

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

**PADRÃO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E GENES DE
VIRULÊNCIA EM *Salmonella* ENTERITIDIS FORMADORAS DE
BIOFILME**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Carla Ferreira da Silva

**Passo Fundo, RS, Brasil
2014**

PADRÃO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E GENES DE VIRULÊNCIA EM *Salmonella* ENTERITIDIS FORMADORAS DE BIOFILME

Carla Ferreira da Silva

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação, Área de Concentração em Bioexperimentação, da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Bioexperimentação**

Orientadora: Profa. Laura Beatriz Rodrigues

**Passo Fundo, RS, Brasil
2014**

**UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOEXPERIMENTAÇÃO**

A comissão examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado


**PADRÃO DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS E GENES DE
VIRULÊNCIA EM *Salmonella* ENTERITIDIS FORMADORAS DE BIOFILME.**


Elaborada por
Carla Ferreira da Silva

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestra em Bioexperimentação

Comissão Examinadora


**Laura Beatriz Rodrigues, Dra., UPF
(Orientadora/Presidente)**


Luciana Ruschel dos Santos, Dra., UPF


Vladimir Pinheiro do Nascimento, Dr., UFRGS

**Passo Fundo, RS, Brasil
2014**

CIP – Catalogação na Publicação

S586p Silva, Carla Ferreira da
Padrão de resistência a antimicrobianos e genes
de virulência em *Salmonella enteritidis* formadoras
de biofilme / Carla Ferreira da Silva. – 2014.
89 f. : il., color. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Laura Beatriz Rodrigues.
Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) –
Universidade de Passo Fundo, 2014.

1. Alimentos – Contaminação. 2. Resistência a
doenças. 3. Salmonela. 4. Agentes antimicrobianos.
I. Rodrigues, Laura Beatriz, orientadora. II. Título.

CDU: 663/664

Catalogação: Bibliotecária Schirlei T. da Silva Vaz - CRB 10/1364

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar forças, saúde e serenidade para continuar sempre, após cada tropeço, a cada momento de dor e angústia, e em todas as vezes em que pensei que não conseguiria persistir.

À minha mãe, por ser sempre uma fortaleza, sendo o ponto de equilíbrio de toda a família em todos os momentos difíceis pelos quais passamos nestes dois anos de andamento do mestrado. Por sempre me dar força e amor e por me mostrar sempre qual o caminho que eu deveria seguir.

Ao meu irmão Mateus, por ser meu melhor amigo da vida toda, por sempre segurar as pontas e por sempre ter a palavra certa na hora certa. Por ser esse meu irmão mais novo que sempre parece ser mais velho pela sua sabedoria. Além de me fazer rir sempre que meu coração está chorando.

Ao meu amado Daniel, por suportar sempre meus momentos de mau humor, ausências, angústias e desabafos. Por sempre escutar minhas intermináveis explicações sobre o que eu estava fazendo, mesmo sem entender nada do que eu estava falando, na maioria das vezes. Por ser meu incentivador quando a vontade era desistir.

Aos meus tios e tias por sempre me incentivarem a lutar pela realização de todos os meus sonhos. Ao meu “dindo” José Américo, por sempre cumprir fielmente seu papel de padrinho sendo um segundo pai. À minha vó Ita e ao meu vô Américo, por sempre passar sabedoria pelo olhar. E as minhas queridas cunhadas Claudia e Daniela por serem sempre incentivadoras dos meus projetos.

Aos meus amigos por entenderem minha ausência e minha “falta de vida social” por um período.

À minha querida orientadora Laura, pelo incentivo, apoio, amizade, orientação e confiança. Aos amados professores Luciana e Elci pela amizade e sábias palavras trocadas.

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós Graduação em Bioexperimentação da Universidade de Passo Fundo, pelas palavras de incentivo, conhecimentos repassados e conversas de corredores que contribuíram para minha formação.

À minha querida amiga e colega Lilian, pelas risadas, lágrimas e palavras e por estar sempre presente.

Aos demais colegas do Programa de Pós Graduação em Bioexperimentação por conseguirmos, acima de tudo, sermos amigos e não concorrentes. Que este espírito permaneça entre nós!

Ao pessoal do laboratório, bolsistas, funcionários e voluntários que tanto ajudaram na execução deste trabalho.

À Capes pelo apoio financeiro.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu amado pai, meu grande incentivador, que onde estiver está muito orgulhoso por esta conquista. Ela é nossa!!!

EPÍGRAFE

“Naquele dia, decidi trocar tantas coisas...
Naquele dia, aprendi que os sonhos existem para tornar-se realidade.
E desde aquele dia já não durmo para descansar... simplesmente durmo para sonhar.”

Walt Disney

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 <i>Salmonella</i> spp.....	19
2.1.1 <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	20
2.2 BIOFILMES.....	21
2.3 ANTIMICROBIANOS.....	23
2.4 SANITIZANTES.....	24
2.5 RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	27
2.6 FATORES DE VIRULÊNCIA.....	29
2.6.1 Genes.....	30
3. CAPÍTULO 1. <i>Salmonella</i> Enteritidis formers biofilms are multiresistant to antibiotics.....	33
Abstract.....	34
Introdução.....	35
Materiais e métodos.....	36
Resultados.....	39
Discussão.....	40
Conclusão.....	43
Sources and manufactures.....	43
References.....	44
4. CAPÍTULO 2. Genes associados à virulência em <i>Salmonella</i> Enteritidis isoladas de surtos de doenças transmitidas por alimentos e de origem avícola.....	53
Resumo.....	54
Introdução.....	54
Materiais e métodos.....	56
Resultados.....	59
Discussão.....	60
Conclusão.....	65
Referências.....	66
5. CONCLUSÕES.....	73
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	74
7. REFERÊNCIAS.....	82

LISTA DE FIGURAS

3. CAPÍTULO 1

- FIGURA 1 Perfil da sensibilidade aos antimicrobianos das 20 cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas de surtos de DTA e de origem avícola. 50

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- FIGURA 1 Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo com os produtos para amplificação compatíveis com o gene *agfA* 74
- FIGURA 2 Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo com os produtos para amplificação compatíveis com o gene *invA* 75
- FIGURA 3 Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo com os produtos para amplificação compatíveis com o gene *sefA* e *lpfA* 75
- FIGURA 4 Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo com os produtos para amplificação compatíveis com o gene *sivH* 76
- FIGURA 5 Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo com os produtos para amplificação compatíveis com o gene *sopE* 76
- FIGURA 6 Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo com os produtos para amplificação compatíveis com o gene *spiA* 77
- FIGURA 7 Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo com os produtos para amplificação compatíveis com o gene *spvC* 77

LISTA DE TABELAS

3. CAPÍTULO 1

TABELA 1.	Distribuição do padrão de resistência a antimicrobianos de 20 isolados de <i>Salmonella</i> Enteritidis oriundos de surtos de DTA e de origem avícola.	49
TABELA 2.	Comparação da resistência aos antimicrobianos das <i>Salmonella</i> Enteritidis isoladas de surtos de doenças transmitidas por alimentos e de origem avícola.	50
TABELA 3.	Formação de biofilmes, perfil de resistência a antimicrobianos e resistência a biguanida de <i>Salmonella</i> Enteritidis isoladas de surtos de doenças transmitidas por alimentos e de origem avícola.	51

4. CAPÍTULO 2

TABELA 1.	Sequência de <i>primers</i> utilizados na pesquisa de genes associados à virulência de <i>Salmonella</i> Enteritidis isoladas de surtos de doenças transmitidas por alimentos e de origem avícola	58
TABELA 2.	Genes de virulência e perfil genético de <i>Salmonella</i> Enteritidis	59
TABELA 3.	Perfil genético das dezoito cepas de <i>Salmonella</i> Enteritidis analisadas	60
TABELA 4.	Frequência de detecção dos genes associados à virulência de <i>Salmonella</i> Enteritidis	60

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

TABELA 1.	Formação de biofilmes, perfil de resistência à antimicrobianos e sanitizantes e perfil genético de <i>Salmonella</i> Enteritidis	78
-----------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> – Coleção Americana de Tipos de Cultura
BHI	<i>Brain-Heart Infusion</i> – Infusão Cérebro-coração
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i> – Centro de Controle e Prevenção de Doenças
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Doa	Densidade óptica da amostra
Docn	Densidade óptica do controle negativo
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
EPS	Substância polimérica extracelular
IL-8	Interleucina 8
Kb	Kilobase (= 1000 pares de base)
LPS	Lipopolissacarídeo
mg	Miligrama
mL	Mililitro
Pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
SE	<i>Salmonella</i> Enteritidis
SPI	<i>Salmonella Patogenicity Island</i> – Ilha de Patogenicidade da <i>Salmonella</i>
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
TSB	Caldo triptona de soja
UBABEF	União Brasileira de Avicultura
XLD	Ágar Xilose-Lisina Desoxicolato
μ L	Microlitro
μ g	Micrograma

RESUMO

**Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo**

**Padrão de resistência a antimicrobianos e genes de virulência em *Salmonella*
*Enteritidis***

Autor: Carla Ferreira da Silva

Orientadora: Laura Beatriz Rodrigues

Passo Fundo, 22 de agosto de 2014

A *Salmonella* Enteritidis é um dos patógenos mais isolados em surtos de doenças de origem alimentar, sendo o mais prevalente e o mais isolado em surtos de salmoneloses. A escolha do sanitizante apropriado nas indústrias de alimentos é essencial para evitar a disseminação da contaminação microbiana e para o controle de biofilmes em superfícies. A preocupação com a resistência aos antimicrobianos utilizados também é de extrema relevância. Além disso, a interação que ocorre entre a *Salmonella* e seus hospedeiros é multifatorial e pode estar ligada a genes de virulência. Foram testadas 20 amostras de *S. Enteritidis* quanto à formação de biofilmes, resistência a antimicrobianos e a sanitizantes. Primeiramente foram avaliadas quanto à formação de biofilme em poliestireno na temperatura de $36\pm 1^\circ\text{C}$. Foi testada a resistência aos sanitizantes biguanida nas concentrações 0,6%, 1,0% e 1,5%, ácido peracético nas concentrações 0,1%, 0,5% e 1,0% e amônia quaternária nas concentrações 0,3%, 1,0% e 2,0%. Para a resistência aos antimicrobianos foram testadas frente à ampicilina 10 mcg, cefalexina 30 mcg, cloranfenicol 30 mcg, enrofloxacina 5 mcg, eritromicina 15 mcg, neomicina 30 mcg, sulfazotrim 25 mcg, sulfonamidas 300 mcg. Além disso, em 18 destas amostras foi avaliada a presença dos genes *hilA*, *avrA*, *invA*, *sivH*, *sopE*, *spiA*, *agfA*, *lpfA*, *sefA* e *spvC*. Nos resultados obtidos quanto à formação de biofilmes, 25% foram fortemente formadoras, 35% moderadamente formadoras, 35% fracamente formadoras e 10% não formadoras de biofilme. Todas as *S. Enteritidis* provenientes de surtos de DTA e 80% das de origem avícola formaram biofilme. Nos sanitizantes, a amônia quaternária e o ácido peracético foram eficientes em todos os tempos e concentrações, entretanto, os testes com a biguanida resultaram em resistência no tempo de 1 minuto nas concentrações 0,6%, 1,0% e 1,5%, no tempo de 5 minutos nas concentrações 1,0% e 1,5%, e no tempo de 10 minutos nas concentrações 0,6% e 1,0%. Quanto aos antimicrobianos, 10 amostras de *S. Enteritidis* foram multirresistentes aos antibacterianos testados. Em relação aos princípios ativos, 25% foram resistentes à ampicilina, 5% à cefalexina, 55% à enrofloxacina, 90% à eritromicina, 80% à neomicina, 5% à sulfazotrim, 70% às sulfonamidas. Houve 100% de sensibilidade ao cloranfenicol. Além da formação de biofilmes, 50% destas *S. Enteritidis* foram multirresistentes aos antimicrobianos testados, e 20% também foram resistentes à biguanida. Os genes *hilA*, *avrA*, *invA*, *sopE*, *spiA*, *agfA*, *lpfA*, *sefA* e *spvC* estiveram presentes em 100% das *S. Enteritidis* e o gene *sivH* esteve presente em 89%. Mesmo todas as amostras sendo de *S. Enteritidis* houve variação no perfil genético, sendo o perfil 1 o mais prevalente, com 16 amostras possuidoras de todos os genes. Estes resultados denotam grande relevância devido a possibilidade de permanência destes microrganismos em ambientes de manipulação de alimentos na forma de biofilmes e, em casos de transmissão a seres humanos, apresentarem

maior dificuldade de tratamento em virtude da multirresistência. Além do que, a presença dos genes de virulência pode ser uma das causas para a maior virulência de *Salmonella* Enteritidis em casos de surtos de doenças transmitidas por alimentos.

Palavras-chave: *Salmonella* Enteritidis, biofilmes, multirresistência, antimicrobianos, sanitizantes, genes de virulência.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação
Universidade de Passo Fundo

Antimicrobial resistance patterns and virulence genes of *Salmonella* Enteritidis formers biofilms

Author: Carla Ferreira da Silva
 Advisor: Laura Beatriz Rodrigues
 Passo Fundo, 22 de agosto de 2014

The *Salmonella* Enteritidis is one of the most isolated pathogens in outbreaks of foodborne diseases, and the most prevalent and most isolated in outbreaks of salmonellosis. The choice of the appropriate sanitizer in food industries is essential to prevent the dissemination of microbial contamination and control of biofilms on surfaces. The concern about antimicrobial resistance is also extremely important. Furthermore, the interaction which occurs between *Salmonella* and their hosts is multifactorial and may be related to virulence genes. Twenty samples of *S. Enteritidis* as the formation of biofilms, antibiotic resistance and sanitizers were tested. We tested the sanitizing resistance to biguanide concentrations 0.6%, 1.0% and 1.5%, peracetic acid at concentrations 0.1%, 0.5% and 1.0%, and quaternary ammonia at concentrations of 0, 3%, 1.0% and 2.0%. For tests of antimicrobial resistance the cultures were evaluated front 10 mcg ampicillin, 30 mcg cephalixin, 30 mcg chloramphenicol, 5 mcg enrofloxacin, 15 mcg erythromycin, 30 mcg neomycin, 25 mcg sulphazotrim, 300 mcg sulfonamides. Furthermore, in 18 of these samples was evaluated the presence of *hlyA*, *avrA*, *invA*, *sivH*, *sopE*, *spiA*, *agfA*, *lpfA*, *sefA* and *spvC* genes. In the results obtained for the biofilm formation, 25% of samples were strongly biofilm formers, 35% moderately formers, 35% weakly formers and 10% not biofilm formers. All *S. Enteritidis* from outbreaks of foodborne diseases and 80% from poultry products produced biofilm. In sanitizers, quaternary ammonia and peracetic acid were effective at all concentrations and at all times, but tests with biguanide resulted in resistance in the time of 1 minute at concentrations 0.6%, 1.0% and 1.5%, at time 5 minutes at concentrations of 1.0% and 1.5% and at time 10 minutes at concentrations of 0.6% and 1.0%. As for antimicrobial susceptibility testing, 10 samples of *S. Enteritidis* presented pattern of multidrug resistance to the antibiotics tested. In relation to the active principles, 25% of *S. Enteritidis* were resistant to ampicillin, 5% to cephalixin, 55% to enrofloxacin, 90% to erythromycin, 80% to neomycin, 5% to sulphazotrim, 70% to sulfonamides. There was 100% sensitivity to chloramphenicol. Besides the formation of biofilms, 50% of *S. Enteritidis* were multiresistant to antimicrobials been tested, and 20% were also resistant to biguanide. The *hlyA*, *avrA*, *invA*, *sopE*, *spiA*, *agfA*, *lpfA*, *sefA* and *spvC* genes were present in 100% of *S. Enteritidis* and *sivH* gene was present in 89%. Although all samples be *S. Enteritidis* there was changes in genetic profile, being the profile 1 the most prevalent, with 16 samples possessed all genes. These results denotes great relevance due to the possibility of permanence of these microorganisms in food manipulation environments in the form of biofilms and, in the case of transmission to humans, present more difficulty in treatment due to the multidrug resistance. Further than, the presence of virulence genes may be one reason for the higher virulence of *Salmonella* Enteritidis in cases of outbreaks of foodborne diseases.

