como promotores de crescimento na alimentação de frangos de corte. **Revista Universidade Rural**, v, 22, n. 2, p 35-81, 2003.

COSTA,P.M., SILVA, D.M. e J. MIRANDA **Ensaio de Campo com a Vacina Paracox5 em Frangos Criados em Regime Extensivo**, 2001.

COSTA, S. **A saga da avicultura brasileira: como o Brasil se tornou o maior exportador mundial de carne de frango**. São Paulo: UBABEF, 2011.

COSTERTON, J.W. et al. Microbial Biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 711-745, 1995.

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

DOYLE, Michael P. Campylobacter in foods. In: **Campylobacter infection in man and animals**. CRC Press, 2018. p. 163-180.

ESPÍNDOLA, C.J. Trajetórias do progresso técnico na cadeia produtiva de carne de frango do Brasil. **Revista Geosul**, Florianópolis, v. 27, n. 53, p. 89-113, Janeiro/Julho 2012.

FUNK, J.A. et al. Longitudinal study of *Salmonella enterica* in growing pigs reared in multiple-site swine production systems. **Veterinary Microbiology**, n.83, n. 1, p.45-60, Outubro 2001.

GARCIA-MIGURA, L.et al. Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: the missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v. 170, n. 1-2, p. 1-9, 2014.

GILLIS, D., CRONQUIST, A. B., CARTTER, M. et al. Incidence and trends of infection with pathogens transmitted commonly through food - foodborne diseases active surveillance network, 10 U.S. sites, 1996-2012. **MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report**,v.62, n 15, p. 283–287, Abril 2013.

GOLDEN, N. J.; ACHESON, D. W.K. Identification of motility and autoagglutination *Campylobacter jejuni* mutants by random transposon mutagenesis. **Infection and immunity**, v. 70, n. 4, p. 1761-1771, 2002.

GREZZI, G. Limpeza e desinfecção na avicultura. **Ergomix** [online], 2008. Disponível em: <http://pt.engormix.com/MA-avicultura/saude/artigos/limpezadesinfeccao-avicultura-t100/165-p0.htm>

GUERIN, P. J.; VOLD, L.; AAVITSLAND, P. Communicable disease control in a migrant seasonal workers population: a case study in Norway. **Euro surveillance: bulletin**

Europeensur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin, v. 10, n. 3, p. 48-50, 2005.

GUERRIERI, E. et al. Use of lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes* in a small-scale model. **Food Control**, v. 20, n.9, p. 861–865, Setembro 2009.

HANNING, I.; JARQUIN, R.; SLAVIK, M. *Campylobacter jejuni* as a secondary colonizer of poultry biofilms. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, n. 4, p. 1199-1208, Setembro 2008.

HAWKEY, P. M. The growing burden of antimicrobial resistance. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 62, n. suppl_1, p. i1-i9, 2008.

HOEPERS, P.G. et al. About *Campylobacter*. **Campylobacter spp. and Related Organisms in Poultry**. Suíça: Springer, 2016. cap. 1, p. 1-18.

HUMPHREY, S. et al. *Campylobacter jejuni* is not merely a commensal in commercial broiler chickens and affects birdwelfare. **MBio**, v. 5, n. 4, p.1–7, 2014.

JALILSOOD, T. et al. Inhibition of pathogenic and spoilage bacteria by a novel biofilm-forming *Lactobacillus* isolate: a potential host for the expression of heterologous proteins. **MicrobialCell Factories**, v. 14, n. 1, p. 96, 2015.

JOSHUA, G.W.P. et al. Biofilm formation in *Campylobacter jejuni*. **Microbiology**, v.152, n. 2, p. 387-396, Fevereiro 2006.

KEEVIL, C. W. Rapid detection of biofilms and adherent pathogens using scanning confocal laser microscopy and episcopic differential interference contrast microscopy. **Water Science and Technology**, v. 47, n. 5, p. 105-116, 2003.

KNUDSEN, K.N.; BANG, D.D.; ANDRESEN, L.O., MADSEN, M. *Campylobacter jejuni* strains of human and chicken origin are invasive in chicken after oral challenge. **Avian Diseases**, v. 50, n.1, p.10–14, Fevereiro 2006.

KUANA, S. L. Limpeza e desinfecção de instalações avícolas. In: **JÚNIOR, A. B.; SILVA, E. N.; FÁBIO, J. DI.; SESTI, L.; ZUANAZE, M. A. A. Doenças das aves**. 2ª ed. Campinas: Facta, 2009. p. 1.104.

KUNIGK, L; ALMEIDA, M.C.B. Action of peracetic acid on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in suspension or settled on stainless steel surfaces. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 38-41, Março 2001.

LOPALCO, P.L. et al. Epidemiologic study and cost analysis of a *Salmonella* Enteritidis epidemic. **Annali di Igiene: medicina preventiva edicomunita**, v. 12, n. 4, p. 279-285, 2000.

LOURENÇO, M.C.S.; REIS, E.F.M.; VALLS, R. *Salmonella enterica* subs *phoutenae* sorogrupo O:16 em um paciente HIV positivo: relato de caso. **Revista Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.46, n.3, p.169-170, 2014.