Keywords: *Salmonella* Enteritidis, biofilms, multidrug resistance, antimicrobials, sanitizers, virulence genes.

1. INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira emprega mais de 3,6 milhões de pessoas, direta e indiretamente, respondendo por quase 1,5% do Produto Interno Bruto nacional. Em 2011 a produção brasileira atingiu a marca histórica de 13,058 milhões de toneladas, garantindo ao Brasil uma posição entre os três maiores produtores mundiais de carne de frango, juntamente com Estados Unidos e China. Nas exportações, o Brasil mantém, desde 2004, a posição de maior exportador mundial, tendo terminado 2011 com a marca de 3,9 milhões de toneladas embarcadas para mais de 150 países (85).

Um aspecto importante na avicultura moderna é a preocupação com a saúde pública, ou seja, os consumidores finais de produtos de aves estão sujeitos a serem acometidos por enfermidades causadas por patógenos presentes nestes produtos. Estes patógenos podem contaminar o produto final de várias maneiras, desde a via vertical, da galinha para os ovos férteis, passando pela contaminação horizontal durante as fases de incubação/eclosão e engorda dos frangos e/ou contaminação durante o processamento industrial (78).

As salmonelas são bactérias Gram negativas pertencentes à família das enterobactérias e são frequentemente isoladas de aves e produtos avícolas. Este patógeno intracelular habita o trato gastrointestinal de várias espécies animais e do homem, resultando em diferentes manifestações da doença incluindo febre entérica, bacteremia e gastroenterites (69).

A *Salmonella* Enteritidis é uma das bactérias que mais causam doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo, estando relacionada frequentemente a surtos de doenças transmitidas por alimentos, geralmente associados ao consumo de carne de aves e ovos, acarretando prejuízos econômicos em vários países. No Brasil, entre os anos de 2000 e 2013, a *Salmonella* spp. foi o agente etiológico de 1.522 surtos de DTA (1) e, nos Estados Unidos, juntamente com o *Campylobacter*, a *Salmonella* causa acima de 2,5 milhões de casos de doenças resultando em dezenas de milhares de internações e centenas de mortes (68). Um dos principais obstáculos enfrentados pela indústria de alimentos é a ausência de ferramentas de diagnósticos para identificar com rapidez e segurança os sorovares de *Salmonella* envolvidos em surtos (51).

A contaminação do alimento ocorre frequentemente devido ao controle inadequado da temperatura de armazenamento e distribuição, da falta das boas práticas na manipulação ou, ainda, por contaminação cruzada dos alimentos crus com alimentos processados. Assim, a escolha do sanitizante certo nas indústrias de alimentos é fator primordial para a qualidade, já

que a sanitização é a última etapa do processo de higienização e visa reduzir os microrganismos até níveis aceitáveis para obtenção de um produto final seguro para a saúde dos consumidores. Os sanitizantes geralmente são usados para inativar microrganismos alvo em superfícies de contato com alimentos e equipamentos em serviços de alimentação (28) e devem ser utilizados nas concentrações recomendadas pelo fabricante e também pelas legislações vigentes, já que uma subdosagem pode contribuir para uma possível resistência bacteriana e uma superdosagem, bem menos comum em indústrias de alimentos, pode trazer contaminação do produto evitando sua comercialização (21).

A falta de eficiência dos procedimentos de higienização e limpeza permite a adesão de microrganismos e, muitas vezes, o desenvolvimento de biofilmes nessas superfícies, o que constitui uma potencial fonte de contaminação dos alimentos, demonstrando ter um papel preponderante na proliferação de infecções bacterianas, sendo um fator determinante para a virulência (19).

Os mecanismos que a *Salmonella* usa para causar doença estão associados com a forma com que ela interage com seus hospedeiros e também por genes associados à virulência e a patogenicidade.

Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram testar 20 amostras de *Salmonella* Enteritidis para formação de biofilmes, resistência a três sanitizantes (biguanida, amônia quaternária e ácido peracético) e oito antimicrobianos (ampicilina, cefalexina, enrofloxacina, eritromicina, neomicina, sulfazotrim, sulfonamidas e cloranfenicol). Ainda, a realização da pesquisa dos genes *hilA*, *avrA*, *invA*, *sivH*, *sopE*, *spiA*, *agfA*, *lpfA*, *sefA* e *spvC*, que são associados à virulência da *Salmonella* através da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) em dezoito destas amostras.

A presente dissertação é composta por esta introdução, uma breve revisão de literatura sobre a *Salmonella*, biofilmes, antimicrobianos, sanitizantes, fatores de virulência e os genes utilizados e, ainda, por dois artigos científicos. O Capítulo 1 “***Salmonella* Enteritidis formers biofilms are multiresistant to antibiotics**” teve como objetivos avaliar a formação de biofilmes e testar a resistência de vinte *S. Enteritidis* frente à sanitizantes e também antimicrobianos e foi submetido para a revista *Acta Scientiae Veterinariae*. O Capítulo 2 “**Genes associados à virulência em *Salmonella* Enteritidis isoladas de surtos de doenças transmitidas por alimentos e de origem avícola**” teve como objetivos analisar, através da Reação em Cadeia da Polimerase, se dezoito amostras de *Salmonella* Enteritidis possuem os

seguintes genes: *hilA*, *avrA*, *invA*, *sivH*, *sopE*, *spiA*, *agfA*, *lpfA*, *sefA* e *spvC* associados à virulência e está em fase de submissão.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Salmonella* spp.

O nome *Salmonella* foi dado após o médico veterinário bacteriologista Daniel E. Salmon, juntamente com Smith, isolarem uma bactéria do intestino de suínos em 1884, que foi denominada de *Salmonella Choleraesuis*. As salmonelas possuem grande similaridade genética e são diferenciadas por sorovares que, atualmente, é o resultado acumulado de vários anos de estudos das interações dos anticorpos com as suas superfícies antigênicas e foram estabelecidos por Kauffman e White há quase um século. Todas as fórmulas antigênicas conhecidas como sorovares de *Salmonella* estão listados no chamado esquema Kauffman-White e, em 2007, foram descritos 2.579 sorotipos (40).

De acordo com o CDC (Centers for Disease Control and Prevention), o gênero *Salmonella* possui duas espécies, a *Salmonella bongori* e a *Salmonella enterica*, esta dividida em seis subespécies: *S. enterica* subespécie *enterica*, *S. enterica* subespécie *salamae*, *S. enterica* subespécie *arizonae*, *S. enterica* subespécie *diarizonae*, *S. enterica* subespécie *houtenae*, *S. enterica* subespécie *indica* (81).

Alguns sorovares foram denominados de acordo com a síndrome que causavam (*S. Typhi*), sua relação com ela (*S. Paratyphi*), com a síndrome e a especificidade do hospedeiro como a *S. Abortus-ovis* e a *S. Abortus-equi*. Para evitar algumas confusões, também existem nomes de sorovares indicando a origem geográfica onde primeiramente foram encontrados, como é o caso da *S. London* e *S. Panama*. Como eram consideradas espécies, os sorovares tinham seus nomes escritos em itálico, mas, atualmente, os nomes não são mais escritos em itálico e sim com a primeira letra maiúscula, como exemplo para a *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis, comumente denominada *S. Enteritidis* (40).

A *Salmonella* pertence à Família Enterobacteriaceae, são bastonetes curtos, Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, móveis, com flagelos peritríquios, fermentam a glicose produzindo ácido e gás, mas são incapazes de metabolizar a lactose e a sacarose, possuem como temperatura ótima de crescimento aproximadamente 38°C. Como não são formadoras de esporos, são relativamente termossensíveis, podendo ser destruídas a 60°C por 15 a 20 minutos (35). O pH ótimo de crescimento é próximo a neutralidade e valores de pH acima de 9,0 e abaixo de 4,0 são considerados bactericidas, e o pH mínimo de crescimento registrado foi de 4,05 (46).

Esta bactéria possui uma complexa estrutura de lipopolissacarídeo (LPS), composta por três regiões: lipídeo A, centro e antígeno O. O lipídeo A ancora a molécula na membrana externa e é tóxico, sendo o fator de virulência da *Salmonella* (35). O antígeno O ou antígeno somático é estável ao calor e resistente ao álcool, tem demonstrado capacidade de conferir propriedades hidrofílicas às bactérias Gram negativas (31; 84). Em alguns sorovares de *Salmonella* são encontrados os antígenos Vi, como na *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* e *S. Dublin*, já os antígenos H são antígenos flagelares e termo-lábeis (84).

2.1.1 *Salmonella* Enteritidis

A *Salmonella* Enteritidis é um dos sorotipos de *Salmonella* mais comuns, sendo um importante patógeno entérico, altamente resistente em ambientes, causador de gastroenterites transmitidas por alimentos em humanos em todo o mundo (18; 58; 87) e é transmitida principalmente através do consumo de ovos crus ou mal cozidos (18). Uma pessoa infectada geralmente tem febre, cólicas abdominais e diarreia a partir de 12 a 72 horas após o consumo do alimento ou bebida contaminada, sendo que a doença dura de 4 a 7 dias e a maioria das pessoas se recuperam sem o uso de antibióticos. Entretanto, os quadros podem ser severos, necessitando de hospitalização (18).

Vários estudos demonstram que a *Salmonella* Enteritidis tornou-se resistente a vários antimicrobianos e, no Estado de São Paulo, o Instituto Adolfo Lutz detectou que 65% das cepas são resistentes a antibióticos, em geral a dois tipos de drogas, e algumas das cepas até sete antimicrobianos (29).

Um estudo feito pelo Centro de Vigilância Epidemiológica de São Paulo, tendo por base as notificações de surtos e levantamento de diagnóstico laboratorial no período compreendido entre 1999 e 2007, mostra que grande parte dos surtos de diarreia causados por bactérias naquele estado é devido à *Salmonella* spp., sendo que a *Salmonella* Enteritidis representa 43,2 % destes surtos (29). No Estado do Rio Grande do Sul, entre os anos de 1999 a 2002, a *Salmonella* Enteritidis foi o agente causador de mais de 90% das salmoneloses ocorridas (56).

A *S. Enteritidis* é o sorotipo mais comum em seres humanos a nível mundial, especialmente na Europa, onde é responsável por 85% dos casos de *Salmonella*, seguido da Typhimurium. Representa o sorotipo mais isolado de humanos na Ásia (38%), América Latina e Ilhas do Caribe (31%), entretanto, na Oceania, representou apenas 9% dos isolados (63).

A *S. Enteritidis* tem se mostrado capaz de formar biofilme em materiais de natureza distinta e sob diferentes condições de crescimento, e vários estudos mostraram diferenças significativas entre sorovares, indicando que a capacidade de formação de biofilmes é importante para a sobrevivência da bactéria em ambientes de processamento de alimentos (19).

A *Salmonella* Enteritidis possui um plasmídeo de virulência que permite que a bactéria persista no interior das células retículo-endoteliais enquanto cepas sem este plasmídeo são eliminadas rapidamente (63). Produzem também um apêndice na superfície celular (fimbrias SEF-17) que facilita a adesão a superfícies inanimadas e que fornece resistência contra forças mecânicas (19) mantendo-se nas superfícies.

2.2 BIOFILMES

Inicialmente, os microrganismos foram caracterizados como planctônicos, ou seja, células suspensas livres, com base no seu crescimento em meios de cultura ricos em nutrientes. Foi Antoine Van Leeuwenhoek que, pela primeira vez, verificou a formação de microrganismos aderidos, através da visualização das placas dentárias por microrganismos (31). A descoberta do biofilme bacteriano em ecossistemas médicos e industriais criou uma urgência em identificar e caracterizar os fatores que são necessários para o seu desenvolvimento, que podem servir como alvo para prevenção e tratamento do biofilme (73).

As bactérias aderem-se às superfícies formando biofilmes (31), que são comunidades bacterianas sésseis aderidas a uma substância, a uma interface ou umas às outras (25), para o benefício do grupo. Caracterizam-se por estruturas tridimensionais complexas com grande resistência aos ambientes de estresse (7), agindo menos como entidades individuais e mais como sistema de vida coletivo, com canais de distribuição de água e nutrientes para as porções mais internas (3), sendo um ambiente ideal para transferência de informações genéticas (19). Estas bactérias estão embebidas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares, que as diferencia de seus homólogos em suspensão, produzem e exibem um fenótipo alterado com relação à taxa de crescimento e transcrição de genes que ajudam na fixação das células à superfície e estabilizam a colônia às flutuações do ambiente para se aderirem à superfície sólida, formando uma estrutura porosa e altamente hidratada, fornecendo um ambiente ideal para a troca de material genético entre as células (31; 32; 47; 52;).

Os biofilmes podem ser compostos por uma população que se desenvolveu a partir de uma única espécie, ou de uma comunidade derivada de múltiplas espécies microbianas em uma variedade de superfícies bióticas e abióticas (27). Quando são mistos (multiespécies) são formados por comunidades microbianas e frequentemente mais espessos e mais estáveis do que quando em monoespécies (50). Algumas propriedades da superfície celular, como a presença de fimbrias, flagelos, proteínas e polissacarídeos proporcionam uma vantagem competitiva para um organismo quando envolvido em uma comunidade mista (31). Na essência, representam uma existência baseada em comunidades interdependentes (27), sendo um consórcio multifuncional de microrganismos aderidos em uma superfície e embebidos em substâncias poliméricas extracelulares produzidas pelos próprios microrganismos (26).

A adesão é um processo complexo e dinâmico, regulado por diversas características do meio de crescimento, do substrato e da superfície celular (31; 50). Em células bacterianas ocorre, principalmente, em duas etapas: a reversível seguida da irreversível. A reversível é determinada por forças eletrostáticas fracas, interações hidrofóbicas, forças de van der Waals, temperatura e forças hidrodinâmicas. Na secundária ocorre uma medição molecular entre adesinas específicas e superfície. O microrganismo a consolida através da produção de uma complexa substância polimérica extracelular, ou, também, ligando receptores específicos presentes nas pilis com a superfície do material. Ao final, é irreversível, não sendo removida por suaves procedimentos de higienização (13; 25; 31; 50).

A adesão de microrganismos ocorre mais facilmente em superfícies que são mais ásperas, mais hidrofóbicas e revestidas por filmes condicionantes, principalmente em ambientes de processamento de alimentos (31), sendo a principal causa de contaminação do produto final, tendo como consequências a rejeição do produto e até mesmo doenças transmitidas por alimentos, se as bactérias envolvidas forem patogênicas (19). Entretanto, os biofilmes não apresentam apenas riscos higiênicos nas indústrias de alimentos, também causam perdas econômicas por técnicas falhas em sistemas de água, torres de frio, trocadores de calor, etc (58).

Certa resistência a tratamentos antimicrobianos tem sido observada e está atribuída a uma variedade de propriedades associadas com os biofilmes, como: difusão reduzida, alterações fisiológicas devido às taxas de crescimento reduzidas e à produção de enzimas que degradam os antimicrobianos (50), penetração do agente antimicrobiano através do biofilme e algumas alterações fisiológicas devido ao modo de crescimento (32). Além disso, é difícil

estabelecer que qualquer mecanismo único provoque esta resistência, em vez disso, mecanismos combinados criam as populações resistentes (50).

A *Salmonella* spp. possui uma elevada capacidade de formação de biofilme em superfícies plásticas, em termos de número de biofilme produzido (80). A *S. Enteritidis* adere e forma biofilmes em superfícies inertes de processamento de alimentos, como aço inoxidável e polietileno (58), e acumula glicose durante a fase de pré-incubação, que é usada para produzir a matriz extracelular do biofilme (13).

A celulose é um dos principais componentes do biofilme produzido por *Salmonella* Enteritidis e *S. Typhimurium*, representando um fenótipo essencial do ciclo de vida do organismo como uma melhor adaptação da sobrevivência bacteriana no ambiente e maior probabilidade de colonização em um hospedeiro animal (79).

A deficiência de celulose não afeta a virulência da *Salmonella* Enteritidis, mas aumenta a sensibilidade a tratamentos com cloro, sugerindo que a formação de biofilme pode ser um importante fator de sobrevivência em ambientes de superfície (79).

2.3 ANTIMICROBIANOS

Antimicrobianos são medicamentos que atuam causando a morte ou a inibição do crescimento de microrganismos. Podem ser administrados em animais para tratar ou prevenir a ocorrência de doenças infecciosas e, também, como aditivos, neste caso visando melhorar o desempenho zootécnico de animais de produção (5), podendo ser produzidos por bactérias ou por fungos ou também totalmente sintéticos (62). São utilizados há mais de 70 anos no tratamento de doenças infecciosas e o seu uso é benéfico e, quando administrados corretamente, seu valor é enorme, mas alguns microrganismos podem desenvolver resistência tanto a um único antibiótico quanto a uma associação deles (68).

Devido a crescente demanda de produção, na avicultura industrial é imprescindível o número de técnicas e/ou ações que diminuam a incidência de doenças no plantel avícola. Por muitas décadas os promotores de crescimento tiveram e ainda tem grande importância na produção de proteína animal, devido às inúmeras vantagens que oferecem, neutralizando ou amenizando com isto os efeitos prejudiciais desses produtos (5).

As sulfonamidas são bacteriostáticos derivados da sulfanilamida e agem inibindo o metabolismo do ácido fólico, por mecanismo competitivo (6). Seu uso indiscriminado em

frangos de corte e na avicultura de postura comercial, sem ser respeitado seu período de carência, deixa resíduos na carne e ovos destinados ao consumo humano (61).

A ampicilina e a cefalexina são antibióticos β -lactâmicos e possuem, no seu núcleo estrutural, o anel β -lactâmico, que confere atividade bactericida (6). A ampicilina pertence à classe das penicilinas e é um bactericida que atua na parede celular agindo contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, incluindo a *Salmonella* (62).

A enrofloxacinina pertence ao grupo das quinolonas, que inibem a atividade da DNA girase ou topoisomerase II, enzima essencial à sobrevivência bacteriana (6). Já a neomicina pertence ao grupo dos aminoglicosídeos, que se ligam à fração 30S dos ribossomos inibindo a síntese proteica ou produzindo proteínas defeituosas (6).

O cloranfenicol se liga à subunidade 50S do ribossomo, inibindo a síntese proteica da bactéria, tendo, assim, ação bacteriostática, podendo ser bactericida contra algumas espécies (6). No Brasil está proibida a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol e nitrofuranos e produtos que contenham estes princípios ativos para uso veterinário e emprego na alimentação de todos os animais e insetos (11).

A eritromicina foi isolada em 1952, a partir do *Streptomyces erythraeus*, e age contra bactérias Gram positivas, treponemas, micoplasmas e clamídias. Sua ação ocorre através da inibição da síntese proteica dependente de RNA, através da ligação em receptores localizados na porção 50S do ribossoma, impedindo as reações de transpeptidação e translocação (6). Possui ação bacteriostática, e a ação bactericida pode ocorrer quando em contato com microrganismos bastante sensíveis ou em concentrações bem elevadas (77). No ano de 2012 o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento proibiu em todo o território nacional a importação, fabricação e o uso das substâncias antimicrobianas espiramicina e eritromicina com finalidade de aditivo zotécnico melhorador de desempenho na alimentação animal (12).

2.4 SANITIZANTES

Na indústria de alimentos, a higienização inclui as etapas de limpeza e sanitização das superfícies de alimentos, ambientes de processamentos, equipamentos, utensílios manipuladores e ar de ambientes de processamento. A limpeza tem como objetivo principal a remoção de resíduos orgânicos e minerais aderidos às superfícies, já a sanitização tem como

objetivo eliminar microrganismos patogênicos e reduzir o número de microrganismos alteradores para níveis considerados seguros (2).

Sanitizante é um agente/produto que reduz o número de bactérias a níveis seguros de acordo com as normas de saúde (4). A sanitização, que é a última etapa do processo de higienização em indústrias de alimentos, visa a redução dos microrganismos alteradores e a eliminação dos patogênicos até níveis seguros, de modo a obter um produto de boa qualidade higiênico-sanitária (66). Também complementa o procedimento de higienização, assegurando a qualidade microbiológica das superfícies, e deve ser realizada imediatamente antes do uso dos equipamentos, pois, após as etapas de limpeza, pode ocorrer a multiplicação de microrganismos indesejáveis que não foram eliminados ou, a recontaminação ambiental das superfícies (2).

O sanitizante deve ser selecionado levando-se em conta as seguintes características: aprovação pelos órgãos competentes, apresentarem amplo espectro de ação antimicrobiana e capacidade de destruir rapidamente os microrganismos, serem estáveis sob variadas condições de uso e com baixa toxicidade e corrosividade. A ação dos sanitizantes é afetada pelas características da superfície, tempo e temperatura de contato, concentração de uso, tipos de resíduos presentes nas superfícies, pH, propriedades físico-químicas da água, substâncias inativadoras e, ainda, o tipo e a concentração de microrganismos contaminantes (2).

Desinfetante é o produto que mata todos os microrganismos patogênicos em objetos e superfícies inanimadas, mas não necessariamente todas as formas microbianas esporuladas (4). Agentes antissépticos são formulações germicidas que atuam na flora contaminante e colonizadora, com baixa causticidade e são hipoalergênicos quando destinados à aplicação na pele e mucosas para reduzir o número de agentes da microbiota transitória e residente (10).

Nos estabelecimentos avícolas, os produtos químicos bactericidas e germicidas são amplamente utilizados, sendo que os bactericidas são aqueles que devem destruir bactérias sob a forma vegetativa e os germicidas devem eliminar todos os microrganismos (bactérias, fungos, esporos), inclusive em suas formas resistentes (45).

As biguanidas são amplamente utilizadas como agentes de desinfecção geral na indústria de alimentos, tanto na redução da microbiota de manipuladores quanto na sanitização de equipamentos e utensílios, e, também, na desinfecção de piscinas e tem ação contra bactérias tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas (2; 59). Possui ação praticamente imediata, baixo potencial de toxicidade, baixa irritabilidade e tem ação contra bactérias, fungos, leveduras e alguns tipos de vírus (88).

O mecanismo de ação das biguanidas ocorre por modificações citológicas e fisiológicas que afetam a membrana celular; reação com fosfatos presentes nas superfícies da membrana celular, provocando extravasamento de compostos de baixo peso molecular como íons de potássio; inibição de enzimas como a adenosil-trifosfatase; formação e precipitação de complexos constituídos por fosfatos e componentes citoplasmáticos, alterando o funcionamento osmótico. Em baixas concentrações há perda rápida de constituintes citoplasmáticos e em altas concentrações causa um aspecto coagulado no citoplasma (2).

O ácido peracético é considerado esporicida, bactericida e fungicida mesmo em baixas concentrações e, ainda, se decompõem facilmente, sendo seguro para os produtos (59). Como vantagens verifica-se que é excelente sanitizante contra bactérias Gram positivas, Gram negativas, fungos filamentosos, leveduras, vírus e esporos bacterianos (2), não produz compostos tóxicos e carcinogênicos, possui baixo impacto ambiental e é eficaz contra biofilmes (76). No entanto, possui como desvantagens sua ação irritante para pele, liberação de vapores irritantes, odor pungente, incompatibilidade com cobre, ferro e alumínio e baixa estabilidade de estocagem (20). O mecanismo de ação do ácido peracético é pela oxidação de grupos sulfidrila das enzimas, pela interferência em processos metabólicos e na função quimiosmótica da membrana citoplasmática (2).

Os compostos de amônia quaternária são detergentes catiônicos sintéticos com atividade antimicrobiana e possuem boa estabilidade, solubilidade em água e toxicidade relativamente baixa (72), são eficientes em baixas concentrações contra bactérias, bolores, leveduras e vírus (36) e são largamente usados como antissépticos e desinfetantes devido à sua ação surfactante e à baixa toxicidade, além de seu poder microbiocida (59). É eficiente sobre bactérias Gram positivas e microrganismos termofílicos, mas apresentam baixa ação sobre bactérias Gram negativas, coliformes e psicrofílicos e são ineficientes contra esporos (2).

Sua ação bactericida é devido à inativação de enzimas responsáveis pelos processos de transformação de energia, à desnaturação das proteínas celulares e à ruptura da membrana celular (75), potencializado pela formação de filmes ou películas sobre as superfícies, com longo poder residual (91). Esta destruição das células bacterianas depende da concentração do desinfetante, da natureza e densidade da célula bacteriana, do tempo de contato, da temperatura do meio, do pH e da presença de matéria orgânica (60). O mecanismo de ação da amônia quaternária é pela interferência nas propriedades de permeabilidade da membrana celular, que leva ao extravasamento de metabólitos e pela interferência no metabolismo de proteínas, que causa a desnaturação proteica e inibição enzimática (2).

2.5 RESISTÊNCIA BACTERIANA

As doenças transmitidas por alimentos e a resistência aos antimicrobianos são questões internacionais de saúde. O comércio mundial de animais de produção e alimentos aumentou muito na última década e continuará crescendo, bem como os microrganismos resistentes aos antimicrobianos. Deste modo, os consumidores podem se infectar com patógenos resistentes tanto em seu país quanto em viagens internacionais (68).

A resistência microbiana pode ser conceituada como a habilidade de um microrganismo continuar a multiplicar-se ou persistir na presença de níveis terapêuticos de determinado agente antimicrobiano (5), sendo o principal efeito colateral do uso de antimicrobianos porque leva à seleção de bactérias resistentes, modificando a estrutura da população de comunidades bacterianas, levando a uma evolução acelerada com consequências imprevisíveis para a saúde humana (34).

A preocupação em relação a esta resistência é devido a três razões: o aumento da incidência de microrganismos exibindo resistência a antibióticos usados para fins terapêuticos em humanos e animais; uso de antimicrobianos como ferramenta primária para controlar a disseminação de infecções causadas por patógenos transmitidos por alimentos; e a evidência indicando que a tolerância aos antimicrobianos, sanitizantes e outros processos de preservação podem ser gerados dentro de microrganismos expostos ao stress (28).

A transferência de resistência microbiana dos animais para o homem é um tema de grande importância e as duas principais preocupações são a transferência dos microrganismos resistentes que podem causar uma infecção de difícil controle e a transferência dos genes de resistência dos microrganismos que acometem animais para os microrganismos que afetam humanos (5). Isto porque os antibióticos utilizados para fins terapêuticos possuem sítios alvo específico nas células bacterianas e o desenvolvimento de resistência a estes compostos é resultado de alterações nestes locais (28).

A utilização indiscriminada de antimicrobianos, tanto na avicultura comercial quanto no tratamento de pacientes acometidos por doenças alimentares acabam por selecionar cepas resistentes que contaminam outras aves e também comprometem o estado dos pacientes acometidos por DTAs (34). O uso de antimicrobianos na agricultura e em animais de produção contribui para o surgimento, persistência e propagação de bactérias resistentes, que podem ser transmitidas para os humanos pelos alimentos consumidos (68). E nas explorações

de frangos de corte são utilizados alguns antimicrobianos como promotores de crescimento, que são adicionados à ração em doses contínuas e subterapêuticas, gerando uma pressão seletiva que propicia o aparecimento de bactérias resistentes (53; 64).

Sempre que um animal é exposto a antimicrobianos, estes princípios ativos são transferidos aos produtos de origem animal e, se o consumidor ingerir estes produtos, os microrganismos existentes no ser humano podem também ficar resistentes a estes antibacterianos. Existe um certo grau de seletividade para populações bacterianas resistentes, que são resultantes do compartilhamento e transferência de genes de resistência entre microrganismos da microbiota normal e também para diferentes patógenos, e esta seleção depende do tipo de antimicrobiano utilizado, do número de indivíduos tratados, da dosagem e, ainda, da duração do tratamento (5; 51).

Devido às semelhanças, a utilização de agentes antimicrobianos em alimentos pode resultar no desenvolvimento de resistência adquirida a estes próprios compostos, ou resistência cruzada aos antibióticos utilizados na medicina humana (28). A resistência antimicrobiana de bactérias associadas a animais produtores de alimentos e a evidência de infecções humanas transmitidas por alimentos tem compelido a comunidade científica e os profissionais de saúde pública a reavaliar os critérios que permitam o uso de antimicrobianos tanto na agricultura quanto na produção de alimentos de origem animal (5).

A resistência a desinfetantes, mais comum em bactérias Gram negativas, é intrínseca e já foi estudada a possibilidade de resistência adquirida, mediada por plasmídeos (59). As condições que podem levar à resistência incluem a aplicação em concentrações sub-letais usadas erroneamente e também a neutralização do composto durante a utilização (28).