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

MAN, S. M. The Clinical importance of emerging *Campylobacter* species. **Nature reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 8, n. 12, p. 669, 2011.

.MELO, R.T.; MONTEIRO, G.P. et al. *Campylobacter* spp.: Capacity of Biofilm Formation and Other Strategies of Survival and Adaptation to Remain in the Poultry Industry. In: ***Campylobacter* spp. and Related Organisms in Poultry**. Springer, Cham, 2016, cap. 9, p. 151-164.

MELO, Roberta T.; NALEVAIKO, P.C. et al. *Campylobacter jejuni* strains isolated from chicken meat harbour several virulence factors and represent a potential risk to humans. **Food Control**, v. 33, n. 1, p. 227-231, Setembro 2013.

MENDONÇA, E.P.; FONSECA, B.B.; MONTEIRO, G.P. Epidemiology of *Campylobacter* in Farms. In: ***Campylobacter* spp. and Related Organisms**. Springer, Cham, 2016, cap. 7, p. 125-136.

NACHAMKIN, I.; ALLOS, B.M.; HO, T. *Campylobacter* species and Guillain-Barre syndrome. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, p.555–567, 1998.

NGUYEN, H.D.N., YANG, Y.S., YUK, H.G. Biofilm formation of *Salmonella* Typhimurium on stainless steel and acrylic surfaces as affected by temperature and pH level. **LWT – Food Science and Technology**, v. 55, n.1, p.383-388, Janeiro 2014.

OYARZABAL, O.A., FERNÁNDEZ, H. Isolation and Identification of *Campylobacter* spp. in Poultry. In: ***Campylobacter* spp. and Related Organisms in Poultry**. Springer, Cham, 2016, cap. 2, p. 19-36.

RECK, A.B.; SCHULTZ, G. Aplicação da metodologia multicritério de apoio à decisão no relacionamento interorganizacional na cadeia da avicultura de corte. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 54, n. 4, p. 709-728, Dezembro 2016.

REES, L.E. et al. *Campylobacter* and IFN gamma interact to cause a rapid loss of epithelial barrier integrity. **Inflammatory Bowel Diseases**, v.14, n. 3, p. 303–309, Março 2008.

SALLOWAY, S. et al. Miller-Fisher syndrome associated with *Campylobacter jejuni* bearing lipopolysaccharide molecules that mimic human ganglioside GD3. **Infection and Immunity**, v.64, n. 8, p.2945-2949, 1996.

SANTOS, G.R. Cadeias Agroindustriais e Avicultura no Brasil: organização produtiva e upgrading por cooperativas. **Serie Documentos del Reporte Anual**, 2014.

SCHMIDT, R.H. **Basic elements of equipment cleaning and sanitizing in food processing and handling operations**. Institute of food and agricultural science. University of Florida, 2003. Disponível em: <http://www.sagesanitizingsystems.com/pdfs/Basic%20Elements%20of%20Cleaning%20in%20Foodservice.pdf>. Acesso em: 18 nov. 2019.

SHINOHARA, N. K. S. et al. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 13, p. 1675-1683, 2008.

SILVA, E.N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: Retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Avícolas**, v.4, n.2, p.85-100, Maio 2002.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, n. 4, p. 573-583, Maio 2010.

SPERANZA, B; SINIGAGLIA, M; CORBO, M. R. Nonstarter lactic acid bacteria biofilms: a means to control the growth of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. **Food Control**, v. 20, n. 11, p. 1063-1067, 2009.

STANTON, T. B. A call for antibiotic alternatives research. **Trends in microbiology**, v. 21, n. 3, p. 111-113, 2013.

TALAMINI, D.J.D.; MARTINS, F.M.; DOS SANTOS FILHO, J.I. Conjuntura econômica da avicultura brasileira em 2018. **Embrapa Suínos e Aves – Artigo de divulgação na mídia (INFOTECA – E)**, 2018.

TECHARUVICHIT, P. et al. Adaptation of *Campylobacter jejuni* to biocides used in the food industry affects biofilm structure, adhesion strength, and cross-resistance to clinical antimicrobial compounds. **Biofouling**, v. 32, n. 7, p. 827-839, 2016.

TRACHOO, N.; FRANK, J. F.; STERN, N. J. Survival of *Campylobacter jejuni* in biofilms isolated from chicken houses. **Journal of food protection**, v. 65, n. 7, p. 1110-1116, 2002.

ÜNAL, E., KALKAN, S., ERGINKAYA, Z. Use of lactic acid bacteria biofilms as biocontrol agents. In: **Science and Technology Against Microbial Pathogens**. 2011. p. 207-209.

VESTBY, L. K. et al. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal and feed factories. **BMC Veterinary Research**, v.5, n. 1, p. 20, Maio 2009.

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

YUKI, N. Molecular mimicry between gangliosides and lipopolysaccharides of *Campylobacter jejuni* isolated from patients with Guillain-Barré syndrome and Miller-Fisher syndrome. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 176, n. 2, p. 150-153, Dezembro 1997.