As maiores preocupações frente à resistência microbiana são: a crescente incidência de microrganismos que apresentam resistência a antibióticos utilizados para fins terapêuticos em medicina humana e animal, a crescente dependência a agentes microbianos e desinfetantes como principal ferramenta para controle do crescimento de patógenos em alimentos; e a evidência da tolerância aos antimicrobianos e desinfetantes gerados dentro dos microrganismos (28). Tem se destacado o aparecimento de novas *Salmonella* multirresistentes a antibióticos, o que constitui um grave problema de saúde pública em grande parte do mundo e que enfatiza a importância de programas de vigilância e controle eficientes (19).

2.6 FATORES DE VIRULÊNCIA

Os microrganismos patogênicos se distinguem de outros de mesma espécie por possuírem e expressarem genes que codificam fatores de virulência, isto é, fatores que propiciam a colonização e ocorrência de diversos eventos que subvertem a fisiologia hospedeira (89), e os chamados “fatores de virulência clássicos” são os plasmídeos, toxinas, fímbrias e flagelos (86). Também se destacam os sistemas de captação de ferro, os fatores que abalem as defesas do hospedeiro e também os genes que permitem a resistência às drogas antimicrobianas, sendo estes elementos adicionais ao arsenal de virulência das bactérias (89).

Para a maioria das bactérias patogênicas, a virulência é um processo multifatorial que exige duas classes gerais de determinantes: genes que participam dos processos fisiológicos necessários para sobrevivência nos ambientes hospedeiros e não-hospedeiros, encontrados em organismos patogênicos e não patogênicos, e uma segunda classe de genes de virulência que são únicos para os organismos patogênicos (41). Elas possuem genes responsáveis pela virulência que, quando expressados, determinam não somente a invasão bacteriana e a persistência e destruição das células hospedeiras, mas também a capacidade de sobrevivência em condições desfavoráveis (71).

A maioria dos fatores de virulência da *Salmonella* está codificada em genes agrupados em várias ilhas de patogenicidade no cromossomo bacteriano denominadas de SPI (*Salmonella* Patogenicity Islands) (89). As ilhas de patogenicidade são descritas como grandes elementos genéticos que apresentam propriedades diferentes do restante do genoma bacteriano e apresentam ao menos um gene associado à patogenicidade (89) e são três os fatores que determinam o papel da virulência das ilhas de patogenicidade: os genes dentro da ilha, o status do receptor do microrganismo e característica do hospedeiro que promove o progresso da doença (41).

As ilhas de patogenicidade constituem segmentos de DNA inseridos no cromossomo bacteriano, que atribuem uma variedade de características de virulência aos microrganismos que as possuem. Dentre as propriedades conferidas por estas ilhas de patogenicidade destacam-se a capacidade de aderir e invadir o epitélio da célula hospedeira, produzir toxinas, captar ferro do meio ambiente e sintetizar o sistema de secreção tipo III, que é um dispositivo molecular que permite a translocação de moléculas efetoras para o interior da célula hospedeira. A capacidade de adquirir propriedades patogênicas em um único evento genético permite evolução, bem como o surgimento de microrganismos patogênicos (89)

Fímbrias são polímeros de proteínas de superfície celular que atuam como mediadores de interações importantes para o hospedeiro e persistência ambiental, como desenvolvimento de biofilmes, motilidade, colonização e invasão das células, e conjugação (39), e as adesinas fimbriais mediam interações entre a bactéria e superfícies sólidas, incluindo a adesão nas células hospedeiras (33). Os flagelos desempenham importante papel nos estágios iniciais da adesão bacteriana por superar as forças repulsivas associadas com o substrato, não atuando como adesivos ou adsorventes (31). Os plasmídeos codificam para a resistência aos agentes antimicrobianos múltiplos, enquanto os biofilmes fornecem um mecanismo de seleção e promovem resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos (31). Já os plasmídeos conjugativos expressam fatores que favorecem o acesso das bactérias planctônicas a comunidades de biofilmes (37).

2.6.1 Genes

O método de detecção dos genes *hilA*, *avrA*, *invA*, *sivH*, *sopE*, *spiA*, *agfA*, *lpfA*, *sefA* e *spvC* utilizado neste trabalho foi a reação em cadeia pela polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), desenvolvida nos anos 80 por Kary Mullis, que recebeu o Prêmio Nobel em 1994. A descoberta da PCR trouxe enormes benefícios e desenvolvimentos científicos como o sequenciamento de genomas, a expressão de genes em sistemas recombinantes, o estudo de genética molecular, a determinação rápida da paternidade e o diagnóstico rápido de doenças infecciosas (16).

A PCR é o resultado de uma amplificação seletiva de uma região escolhida de uma molécula de DNA (15), possibilitando a síntese de fragmentos deste DNA, usando a enzima DNA-polimerase, que sintetiza uma sequência complementar de DNA, desde que um pequeno fragmento (o iniciador, ou *primer*, em inglês) que está ligado a uma das cadeias do DNA do ponto escolhido para início da síntese. Os iniciadores definem a sequência a ser replicada e o resultado obtido é a amplificação de uma determinada sequência DNA com bilhões de cópias (16).

O gene *hilA* é importante na patogenicidade da *Salmonella* pois é necessário para a colonização das bactérias no lúmen do intestino dos hospedeiros (67), codifica a secreção de proteínas relacionadas com a invasão celular (17), sendo um regulador no processo de invasão (48; 55) e regula os componentes do TNSS (14). É componente da Ilha de Patogenicidade 1 e

é importante na regulação no sistema de secreção tipo III, que codifica a secreção de proteínas relacionadas com a invasão celular (17).

A proteína AvrA é uma proteína do sistema de secreção da *Salmonella* entérica, que pode ajudar a garantir que a infecção por certos sorovares de *Salmonella* permaneça localizada em algum local específico, como o trato gastrointestinal, de hospedeiros selecionados, estando ausente nos sorovares Typhi e Choleraesuis, não descartando que AvrA desempenha um papel na virulência da *Salmonella* (43). O gene *avrA* possui como principais funções ser proteína efetora do TNSS, induzir a apoptose celular e inibir a produção de IL-8 e TNF- α (prejudicando a resposta inflamatória) (14).

O gene *invA* é bastante conservado em todos os sorovares de *Salmonella*, sendo o gene utilizado para detecção pela PCR (42; 70; 90) e 99,3% das cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas de surtos de salmoneloses em humanos apresentavam o gene em um estudo realizado por Zou et al. (92). Ele é um gene de invasão e possui como principal função a internalização da bactéria para invasão das células epiteliais (Borges, 2011; Oliveira et al, 2003; Malorni et al., 2003).

Em um estudo realizado por Kingsley et al. (49), a inativação do gene *sivH* resultou em deficiente colonização nas placas de Peyer do íleo terminal, mas colonização normal do ceco, linfonodos mesentéricos e baço, estando, então, diretamente ligado com a colonização da bactéria nas placas de Peyer, sendo responsável também pela eliminação da bactéria pelas fezes do hospedeiro (8).

O gene *sopE* estimula a deformação da membrana plasmática e citoesqueleto das células do hospedeiro, além de codificar a proteína externa SopE (14; 44; 65). Apenas um subconjunto de sorotipos de *Salmonella enterica* possuem o *sopE* e são associados aos causadores de epidemias e sua detecção pode ser relacionada com a capacidade da cepa de causar disseminação de epidemias devido a possíveis diferenças em seu potencial de invasão nas células hospedeiras (44).

O gene *spiA* está envolvido na formação do biofilme e também na virulência da *Salmonella* Enteritidis, sua eliminação não tem efeito na aderência e habilidade de invasão, mas pode resultar na fácil remoção por células hospedeiras e na formação deficiente do biofilme (30). Em experimentos com animais, sua perda contribuiu para a atenuação da virulência da *Salmonella* Pullorum em pintos de 1 dia (54).

Uma das principais funções da fimbria AgfA é a promoção da interação inicial da bactéria com o intestino do hospedeiro (82), além de estar relacionada com a autoagregação

da *Salmonella*, que aumenta a sua sobrevivência frente aos ácidos estomacais do hospedeiro (22; 23). O gene *agfA* possui como principais funções a autoagregação (maior sobrevivência), interação entre a *Salmonella* e o intestino e formação de biofilmes (14).

O operon *lpfABCDE*, um operon fimbrial da *Salmonella* Typhimurium, está envolvido com a aderência da bactéria no intestino delgado e esta adesão resulta apenas para determinadas áreas do trato gastrointestinal levando o agente patogênico para sua porta de entrada principal – as Placas de Peyer do íleo (9). Como principais funções do gene *lpfA* estão a adesão às células M do intestino, favorecimento do tropismo pelas Placas de Peyer e conferir imunidade cruzada entre os sorovares (14).

Em um estudo realizado por Zou, et al. (92), foi observado que o gene *sefA* estava presente em 99,3% das cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas de salmoneloses humanas. Este gene possui como funções melhor interação entre bactéria e macrófagos e atuação em conjunto com outras fimbrias (14).

Com relação ao gene *spvC*, Zou et al. (92) verificaram sua presença em 91,3% das cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas de surto de salmoneloses humanas, mas os genes *spv* não são alvos adequados para a detecção específica do sorotipo Enteritidis (70) e ele não desempenha um papel crítico no estabelecimento da gastroenterite típica causada por salmonelas em seres humanos (83). De acordo com Borges (14), as funções do gene *spvC* são afetar a interação do sistema imune do hospedeiro e o aumento da taxa de crescimento da bactéria.

3. CAPÍTULO 1

***Salmonella* Enteritidis formers biofilms are multiresistant to antibiotics**

Carla Ferreira da Silva^{1*}, Sara Souza Gehlen², Bruna Webber¹, Luísa Neukamp Diedrich¹,
Luciana Ruschel dos Santos¹, Fernando Pilotto¹, Eduardo Cesar Tondo³, Vladimir
Nascimento², Laura Beatriz Rodrigues¹

(Artigo submetido para a *Acta Scientiae Veterinariae*)

¹Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Passo Fundo (UPF), Passo Fundo, RS, Brasil.

²Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

³ Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil

*Autor para correspondência: carlaa.ferreira@yahoo.com.br

ABSTRACT

Background: The *Salmonella* Enteritidis is one of the most isolated pathogens in outbreaks of foodborne illness, which can occur due to various factors such as cooking temperature, inadequate storage and cross-contamination. The choice of the appropriate disinfectant in food industries is essential to prevent the spread of contamination and control of biofilms on surfaces. It is also extremely important the concern with resistance to antimicrobials used both as growth promoters and in human and animal treatments, which may generate a selective pressure favoring the emergence of resistant bacteria.

Materials, Methods & Results: Twenty samples of *Salmonella* Enteritidis were tested, 10 from outbreaks of foodborne diseases and 10 of poultry origin, as for the formation of biofilms, antibiotic resistance and sanitizers. The samples were stored frozen in BHI with 20% glycerol. For reactivation were incubated in BHI broth, plated on XLD agar and subsequently performed biochemical tests to check purity. Firstly were evaluated for biofilm formation on polystyrene at temperature of $36 \pm 1^\circ\text{C}$. We tested the sanitizing resistance to biguanide concentrations 0.6%, 1.0% and 1.5%, peracetic acid at concentrations 0.1%, 0.5% and 1.0%, and quaternary ammonia at concentrations of 0, 3%, 1.0% and 2.0%. For tests of antimicrobial resistance the cultures were evaluated front 10 μg ampicillin, 30 μg cephalixin, 30 μg chloramphenicol, 5 μg enrofloxacin, 15 μg erythromycin, 30 μg neomycin, 25 μg sulphazotrim, 300 μg sulfonamides. According to the results, 25% of samples were strongly biofilm formers, 35% moderately formers, 35% weakly formers and 10% not biofilm formers. In sanitizers, quaternary ammonia and peracetic acid were effective at all concentrations and at all times, but tests with biguanide resulted in resistance in the time of 1 min at concentrations 0.6%, 1.0% and 1.5%, at time 5 min at concentrations of 1.0% and 1.5% and at time 10 min at concentrations of 0.6% and 1.0%. As for antimicrobial susceptibility testing, 10 samples of *S. Enteritidis* presented pattern of multidrug resistance to the antibiotics tested.

In relation to the active principles, 25% of *S. Enteritidis* were resistant to ampicillin, 5% to cephalexin, 55% to enrofloxacin, 90% to erythromycin, 80% to neomycin, 5% to sulphazotrim, 70% to sulfonamides. There was 100% sensitivity to chloramphenicol.

Discussion: All *S. Enteritidis* from outbreaks of foodborne diseases and 80% of *S. Enteritidis* from poultry products produced biofilm. Regarding *S. Enteritidis* outbreaks of foodborne illness, 30% were strongly biofilm formers, 50% moderately former and 20% poorly formers. Those isolated from poultry products were 10% strongly formers, 10% moderately formers and 60% poorly formers. Besides the formation of biofilms, 50% of *S. Enteritidis* were multiresistant to antimicrobials been tested, and of these, 35% corresponded to *S. Enteritidis* isolates from outbreaks of foodborne illness and only 15% were of poultry origin. Still, 50% of *Salmonella* Enteritidis were also resistant to biguanide, of which 30% were *S. Enteritidis* isolates from outbreaks of foodborne illness and 20% isolated from poultry products. These results denotes great relevance due to the possibility of permanence of these microorganisms in food manipulation environments in the form of biofilms and, in the case of transmission to humans, present more difficulty in treatment due to the multidrug resistance.

Keywords: *Salmonella* Enteritidis, biofilms, multidrug resistance, antimicrobials, sanitizers.

Descritores: *Salmonella* Enteritidis, biofilmes, multirresistência, antimicrobianos, sanitizantes.

INTRODUÇÃO

Salmonella Enteritidis é frequentemente relacionada a surtos de origem alimentar associados ao consumo de carne de aves e ovos e prejuízos econômicos em vários países [17,26,27]. No Brasil, entre 2000 e 2013, *Salmonella* spp. foi o agente etiológico de 1522 surtos de DTA [1] e, nos Estados Unidos, juntamente com *Campylobacter*, originaram mais de 2,5 milhões de casos com milhares de internações e centenas de mortes [13,19].

A formação de biofilmes por *Salmonella* em superfícies de contato com alimentos contribui para infecções alimentares e a contaminação dos alimentos pode ocorrer pelo controle inadequado das temperaturas de armazenagem e distribuição, falhas de boas práticas na manipulação ou contaminação cruzada, relacionada com a capacidade de adesão destas bactérias [5,20]. A escolha do sanitizante apropriado nas indústrias de alimentos é primordial para evitar a disseminação desta contaminação, sendo utilizado para reduzir o número de microrganismos alvo em superfícies de contato com alimentos [7].

Na produção de frangos de corte são utilizados alguns antimicrobianos como promotores de crescimento adicionados à ração em doses contínuas e subterapêuticas, gerando uma pressão seletiva e bactérias resistentes [15,18]. A resistência antimicrobiana é o principal efeito colateral desta prática, selecionando bactérias resistentes, modificando a estrutura de comunidades bacterianas e induzindo uma evolução acelerada com consequências imprevisíveis para a saúde humana [8].

Neste trabalho, foram testadas 20 amostras de *S. Enteritidis* (10 oriundas de infecções alimentares e 10 de origem avícola) quanto à formação de biofilmes, resistência a sanitizantes e a antimicrobianos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os testes de avaliação da formação de biofilmes, sensibilidade aos sanitizantes e aos antimicrobianos foram realizados no Laboratório de Bacteriologia e Micologia Veterinária do Hospital Veterinário da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (FAMV/UPF).

Amostras de *Salmonella* Enteritidis

Foram analisadas 20 amostras de *Salmonella* Enteritidis previamente isoladas entre 2006 e 2009, sendo 10 provenientes de surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA),

originadas de alimentos envolvidos em surtos e coprocultura de casos clínicos, e outras 10 amostras de origem avícola não envolvidas em surtos, originadas de amostras ambientais (*swabs* de arrasto) e cortes de aves diretamente do abatedouro. O controle positivo utilizado foi *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076.

As amostras estavam estocadas em caldo *Brain-Heart Infusion* (BHI)¹ acrescido com 20% de glicerol² e congeladas a -20°C, e foram reativadas utilizando caldo BHI¹, incubado a 36 ± 1°C por 18 a 24 h, posteriormente semeadas em Ágar Xilose-Lisina Desoxicolato (XLD)¹ e incubadas a 36 ± 1°C. Depois de 24 h foi observado o padrão de colônias para avaliar se eram compatíveis com *Salmonella* spp., confirmadas com testes bioquímicos.

Formação de biofilmes

A habilidade das amostras formarem biofilme foi avaliada pela técnica descrita por Rodrigues *et al.* [23]. Para tanto, uma alçada das culturas foram transferidas para caldo TSB sem glicose³ para incubação a 36 ± 1°C por 24 h. Em seguida, alíquotas das culturas foram adicionadas em caldo TSB sem glicose³ não inoculados até atingir a escala 1 de MacFarland⁴. Posteriormente, 200 µL de cada suspensão bacteriana foram inoculados, em triplicata, em poços de placas de microtitulação de poliestireno de 96 cavidades estéreis com fundo plano⁵. Os controles negativos foram poços com caldos TSB sem glicose³, em triplicata, não inoculados. Foram repetidos os mesmos procedimentos em placas independentes que foram incubadas por 24 h. Após a incubação, a suspensão bacteriana foi aspirada de cada poço, lavada 3 vezes com 250 µL de solução de cloreto de sódio a 0,9% estéril⁶, secando-se levemente a placa. Em seguida, as células bacterianas foram fixadas com 200 µL de metanol p.a.² por 15 min. Após, o metanol foi removido e as placas secas em temperatura ambiente, depois coradas com 200 µL de cristal violeta de Hucker 2%² durante cinco min. Após serem coradas, as microplacas⁵ foram lavadas em água corrente e secas a temperatura ambiente. Após foi realizada a leitura da absorbância em leitor de ELISA⁷ a 550 nm.

O valor da densidade óptica de cada amostra (Doa) foi obtido pela média aritmética da absorvância dos três poços e este valor foi comparado com a média da absorvância dos controles negativos (Docn). Para determinar o grau de formação de biofilme foi utilizada a seguinte classificação: não formadora de biofilme ($Doa \leq Docn$), fracamente formadora de biofilme ($Docn < Doa \leq 2.Docn$), moderadamente formadora de biofilme ($2.Docn < Doa \leq 4.Docn$) e fortemente formadora de biofilme ($4.Docn < Doa$).

Resistência aos sanitizantes

Foi avaliada a resistência das 20 *S. Enteritidis* frente aos sanitizantes amônia quaternária⁸, ácido peracético⁸ e biguanida⁸. Após a obtenção de colônias testes puras, foram incubadas individualmente em caldo BHI¹ a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 h para iniciar os testes dos sanitizantes.

O cloridrato de polihexametileno de biguanida⁸ foi testado nas concentrações 0,6%, 1,0% e 1,5%, o quaternário de amônio⁸ nas concentrações 0,3%, 1,0% e 2,0% e o ácido peracético⁸ nas concentrações 0,1%, 0,5% e 1,0%. Para obtenção da matéria orgânica a ser utilizada como interferente foi preparado um caldo de carne de frango estéril, autoclavado a 121°C por 45 min, obtendo-se 430 mg de matéria orgânica por mL do caldo pronto.

Foram feitas diluições decimais de cada cultura teste até 10^{-8} em 9 mL de água peptonada 0,1%¹, e realizada inoculação em superfície de ágar PCA¹ de 100 μL das diluições 10^{-5} a 10^{-8} , homogeneizadas com alça de Drigalsky, para quantificação do inóculo, incubados por 48 h a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ para realização da contagem do número de colônias.

Em um tubo com 9 mL do desinfetante na concentração a ser testada, foi adicionado 1 mL de matéria orgânica na diluição de 10^{-3} , com concentração final de 0,43 mg/mL, acrescentado 100 μL da suspensão bacteriana na diluição 10^{-2} , realizada homogeneização em vórtex⁹ e cronometrados os tempos de 1, 5, 10 e 15 min exatamente a partir do momento da inoculação. Em cada um dos tempos determinados foi inoculado 10 μL da solução teste com a

amostra em um tubo de 5 mL de DE neutralizing³ + Tween 80². As amostras foram incubadas por 96 h a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Foram considerados positivos os tubos com turvação, formação de película na superfície ou de precipitado no fundo.

Resistência aos antimicrobianos

As culturas bacterianas foram semeadas em Agar Muller Hinton¹⁰, incubadas por 24 h e testadas pela técnica de disco-difusão [6] frente aos seguintes princípios ativos: Ampicilina $10 \mu\text{g}^{11}$; Cefalexina $30 \mu\text{g}^{12}$; Cloranfenicol $30 \mu\text{g}^{12}$, Enrofloxacin $5 \mu\text{g}^{12}$, Eritromicina $15 \mu\text{g}^{13}$, Neomicina $30 \mu\text{g}^{12}$, Sulfazotrim $25 \mu\text{g}^{11}$ e Sulfonamidas $300 \mu\text{g}^{12}$.

Para tanto, as *S. Enteritidis* em colônias puras foram incubadas em caldo BHI¹ a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 16 a 18 h. Uma suspensão equivalente a escala 0,5 de MacFarland⁴ foi obtida por diluição em caldo BHI¹ e utilizada para inoculação das bactérias-teste em Agar Mueller-Hinton¹⁰. Após incubação a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ por 16 a 18 h foi realizada a leitura e interpretação dos halos de inibição conforme tabela específica. Utilizou-se o critério para multirresistência aos fármacos do *National Antimicrobial Resistance Monitoring System* [19] que cita multirresistência como a resistência a três ou mais classes de antimicrobianos e também por fenótipos específicos.

RESULTADOS

Nos testes para verificação da formação de biofilmes, 25% das amostras foram fortemente formadoras de biofilme, 35% moderadamente formadoras ou fracamente formadoras e 10% não formadoras de biofilme (Tabela 1).

Nos resultados referentes aos testes com sanitizantes, a amônia quaternária e o ácido peracético foram eficientes em todas as concentrações e em todos os tempos testados. Entretanto, os testes com a biguanida resultaram em resistência no tempo de 1 min nas concentrações 0,6%, 1,0% e 1,5%, no tempo de 5 min nas concentrações 1,0% e 1,5%, e no

tempo de 10 min nas concentrações 0,6% e 1,0%. As amostras de *S. Enteritidis* que apresentaram resistência à biguanida estão descritas na Tabela 1.

Quanto aos testes de sensibilidade a antimicrobianos, 10 amostras de *S. Enteritidis* apresentaram padrão de multirresistência aos antibacterianos testados, conforme Tabela 2.

Em relação aos princípios ativos, as 20 *S. Enteritidis* estudadas foram 90% resistentes à eritromicina, 80% à neomicina 70% às sulfonamidas, 55% à enrofloxacina, 25% à ampicilina, 5% à cefalexina e 5% à sulfazotrim. Houve 100% de sensibilidade ao cloranfenicol (Figura 1).

A comparação da resistência aos antimicrobianos pelas amostras isoladas de surtos e de origem avícola está demonstrada na Tabela 3.

DISCUSSÃO

Os biofilmes em indústrias alimentícias são importantes quanto à sua formação em alimentos, utensílios e superfícies, à sua dificuldade de remoção e, ainda, por seu potencial como fonte crônica de contaminação microbiana, podendo transmitir doenças, além de aumentar a resistência à limpeza e sanitização [9,24,25].

Rodrigues *et al.* [23] avaliaram a formação de biofilme por *Salmonella* Heidelberg provenientes de carcaças de frango e “swabs” de cloaca, em poliestireno, cultivados em caldo TSB sem glicose e suplementados com glicose até 4%. Todas *S. Heidelberg* testadas com TSB sem glicose formaram biofilme, obtendo-se amostras fortemente formadoras de biofilme, resultado compatível com o obtido pelas *S. Enteritidis* avaliadas neste experimento.

A sensibilidade das bactérias aos sanitizantes de uso comum em indústrias de alimentos, quando estas compõem um biofilme, muitas vezes difere da encontrada em testes com células planctônicas. A formação de biofilmes por *Salmonella* em aço inoxidável, plástico e cimento foi avaliada e a ação de sanitizantes frente a estes biofilmes e células

planctônicas, havendo grande diferença entre os resultados obtidos, com o biofilme apresentando uma resistência muito maior [10].

As *S. Enteritidis* analisadas neste estudo demonstraram resistência somente à biguanida. As condições que podem levar a resistência incluem a aplicação em concentrações sub-letais e também neutralização do composto durante a utilização [7]. A resistência combinada a desinfetantes e antimicrobianos, carregada por um mesmo grupo de genes, seria esperada [12]. As salmonelas apresentam grande resistência frente à amônia quaternária, que é amplamente utilizada na avicultura [14], mas, em nosso estudo, a amônia quaternária foi eficiente nas amostras testadas.

Do ponto de vista econômico, as infecções causadas por microrganismos multirresistentes são preocupação constante devido ao manejo terapêutico representar um aumento substancial para os sistemas de saúde. Sabe-se que as bactérias multirresistentes causam maiores danos aos pacientes do que cepas susceptíveis da mesma espécie [2].

Ke *et al.* [11] avaliaram a resistência bacteriana em 1764 *Salmonella enterica* isoladas de pacientes com diarreia coletadas em cinco cidades da China e verificou alta resistência à múltiplas drogas, e apenas 9,97% dos isolados foram sensíveis a todos os agentes testados.

Na União Europeia, a ocorrência de resistência em *Salmonella* em casos isolados de salmonelose em humanos foi alta para ampicilina e sulfonamidas com altos níveis de resistência a múltiplas drogas observada em alguns países [8]. Nas *S. Enteritidis* avaliadas em nosso estudo, a resistência frente às sulfonamidas também foi alta, sendo maior nos isolados de doenças transmitidas por alimentos, já a resistência à ampicilina foi baixa, porém apenas uma amostra de *S. Enteritidis* de origem avícola foi resistente à ampicilina, e as demais resistentes foram isoladas de surtos, concordando com o estudo da EFSA.

Um estudo com 100 amostras de *Salmonella* realizado em Cuba encontrou 22,7% dos isolados resistentes à ampicilina [21]. Amostras de *Salmonella* isoladas na China também se

mostraram altamente resistentes a este antimicrobiano [16]. No nosso estudo, a resistência à ampicilina foi alta nas amostras isoladas de surto (40%), entretanto, todas as amostras isoladas de origem avícola foram sensíveis a este antimicrobiano.

Uma pesquisa realizada com *S. Enteritidis* isoladas de carcaças de frango no período de maio de 1995 e abril de 1996 no Rio Grande do Sul constatou que 100% das amostras avaliadas foram resistentes à eritromicina, 3,75% foram resistentes à enrofloxacin, 3,75% foram resistentes à neomicina e 86,25% foram resistentes à sulfonamida [4]. Nas 20 amostras avaliadas em nosso estudo, 100% das isoladas de surtos de doenças transmitidas por alimentos foram resistentes à eritromicina e 80% das isoladas de origem avícola, concordando com a alta resistência obtida por Cardoso *et al.* [4]. Entretanto, a resistência frente à enrofloxacin foi de 50% nas amostras de surtos e 20% nas de origem avícola. Quanto à resistência à neomicina, 70% das amostras de surto e 60% das isoladas de origem avícola foram resistentes a este antimicrobiano. A resistência encontrada para sulfonamidas foi alta, assim como no estudo citado anteriormente [4], onde encontramos 90% das amostras de surtos e 30% das isoladas de origem avícola resistentes a este antimicrobiano.

Este estudo teve 100% das amostras sensíveis ao cloranfenicol, sendo condizente com a Instrução Normativa 9 de 27 de junho de 2003 que proíbe o seu uso, diferente do que foi encontrado em amostras de *Salmonella* isoladas na Colômbia, onde 34% foram resistentes ao cloranfenicol [13]. No Brasil é proibida a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso do cloranfenicol [3].

Em um trabalho com amostras de *Salmonella* spp. isoladas de carcaças suínas identificou 66,7% de resistência a um ou mais princípios ativos, 33,3% de resistência intermediária e 23,3% de amostras multirresistentes (resistentes a pelo menos três antimicrobianos), sendo 16,7% ao cloranfenicol [22].

Dentre as 20 *S. Enteritidis* estudadas, 10 foram multirresistentes a antimicrobianos e também foram formadoras de biofilmes. Esta resistência é importante, pois, se as bactérias sobreviverem à higienização das indústrias e contaminarem os alimentos, podem ocasionar surtos de infecção de origem alimentar, mas os antimicrobianos utilizados podem não ser eficientes.

CONCLUSÃO

Estes resultados denotam grande relevância devido à possibilidade da *S. Enteritidis* permanecer em ambientes de manipulação de alimentos na forma de biofilmes e, em caso de transmissão para seres humanos, apresentar maior dificuldade de tratamento devido a multirresistência a antimicrobianos.

SOURCES AND MANUFACTURERS

¹HiMedia[®] Laboratories. Mumbai, Índia.

²Vetec[®] Química Fina Ltda. Rio de Janeiro, Brazil.

³Difco[®] Microbiologia. Sparks, USA.

⁴Escala de MacFarland[®] Nefelobac, Probac do Brasil. São Paulo, Brazil.

⁵Cral artigos para laboratório Ltda. Cotia, Brazil.

⁶Synth[®] Labsynth Produtos para Laboratório Ltda. Diadema, São Paulo, Brazil.

⁷Rosys Anthos 2010[®], Anthos Labtec Instruments. Salzburg, Áustria.

⁸Kalykim[®]. Alvorada, RS, Brazil.

⁹Biomixer[®] Equipamentos Laboratoriais. Ribeirão Preto, SP, Brazil.

¹⁰Oxoid[®] Microbiology Products. Hampshire, United Kingdom.

¹¹Laborclin[®] Produtos para Laboratório Ltda. Pinhais, Paraná, Brazil.

¹²BBL[™] Sensi-Disc[™] Susceptibility Test Discs. New Jersey, United States.

¹³Cefar[®] Diagnóstica Ltda, Sensifar e Multifar. São Paulo, SP, Brazil.

Acknowledgements. The authors wish to acknowledge the FAPERGS (Edital 001/2013 GR, Project: 1997-2551/13) for the financial support and scholarship for conducting this study, and the scholarship provided by CAPES/PROSUP/UPF.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

- 1 **Alves R. 2013.** Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos. Disponível em:
<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&ved=0CC0QFjAC&url=http%3A%2F%2Fwww2.camara.leg.br%2Fatividade-legislativa%2Fcomissoes%2Fcomissoes-permanentes%2Fcmads%2Faudiencias-publicas%2Faudiencia-publica-2013%2Fcrueldade-a-que-os-animais-de-producao-sao-expostos-em-abatedouros-municipais%2Fapresentacoes%2Fapresentacao-da-sra-rejane-alves%2Fview&ei=fNO_U_CAJqbesATMuYLwBw&usg=AFQjCNGn4M1nEY-6xwcIS5G0L_uwpQfgvg>. Acessado em 07/2014.
- 2 **Balsalobre L.C., Dropa M. & Matté M.H. 2014.** An overview of antimicrobial resistance and its public health significance. *Brazilian Journal of Microbiology*. 45(1): 1-5.
- 3 **Brasil. 2003.** Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), Secretaria de Defesa Agropecuária. *Proibição da Comercialização e manipulação de cloranfenicol e nitrofuranos*. Instrução Normativa número 9, de 27 de junho de 2003.

- 4 **Cardoso M.O., Ribeiro A.R., Santos L.R., Pilotto F., Moraes H.L.S., Salle C.T.P., Rocha S.L.S. & Nascimento V.P. 2006.** Antibiotic resistance in *Salmonella* Enteritidis isolated from broiler carcasses. *Brazilian Journal Microbiology*. 37(3): 368-371.
- 5 **Carpentier B. 1997.** Sanitary quality of meat chopping board surfaces: a bibliographical study. *Food Microbiology*. 14(1): 31-37.
- 6 **Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). 2012.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-second information supplement M100-S22. CLSI, Wayne, PA, USA.
- 7 **Davidson P.M. & Harrison M.A. 2002.** Resistance and Adaptation to Food Antimicrobials, Sanitizers, and Other Process Controls. *Food Technology*. 56(11): 69-78.
- 8 **European Food Safety Authority (EFSA) & European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 2014.** The European Union Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2012. *EFSA Journal*. 12(3): 3590, 336 pp. [doi:10.2903/j.efsa.2014.3590].
- 9 **Jessen B. & Lammert L. 2003.** Biofilm and disinfection in meat processing plants. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 51(4): 265-269.
- 10 **Joseph B., Otta S.K. & Karunasagar I. 2001.** Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*. 64(3): 367-372.
- 11 **Ke B., Sun J., He D., Li X., Liang Z. & Ke C. 2014.** Serovar distribution, antimicrobial resistance profiles, and PFGE typing of *Salmonella enterica* strains isolated from 2007-2012 in Guandong, China. *BMC Infectious Diseases*. 14:338. [doi:10.1186/1471-2334-14-338]
- 12 **Kich J.D., Borowsky L.M., Silva V.S., Ramenzoni M., Triques N., Koller F.L. & Cardoso M.R.I. 2004.** Avaliação da atividade antibacteriana de seis desinfetantes

- comerciais frente a amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 32(1): 33-39.
- 13 Landínez M.P. 2013.** Ribotificação de sequências intergênicas de isolados de *Salmonella* *enterica* subespécie *enterica* provenientes de produtos avícolas do Brasil e da Colômbia. 186 f. Porto Alegre, RS. Dissertação (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 14 Leite C.R.C. 2002.** Desinfecção química aplicada na avicultura: concentrações inibitórias mínimas de desinfetantes derivados da amônia quaternária e hipoclorito de sódio sobre *Salmonella* sp. e *Escherichia coli*. *Acta Scientiae Veterinariae*. 30(1): 74-75.
- 15 Levy D.D., Sharma B. & Cebula T.A. 2004.** Single-nucleotide polymorphism mutation spectra and resistance to quinolones in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis with a mutator phenotype. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48(7): 2355-2363.
- 16 Lu Y., Zhao H., Sun J., Liu Y., Zhou X., Beier R.C., Wu G. & Hou X. 2014.** Characterization of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* serovars Indiana and Enteritidis from chickens in Eastern China. *PLoS ONE*. 9(5). [doi:10.1371/journal.pone.0096050].
- 17 Mead G.C. 1989.** Hygienic problems and control of process contamination, In: Mead G.C. *Processing of poultry*. Elsevier; New York. 360-368.
- 18 Miriagou V., Carattoli A. & Fanning S. 2006.** Antimicrobial resistance islands: resistance gene clusters in *Salmonella* chromosome and plasmids. *Microbes Infect.* 8(7): 1923-1930.
- 19 National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS). 2012.** "Strategic Plan 2012-2016". Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance>

- /NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/UCM236283.pdf>. Acessado em 05/2014.
- 20 Parizzi S.Q.F., Andrade N.J., Silva C.A.S, Soares N.F.F. & Silva E.A.M. 2004.** Bacterial adherence to different inert surfaces evaluated by epifluorescence microscopy and plate count method. *Brazilian archives of biology and technology*. 47(1): 77-83.
- 21 Peña Y.P., Hernández M.E., Castillo V.L., López N.A., Díaz M.M. & Rodríguez P.S. 2011.** Serovariedades y patrones de susceptibilidad a los antimicrobianos de cepas de *Salmonella* aisladas de alimentos en Cuba. *Rev Panam Salud Publica*. 30(6): 561–565.
- 22 Rizzo N.N., Rodrigues L.B., Santos L.R. & Nascimento V.P. 2006.** Perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Salmonella* isoladas de carne suína. In: *Resumos da XVI Mostra de Iniciação Científica da Universidade de Passo Fundo* (Passo Fundo, Brasil). 1 CD-ROM.
- 23 Rodrigues L.B., Santos L.R., Rizzo N.N., Tagliari V.Z., Oliveira A.P., Trenhago G., Rodegheri S.C., Taglieti R.M., Dickel E.L. & Nascimento V.P. 2009.** Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola. *Acta Scientiae Veterinariae*. 37(3): 225-230.
- 24 Steenackers H., Hermans K., Vanderleyden J. & Keersmaecker S.C.J. 2012.** *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Research International*. 45(2): 502–531.
- 25 Stepanovick S., Cirkovic I., Ranin L. & Svabic-Vlahovic M. 2004.** Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surfasse. *Letters in Applied Microbiology*. 38(5): 428-432.
- 26 Wagner V.R., Silveira J.B. & Tondo E.C. 2013.** Salmoneloses in the State of Rio Grande do Sul, southern Brazil, 2002 to 2004. *Brazilian Journal of Microbiology*. 44(3): 723-729.

27 WHO - World Health Organization. Global Salm-Surv (GSS) Country databank.

Disponível em: <http://thor.dfvf.dk/pls/portal/GSS.COUNTRY_DATA_SET_REP.show>.

Acessado em 02/2014.

Legendas e Notas de Rodapé das Tabelas e Figuras:

Tabela 1. Formação de biofilmes, perfil de resistência a antimicrobianos e resistência a biguanida de *Salmonella* Enteritidis isoladas de surtos de doenças transmitidas por alimentos e de origem avícola.

Amostra	Origem	Formação de biofilmes	Perfil de resistência aos antimicrobianos	Resistência à biguanida
SE09	Surto DTA	Moderada	P8	R
SE10	Surto DTA	Moderada	P1*	R
SE24	Surto DTA	Forte	P1*	R
SE29	Surto DTA	Moderada	P2*	R
SE36	Surto DTA	Forte	P2*	R
SE41	Surto DTA	Forte	P7	R
SE59	Surto DTA	Moderada	P7	S
SE65	Surto DTA	Moderada	P3*	S
SE72	Surto DTA	Fraca	P1*	S
SE75	Surto DTA	Fraca	P4*	S
SE82	Avícola	Não formadora	P6	S
SE84	Avícola	Fraca	P8	S
SE85	Avícola	Fraca	P6	S
SE88	Avícola	Fraca	P3*	S
SE90	Avícola	Moderada	P6	S
SE106	Avícola	Fraca	P4*	S
SE111	Avícola	Forte	P9	R
SE114	Avícola	Fraca	P5*	R
SE163	Avícola	Não formadora	P10	R
SE170	Avícola	Fraca	P7	R

**Salmonella* Enteritidis multirresistente

Tabela 2. Distribuição do padrão de resistência a antimicrobianos de 20 isolados de *Salmonella* Enteritidis oriundos de surtos de DTA e de origem avícola.

Padrão de resistência aos antimicrobianos	Número de amostras	Perfil de resistência
Amp, Enro, Eri, Neo, SFN	3	1
Enro, Eri, Neo, SFN	2	2
Amp, Eri, Neo, SFN	2	3
Eri, Neo, SFN	2	4
Enro, Eri, SZT	1	5
Eri, Neo	3	6
Eri, SFN	3	7
Eri	2	8
Enro	1	9
Neo	1	10

Amp = Ampicilina 10 µg, Cef = Cefalexina 30 µg, Clo = Cloranfenicol 30 µg, Enro = Enrofloxacina 5 µg, Eri = Eritromicina 15 µg, Neo = Neomicina 30 µg, SZT = Sulfazotrim 25 µg, SFN = Sulfonamidas 300 µg.

Figura 1. Perfil da sensibilidade aos antimicrobianos das 20 cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas de surtos de DTA e de origem avícola.

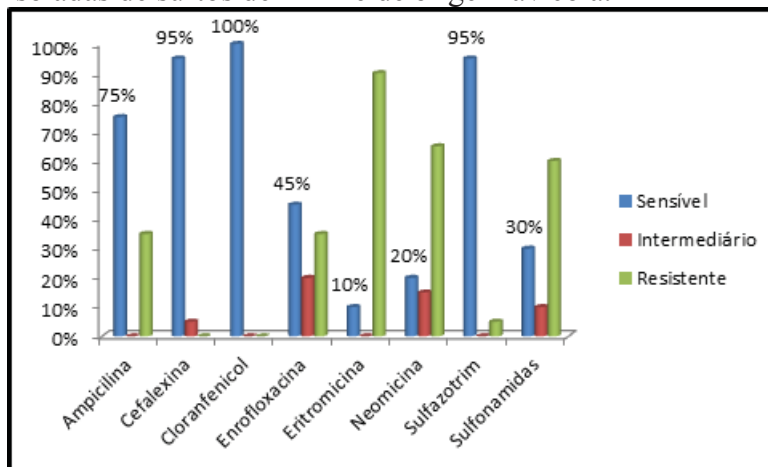


Tabela 3. Comparação da resistência aos antimicrobianos das *Salmonella* Enteritidis isoladas de surtos de doenças transmitidas por alimentos

Princípios ativos	Total	Isolados de surto		Isolados de origem avícola	
		n	%	n	%
Ampicilina 10 µg	20	10	40%	10	0%
Cefalexina 30 µg	20	10	0%	10	0%
Cloranfenicol 30 µg	20	10	0%	10	0%
Enrofloxacina 5 µg	20	10	50%	10	20%
Eritromicina 15 µg	20	10	100%	10	80%
Neomicina 30 µg	20	10	70%	10	60%
Sulfazotrim 25 µg	20	10	0%	10	10%
Sulfonamidas 300 µg	20	10	90%	10	30%



Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Veterinária
Acta Scientiae Veterinariae
ISSN 1679-9216 (on line)

Fax: +55 51 3308-7305
Phone: +55 51 3308-6964

e-mail: laerte.ferreiro@ufrgs.br
<http://www.ufrgs.br/actavet/>



RECEBIMENTO DE ARTIGO

Porto Alegre, 24 de julho de 2014.

Senhor(a) autor(a)

Autores: Carla Ferreira da Silva, Sara Souza Gehlen, Bruna Webber, Luísa Neukamp Diedrich, Luciana Ruschel dos Santos, Fernando Pilotto, Eduardo César Tondo, Vladimir Pinheiro do Nascimento & Laura Beatriz Rodrigues

Título do Trabalho: *Salmonella* Enteritidis formers biofilms are multiresistant to antibiotics.

O referido trabalho foi recebido para análise e está protocolado como ASV 179-2014.

Atenciosamente,

Laerte Ferreiro
Editor – ASV

4. CAPÍTULO 2

Genes associados à virulência em *Salmonella* Enteritidis isoladas de surtos de doenças transmitidas por alimentos e de origem avícola

Carla Ferreira da Silva^{1*}, Luciana Ruschel dos Santos², Rafael Frandoloso², Sara Souza Gehlen³, Karen A. Borges⁴, Eduardo Cesar Tondo⁵, Anderlise Borsoi⁶, Vladimir Nascimento⁵,
Laura Beatriz Rodrigues²

(Artigo a ser submetido para a *Brazilian Journal of Microbiology*)

¹Mestranda no Programa de Pós Graduação em Bioexperimentação da Universidade de Passo Fundo

²Docentes no Programa de Pós Graduação em Bioexperimentação da Universidade de Passo Fundo

³Mestranda no Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

⁴Doutoranda no Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

⁵Docentes na Universidade Federal do Rio Grande do Sul

⁶Tuiuti Universidade do Paraná

*Autor para correspondência: carlaa.ferreira@yahoo.com.br

RESUMO

Com a avicultura brasileira em franca expansão, é natural o aumento do consumo de ovos e carne de frango pelas pessoas. Um dos patógenos mais comumente isolados destes alimentos é a *Salmonella* spp., uma bactéria frequentemente causadora de surtos de doenças transmitidas por alimentos, sendo a *Salmonella* Enteritidis o mais prevalente e o mais isolado em surtos de salmoneloses no Brasil e também no Rio Grande do Sul. O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de dez genes (*hilA*, *avrA*, *invA*, *sivH*, *sopE*, *spiA*, *agfA*, *lpfA*, *sefA* e *spvC*) associados à virulência em *S. Enteritidis* formadoras de biofilmes, previamente isoladas de surtos de doenças transmitidas por alimentos e de materiais de origem avícola. Os genes *hilA*, *avrA*, *invA*, *sopE*, *spiA*, *agfA*, *lpfA*, *sefA* e *spvC* estiveram presentes em 100% das amostras, independente da origem. O gene *sivH* esteve presente em 89% das *S. Enteritidis*, estando ausente em duas amostras, uma isolada de salada de batata com maionese, causadora de surto, e outra de peito de frango coletado diretamente do abatedouro. Mesmo todas as amostras sendo de *S. Enteritidis* houve variação no perfil genético, sendo o perfil 1 o mais prevalente, com 16 amostras possuidoras de todos os genes.

Palavras chave: *Salmonella* Enteritidis, genes, virulência.

INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira responde a 1,5% do Produto Interno Bruto Nacional, atingindo, em 2011, a marca histórica de 13,058 milhões de toneladas e deixando o país entre os três maiores produtores mundiais de carne de frango junto com os Estados Unidos e a China (UBABEF, 2014).

As salmonelas são bactérias Gram negativas, pertencentes à família das Enterobactérias e são frequentemente isoladas de carne de aves e ovos (Oliveira et al., 2013). No Brasil, entre os anos de 2000 e 2013, a *Salmonella* spp. foi o agente etiológico de 1.522 surtos de DTA (Alves, 2013) e, nos Estados Unidos, juntamente com o *Campylobacter*, a *Salmonella* causa acima de 2,5 milhões de casos de doenças resultando em dezenas de milhares de internações e centenas de mortes (NARMS, 2012). A *Salmonella* Enteritidis é um dos sorotipos de *Salmonella* mais comuns, sendo um importante patógeno entérico, altamente resistente em ambientes, causador de gastroenterites transmitidas por alimentos em humanos em todo o mundo (CDC, 2010; Manijeh et al., 2008; Vestby et al., 2009)

O Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo, baseando-se nas notificações de surtos e levantamento de diagnóstico laboratorial de 1999 e 2007, mostra que grande parte dos surtos de diarreia ocorridos naquele estado é devido à *Salmonella* spp., sendo que a *Salmonella* Enteritidis representa 43,2 % destes surtos (Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, 2008). No Rio Grande do Sul, entre os anos de 1999 a 2002, a *S. Enteritidis* foi o agente causador de mais de 90% das salmoneloses ocorridas (Malheiros et al., 2007).

Os mecanismos que esta bactéria usa para causar doença estão associados com a forma com que ela interage com seus hospedeiros e também por genes associados à virulência e a patogenicidade. Os microrganismos patogênicos distinguem-se de outros de mesma espécie por possuírem e expressarem genes que codificam fatores de virulência, fatores estes que propiciam a colonização e ocorrência de diversos eventos que alteram a fisiologia hospedeira (Vieira, 2009).

A virulência é um processo multifatorial que exige duas classes gerais de determinantes: genes que participam dos processos fisiológicos necessários para sobrevivência nos ambientes hospedeiros e não hospedeiros, encontrados em organismos

patogênicos e não patogênicos, e uma segunda classe de genes de virulência que são únicos para os organismos patogênicos (Groisman e Ochman, 1996), que, quando expressados, determinam não somente a invasão bacteriana, a persistência e destruição das células hospedeiras, mas também, a capacidade de sobrevivência em condições desfavoráveis (Okamoto et al., 2009).

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi analisar, através da reação em cadeia pela polimerase, se dezoito *Salmonella* Enteritidis isoladas de surtos de doenças transmitidas por alimentos e de origem avícola possuem os seguintes genes: *hilA*, *avrA*, *invA*, *sivH*, *sopE*, *spiA*, *agfA*, *lpfA*, *sefA* e *spvC*.

MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa dos genes pela reação em cadeia pela polimerase foi realizada em parceria pela Universidade de Passo Fundo e pelo Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Amostras de *Salmonella*

Foram analisadas 18 amostras de *Salmonella* Enteritidis previamente isoladas, além da *S. Enteritidis* ATCC 13076. Destas, 10 eram provenientes de surtos de doenças de origem alimentar, sendo cinco de alimentos de origem avícola e cinco de coprocultura de pacientes envolvidos em surtos de DTA, as demais eram quatro de cortes de aves destinados ao consumidor e não envolvidos em surtos, e quatro oriundas de *swabs* de arrasto de galpões de frango de corte.

As amostras estavam armazenadas em caldo *Brain-Heart Infusion* (BHI) com 20% de glicerol e congeladas. Foram reativadas, para verificar a pureza, utilizando um meio de

enriquecimento não seletivo (BHI), incubadas a 37°C por 24 horas e posteriormente semeadas em Ágar Xilose-Lisina Desoxicolato (XLD) e incubadas também a 37°C. Depois de 24 horas foi observado o padrão de colônias para avaliar se eram compatíveis com *Salmonella* spp., confirmadas com testes bioquímicos e realizados estoques em BHI com 20% de glicerol, congelados a -20°C para posterior extração do DNA.

A extração do DNA foi realizada por tratamento térmico, as amostras foram recuperadas dos estoques e incubadas “overnight” a 37°C em caldo BHI. Um mililitro da cultura bacteriana foi centrifugado a 12.000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante descartado. O pellet foi suspenso em 800 µL de água destilada estéril e a mistura resultante centrifugada a 12.000 rpm por 2 minutos. O pellet foi novamente suspenso em 200 µL de água destilada estéril. A amostra foi colocada em um bloco térmico (Baxter Scientific Products) a 95°C por 10 minutos, centrifugada como descrito anteriormente e o sobrenadante usado como modelo para PCR (Borsoi et al., 2009). O DNA extraído foi armazenado a -20 °C até a sua utilização.

Pesquisa dos genes

Através da técnica da PCR (Reação em cadeia pela polimerase), foram pesquisados os seguintes genes: *hilA*, *avrA*, *invA*, *sivH*, *sopE*, *spiA*, *agfA*, *lpfA*, *sefA*, *spvC*, em todas as amostras de *S. Enteritidis* descritas anteriormente.

Para a realização da reação de amplificação, foi preparado um *mix* de reagentes, composto de água ultra-pura, solução tampão, dNTPs, um par de *primers* específicos para cada gene e a enzima *Taq DNA polimerase*. Ao *mix* foi adicionado o DNA extraído de cada amostra. A reação de amplificação foi realizada em um termociclador (Esco – Swift MaxPro®). Esta reação de amplificação foi de acordo com o padronizado por Borges et al. (2013). A sequência de *primers* utilizados estão expressos na Tabela 1.

Tabela 1: Sequência de *primers* utilizados na pesquisa de genes associados à virulência de *Salmonella* Enteritidis isoladas de surtos de doenças transmitidas por alimentos e de origem avícola.

Gene alvo	Sequência de <i>primer</i> (5' - 3')	pb	Referências
<i>hilA</i>	→ CTGCCGCAGTGTTAAGGATA CTGTCGCCTTAATCGCATGT← →GTTATGGACGGAACGACATCGG	497	Guo et al. 2000
<i>avrA</i>	ATTCTGCTTCCC GCCGCC← →GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGGCAA	385	Prager et al. 2003
<i>invA</i>	TCATCGCACCGTCAAAGGAACC← →CAGAATGCGAATCCTTCGCAC	284	Oliveira et al. 2002
<i>sivH</i>	GTATGCGAACAAGCGTAACAC← →ACACACTTTCACCGAGGAAGCG	763	Kingsley et al. 2003
<i>sopE</i>	GGATGCCTTCTGATGTTGACTGG← →CCAGGGGTCGTTAGTGTATTGCGTGAGATG	398	Prager et al. 2003
<i>spiA</i>	CGCGTAAACAAAGAACCCGTAGTGATGGATT← →TCCACAATGGGGCGGCGGCG	550	Skyberg et al. 2006
<i>agfA</i>	CCTGACGCACCATTACGCTG← →CTTTCGCTGCTGAATCTGGT	350	Cesco et al. 2008
<i>lpfA</i>	CAGTGTTAACAGAAACCAGT← →GATACTGCTGAACGTAGAAGG	250	Bäumler & Heffron 1995
<i>sefA</i>	GCGTAAATCAGCATCTGCAGTAGC← →CGGAAATACCATCTACAAATA	488	Oliveira et al. 2002
<i>spvC</i>	CCCAAACCCATACTTACTCTG←	669	Swamy et al. 1996

Foram utilizados três controles para as análises: controle da reação, controle positivo e controle negativo. Como controle da reação foi utilizado uma amostra contendo os reagentes sem o DNA extraído, que é utilizado para detectar uma possível ocorrência de amplificação de material genético inespecífico. Como controle positivo foi utilizada *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e como controle negativo *Manheimia haemolytica* ATCC 29694 para todos os genes.

Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel, com gel de agarose a 1,2% corado com brometo de etídio e, em seguida, foi realizada a leitura do gel em transiluminador de luz ultravioleta (Pharmacia LKB Macrovue).

RESULTADOS

Os genes *hilA*, *avrA*, *invA*, *sopE*, *spiA*, *agfA*, *lpfA*, *sefA* e *spvC* estiveram presentes em 100% das amostras, independente da origem. O gene *sivH* esteve presente em 89% das *S. Enteritidis*, estando ausente em duas amostras, uma isolada de salada de batata com maionese, causadora de surto, e outra de peito de frango coletado diretamente do abatedouro, com origem avícola mas não de surto.

A Tabela 2 ilustra as amostras, a origem do isolado, os genes presentes e o perfil genético representado por estes genes. A Tabela 3 representa o perfil genético das 18 *Salmonella* Enteritidis analisadas e a Tabela 4 a frequência de detecção destes genes associados à virulência.

Tabela 2: Genes de virulência presentes e perfil genético de *Salmonella* Enteritidis isoladas de surtos de doenças transmitidas por alimentos e de origem avícola.

Amostra	Origem	Genes presentes	Perfil genético
SE09	Fezes (Surto)	<i>hilA; avrA; invA; sivH; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC</i>	P1
SE10	Fezes (Surto)	<i>hilA; avrA; invA; sivH; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC</i>	P1
SE24	Fezes (Surto)	<i>hilA; avrA; invA; sivH; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC</i>	P1
SE29	Fezes (Surto)	<i>hilA; avrA; invA; sivH; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC</i>	P1
SE36	Fezes (Surto)	<i>hilA; avrA; invA; sivH; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC</i>	P1
SE41	Fezes (Surto)	<i>hilA; avrA; invA; sivH; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC</i>	P1
SE59	Fezes (Surto)	<i>hilA; avrA; invA; sivH; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC</i>	P1
SE65	Maionese (Surto)	<i>hilA; avrA; invA; sivH; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC</i>	P1
SE72	Maionese de mandioca (Surto)	<i>hilA; avrA; invA; sivH; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC</i>	P1
SE75	Maionese de batata (Surto)	<i>hilA; avrA; invA; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC</i>	P2
SE82	Asa de frango (Avícola)	<i>hilA; avrA; invA; sivH; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC</i>	P1
SE84	Peito de frango (Avícola)	<i>hilA; avrA; invA; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC</i>	P2
SE88	Dorso (Avícola)	<i>hilA; avrA; invA; sivH; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC</i>	P1
SE90	Dorso (Avícola)	<i>hilA; avrA; invA; sivH; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC</i>	P1
SE111	Suabe de arrasto (Avícola)	<i>hilA; avrA; invA; sivH; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC</i>	P1
SE114	Suabe de arrasto (Avícola)	<i>hilA; avrA; invA; sivH; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC</i>	P1
SE163	Suabe de arrasto (Avícola)	<i>hilA; avrA; invA; sivH; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC</i>	P1
SE170	Suabe de arrasto (Avícola)	<i>hilA; avrA; invA; sivH; sopE; spiA; agfA; lpfA; sefA; spvC</i>	P1

Tabela 3: Perfil genético das *Salmonella* Enteritidis isoladas de surtos de doenças transmitidas por alimentos e de origem avícola.

Perfil Genético	Número de amostras	Genes									
		<i>hilA</i>	<i>avrA</i>	<i>invA</i>	<i>sivH</i>	<i>sopE</i>	<i>spiA</i>	<i>agfA</i>	<i>lpfA</i>	<i>sefA</i>	<i>spvC</i>
P1	16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
P2	2	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+

Tabela 4: Frequência de detecção dos genes associados à virulência de *Salmonella* Enteritidis isoladas de surtos de doenças transmitidas por alimentos e de origem avícola.

Gene	Amostras positivas	
	Total (n=18)	Total (%)
<i>hilA</i>	18	100
<i>avrA</i>	18	100
<i>invA</i>	18	100
<i>sivH</i>	16	89
<i>sopE</i>	18	100
<i>spiA</i>	18	100
<i>agfA</i>	18	100
<i>lpfA</i>	18	100
<i>sefA</i>	18	100
<i>spvC</i>	18	100

DISCUSSÃO

A *Salmonella* Enteritidis é um importante patógeno entérico em todo o mundo, altamente resistente em ambientes e causador de gastroenterites transmitidas por alimentos, principalmente ovos e carne de ave crua ou mal cozida (CDC, 2010; Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, 2008; Manijeh et al., 2008; Vestby et al., 2009).

As bactérias patogênicas distinguem-se das não patogênicas por genes que codificam seus fatores de virulência, tendo como os chamados “clássicos fatores de virulência” os plasmídeos, as toxinas, os flagelos e as fimbrias, mas também se destacam os sistemas de

captação de ferro, os fatores que abalem as defesas do hospedeiro e também os genes que permitem a resistência às drogas antimicrobianas (Vieira, 2009; Van Asten e Van Dijk, 2005). As bactérias patogênicas possuem genes responsáveis pela virulência que, quando expressados, determinam não somente a invasão bacteriana e a persistência e destruição das células hospedeiras, mas também a capacidade de sobrevivência em condições desfavoráveis (Okamoto et al., 2009).

Biofilmes são comunidades bacterianas sésseis aderidas a uma substância, a uma interface ou umas às outras (Costerton et al., 1995) para o benefício do grupo, (Barnhart e Chapman, 2006), agindo menos como entidades individuais e mais como sistema de vida coletivo (Annous et al., 2009). Estas bactérias estão embebidas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares, que as diferencia de seus homólogos em suspensão, produzem e exibem um fenótipo alterado com relação à taxa de crescimento e transcrição de genes que ajudam na fixação das células à superfície e estabilizam a colônia às flutuações do ambiente para se aderirem à superfície sólida, formando uma estrutura porosa e altamente hidratada, fornecendo um ambiente ideal para a troca de material genético entre as células (Donlan, 2002; Donlan e Costerton, 2002; Jessen, 2003; Lawrence et al., 1991). A *Salmonella* spp. possui uma elevada capacidade de formação de biofilme em superfícies, em termos de número de biofilme produzido (Stepanovic et al., 2004) e o sorotipo Enteritidis adere e forma biofilmes em superfícies inertes de processamento de alimentos (Manijeh et al., 2008).

Nosso grupo de pesquisadores tem a *Salmonella* Enteritidis como objeto de estudo, e estes 18 isolados foram selecionados por serem os mais formadores de biofilme dentre 170 amostras analisadas em diferentes condições ambientais, incubadas em diferentes temperaturas (3°C, 9°C, 25°C e 36°C), conforme dados de Rodrigues et al. (dados não publicados).

As mesmas 18 *Salmonella* Enteritidis, avaliadas quanto à presença de genes de virulência, foram testadas quanto à resistência a antimicrobianos e a sanitizantes, além da formação de biofilmes a temperatura de 36°C, de acordo com Silva et al. (dados não publicados). As *S. Enteritidis* provenientes de surtos de DTA e 80% das *S. Enteritidis* de origem avícola formaram biofilme. Além da formação de biofilmes, 50% destas *S. Enteritidis* foram multirresistentes aos antimicrobianos testados, e 20% também foram resistentes à biguanida, resultados estes que denotam grande relevância devido a possibilidade de permanência destes microrganismos em ambientes de manipulação de alimentos na forma de biofilmes e, em casos de transmissão à seres humanos, apresentarem maior dificuldade de tratamento em virtude da multirresistência.

Dando continuidade às pesquisas com estes isolados de *Salmonella* Enteritidis, nós obtivemos os seguintes genes presentes em 100% das amostras: *hilA*, *avrA*, *invA*, *sopE*, *spiA*, *agfA*, *lpfA*, *sefA*, *spvC*, e o gene *sivH* esteve presente em 89% das amostras, estando ausente nas SE75, isolada de maionese de batata, e na SE84, isolada de peito de frango coletado em abatedouro, que foram fracamente formadoras de biofilmes no estudo de Silva et al. (dados não publicados).

O gene *hilA* esteve presente em todas as *Salmonella* Enteritidis analisadas neste estudo e é um gene importante na patogenicidade da *Salmonella*, pois é necessário para a colonização das bactérias no lúmen do intestino dos hospedeiros (Murray e Lee, 2000) e também codifica a secreção de proteínas relacionadas com a invasão celular (Cardona-Castro et al. 2002), sendo um regulador no processo de invasão (Jones, 2005; Lucas et al., 2000). O *hilA* também é o gene que codifica um ativador transcricional que regula a expressão de genes de virulência em *Salmonella* em resposta a estímulos ambientais (Durant et al., 2000).

O gene *avrA* esteve presente em 100% das *Salmonella* Enteritidis analisadas, sendo que a proteína AvrA é uma proteína do sistema de secreção, que pode ajudar a garantir que a

infecção por certos sorovares de *Salmonella* permaneça localizada em algum local específico, como o trato gastrointestinal de hospedeiros selecionados, e está ausente nos sorovares Typhi e Choleraesuis, não se descartando que AvrA desempenha um papel na virulência da *Salmonella* (Hardt e Galan, 1997), induzindo a apoptose celular e inibindo a produção de IL-8 e TNF- α (Borges, 2011).

Neste estudo, 100% das amostras apresentavam o gene *invA* e foram compatíveis com os encontrados por Zou et al. (2012), que observou que 99,3% das *Salmonella* Enteritidis isoladas de surtos de salmoneloses em humanos apresentavam este gene, também de acordo com Oliveira et al. (2003), que analisaram 102 amostras de *S. Enteritidis* e este gene esteve presente em todas elas. Este é um gene bastante conservado em todos os sorovares de *Salmonella*, sendo o gene utilizado para detecção pela reação em cadeia pela polimerase (PCR) (Guo et al. 1999; Oliveira et al., 2003; Whang et al., 2009). É um gene de invasão e possui como principal função a internalização da bactéria para invasão das células epiteliais (Borges, 2011; Malorni et al., 2003; Oliveira et al., 2003).

O gene *sivH* esteve presente em 89% de todas as amostras, estando ausente em um isolado de salada de batata com maionese envolvida em surto de doença transmitida por alimentos e em um isolado de peito de frango coletado de abatedouro, não originada de surto. Em um estudo realizado por Kingsley et al. (2003), a inativação deste gene resultou em deficiente colonização nas placas de Peyer do íleo terminal, mas colonização normal do ceco, linfonodos mesentéricos e baço, estando então, diretamente ligado com a colonização da bactéria nas placas de Peyer, sendo também o gene responsável pela eliminação da bactéria nas fezes do hospedeiro (Barrow et al., 2010).

O gene *sopE* está presente em 100% das amostras de *Salmonella* Enteritidis analisadas neste estudo e está de acordo com uma análise realizada por Borges et al. (2013) com amostras de *S. Enteritidis* selecionadas do Centro de Diagnóstico em Patologia Aviária, em

que o gene *sopE* estava presente em 99% dos isolados e também com pesquisa feita por Hopkins e Threlfall (2004), onde 100% das *Salmonella* Enteritidis analisadas possuíam o gene *sopE*. Ele estimula a deformação da membrana plasmática e citoesqueleto das células do hospedeiro, além de codificar a proteína externa SopE (Borges, 2011; Mirmomeni et al., 2008) e pode auxiliar na identificação de cepas com potencial para disseminação de epidemias devido às diferenças no seu potencial de invasão e sua presença pode contribuir para o sucesso epidemiológico da bactéria (Hopkins e Threlfall, 2004).

O gene *spiA* esteve presente em todas as dezoito amostras de analisadas neste estudo, está envolvido na formação de biofilmes e também na virulência da *Salmonella* Enteritidis, sua eliminação não tem efeito na aderência e habilidade de invasão, mas pode resultar na fácil remoção por células hospedeiras e na formação deficiente do biofilme (Dong et al., 2011). Em experimentos com animais, sua perda contribuiu para a atenuação da virulência da *Salmonella* Pullorum em pintos de 1 dia (Lu et al. 2012).

Todas as amostras de *Salmonella* Enteritidis analisadas, tanto as isoladas de surtos de doenças transmitidas por alimentos quanto as de origem avícola possuíam o gene *agfA*. Uma das principais funções da fímbria AgfA é a promoção da interação inicial da bactéria com o intestino do hospedeiro (Sukupolvi et al., 1997), além de estar relacionada com a autoagregação da *Salmonella*, que aumenta a sua sobrevivência frente aos ácidos estomacais do hospedeiro e formação de biofilmes (Collinson et al. 1991, Collinson et al. 1993; Borges, 2011).

O gene *lpfA* está presente em todas as *Salmonella* Enteritidis analisadas. Em um estudo realizado por Galdino et al. (2013) com 18 amostras de *Salmonella* spp. isoladas de suabes de arrasto de aviários de frango de corte no Estado de São Paulo foi isolado o gene *lpfA* de todas as amostras. O operon *lpfABCDE*, um operon fimbrial da *Salmonella* Typhimurium está envolvido com a aderência da bactéria no intestino delgado e esta adesão

resulta apenas para determinadas áreas do trato gastrointestinal levando o agente patogênico para sua preferida porta de entrada – as placas de Peyer do íleo (Bäumler et al., 1996).

O gene *sefA* foi observado em todas as amostras isoladas tanto de surtos quanto as de origem avícola estando de acordo com um estudo realizado por Zou et al. (2012), onde foi observado que o gene *sefA* estava presente em 99,3% das amostras de *Salmonella* Enteritidis isoladas de salmoneloses humanas e também com Borges et al. (2013), que verificou a presença deste gene em 100% das *S. Enteritidis* analisadas naquele estudo.

O gene *spvC* esteve presente em 100% dos isolados tanto de surtos de doenças transmitidas por alimentos quanto de origem avícola, estando de acordo com Zou et al. (2012) que verificaram sua presença em 91,3% das cepas de *Salmonella* Enteritidis isoladas de surto de salmoneloses humanas, mas, de acordo com estudo feito por Swamy et al. (1996), o gene *spvC* não desempenha um papel crítico no estabelecimento da gastroenterite típica causada por salmonelas em seres humanos.

CONCLUSÃO

Mesmo com todas as amostras avaliadas sendo do mesmo sorovar, o perfil genético das *Salmonella* Enteritidis analisadas variou, sendo o perfil 1 o mais prevalente. O gene *sivH* esteve ausente em uma amostra de surto de DTA e em uma de origem avícola, então, se pode verificar que a virulência da *S. Enteritidis* pode estar relacionada com a presença de genes associados a outros fatores como formação de biofilmes e resistência a antimicrobianos e sanitizantes.

AGRADECIMENTOS

Agradecimento especial à CAPES pela bolsa de estudos e à FAPERGS (Edital 001/2013 PQG, Projeto: 1997-2551/13) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves R. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos. 2013. Disponível em

https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&ved=0CC0QFjAC&url=http%3A%2F%2Fwww2.camara.leg.br%2Fatividade-legislativa%2Fcomissoes%2Fcomissoes-permanentes%2Fcmads%2Faudiencias-publicas%2Faudiencia-publica-2013%2Fcrueldade-a-que-os-animais-de-producao-sao-expostos-em-abatedouros-municipais%2Fapresentacoes%2Fapresentacao-da-sra-rejane-alves%2Fview&ei=fNO_U_CAJqbesATMuYLwBw&usg=AFQjCNGn4M1nEY-6xwclS5G0L_uwpQfgvg. Acesso em 11 jul 2014

Annous AA, Fratamico PM, Smith JL (2009) Quorum sensing in biofilms: why bacteria behave the way they do. *Journal of food science*. Vol. 74, No 1.

Barnhart MM, Chapman MR (2006) Curli biogenesis and function. *Annu Rev Microbiol*. 60: 131-147.

Barrow PA, Jones MA, Thomson N. *Salmonella*. In: Gyles CL, Prescott JF, Songer G, Thoen CO (Ed) (2010) *Pathogenesis of bacterial infections in animals*, 4 ed. Ames: Blackwell Publishing. P.231-266.

Bäumler J A, Tsolis R M, Heffron F (1996) The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella* Typhimurium to murine Peyer's patches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. Vol. 93, pp. 279-283.

Bäumler J A & Heffron F (1995) Identification and sequence analysis of *lpfABCDE*, a putative fimbrial operon of *Salmonella* Typhimurium. *J. Bacteriol.* 177(8):2087-2097.

Borges KA (2011) Pesquisa de genes associados à virulência em cepas de *Salmonella* Enteritidis através da técnica da Reação em cadeia pela polimerase. Porto Alegre, Brasil, 76 p. (M. Sc. Dissertation. Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária. UFRGS).

Borges KA, Furian TQ, Borsou A, Moraes HLS, Salle CTP, Nascimento VP (2013) Detection of virulence-associated genes in *Salmonella* Enteritidis isolates from chicken in South of Brazil. *Pesq. Vet. Bras.* 33(12):1416:1422.

Borsoi A, Santin E, Santos LR, Salle CTP, Moraes HLS, Nascimento VP (2009) Inoculation of newly hatched broiler chicks with two brazilian isolates of *Salmonella* Heidelberg strains with diferente virulence gene profile, antimicrobial resistance and pulsed field gel electrophoresis pattern to intestinal changes evaluation. *Poultry Science*, Vol. 88, p. 750-758.

Cardona-Castro N, Restrepo-Pineda E, Correa-Ochoa M (2002) Detection of *hila* gene sequences in serovars of *Salmonella enteria* subspecies Enterica. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 97(8):1153-1156.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/salmonella_enteritidis/. Acesso em: 15 jul 2014.

Cesco MAO, Zimermann FC, Giotto DB, Gayba J, Borsoi A, Rocha SLS, Camilotti E, DalMolin J, Moraes HLS & Nascimento VP (2008) Pesquisa de genes de virulência em *Salmonella* Haddar em amostras provenientes de material avícola. Anais 35^o Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, Gramado/RS, R0701-0.

Collinson SK, Doig PC, Doran JL, Clouthier S, Trust TJ, Kay WW (1993) Thin aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella* Enteritidis to fibronectin. *Journal of Bacteriology*, v. 175, n. 1, P.12-18.

- Collinson SK, Emody L, Muller KH, Trust TJ, Kay WW (1991) Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from *Salmonella* Enteritidis, *J Bacteriol* v. 173, p. 4773-4781.
- Costerton JW, Lewandowski J, Caldwell DE, Korber DR, Lappinscott HM (1995) Microbial biofilms. *Annu Ver Microbiol*, 49: 711-745.
- Divisão de doenças de transmissão hídrica e alimentar CVE/SES/SP (2008) Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/salmonella_pergresp.htm. Acesso em 11.07.2014.
- Dong H, Peng D, Jiao X, Zhang X, Geng S, Liu X (2011) Roles of the *spiA* gene from *Salmonella* Enteritidis in biofilm formation and virulence. *Microbiology*, Vol. 157, p. 1798-1805.
- Donlan RM (2002) Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*. 8(9).
- Donlan RM, Costerton W (2002) Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 15, No 2, 167-193.
- Durant JA, Corrier DE, Stanker LH, Ricke SC (2000) Expression of the *hilA* *Salmonella* Typhimurium gene in a poultry *Salmonella* Enteritidis isolate in response to lactate and nutrients. *Journal of Applied Microbiology*, v.89, p.63-69.
- Galdino VMCA, Melo RT, Oliveira RP, Mendonça EP, Nalevaiko PC, Rossi DA (2013) Virulência de *Salmonella* spp. de origem avícola e resistência a antimicrobianos. *Biosci. J.* , v.29, n.4, p.932-939.
- Groisman EA, Ochman H (1996) Pathogenicity island: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell*. 87:791-794.
- Guo L, Killefer J, Kenney PB, Amick-Morris JD (1999) Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction to study *Salmonella* ecology in a turkey production environment. *Poultry Science*, v. 78, n.1, p. 24-31.

- Guo X, Chen J, Beuchat LR, Brackett RE (2000) PCR detection of *Salmonella enterica* serovar Montevideo in and on tomatoes using primers derived from *hilA*. *Appl. Environm. Microbiol.* 66(12):5248-5252.
- Hardt WD, Gálan JE (1997) A secreted *Salmonella* protein with homology to an avirulence determinant of plant pathogenic bacteria. *Proceeding of the National Academy of Science*, v. 94, P. 9887-9892.
- Hopkins KL, Threlfall J (2004) Frequency and polymorphism of *sopE* in isolates of *Salmonella enterica* belonging to the ten most prevalent serotypes in England and Wales. *Journal of Medical Microbiology*, 53, 539-543.
- Jessen B, Lammert L (2003) Biofilm and disinfection in meat processing plants. *International Biodeterioration & Biodegradation*. Vol. 51, p. 265-269.
- Jones BD (2005) *Salmonella* invasion gene regulation: a story of environmental awareness. *The Journal of Microbiology*, v.43, p. 110-117.
- Kingsley RA, Humphries AD, Weening EH, Zoete MR, Winter S Papaconstantinopoulou A, Dougan G, Bäumlér A J (2003) Molecular and phenotypic analysis of the CS54 island of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium: identification of intestinal colonization and persistence determinants. *Infections and Immunity*, v.71, n.2. P.629-640.
- Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW, Caldwell DE (1991) Optical sectioning of microbial biofilms. *Journal of Bacteriology*, Vol. 173, p. 6558-6567.
- Lu Y, Chen S, Dong H, Sun H, Peng D, Liu X (2012) Identification of genes responsible for biofilm formation or virulence in *Salmonella enterica* serovar Pullorum. *Avian Diseases*; 56(1): 134-143.
- Lucas RL, Lostroh P, Lee CA (2000) Multiple factors independently regulate *hilA* and invasion gene expression in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 182 (7):1872-1882.

- Malheiros PS, De Paula CMD, Tondo EC (2007) Cinética de crescimento de *Salmonella* Enteritidis envolvida em surtos alimentares no RS: uma comparação com linhagens de outros sorovares. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 27(4):751-755.
- Malorni B, Hoorfar J, Bunge C, Helmuth R (2003) Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 1, p. 290-296.
- Manijeh M, Mohammad J, Roha KK (2008) Biofilm formation by *Salmonella* Enteritidis on food contact surfaces. *Journal of Biological Science*; 8(2):502-505.
- Mirmomeni MH, Kiani S, Sisakhtnezhad S. Rapid detection of *Salmonella* Dublin by PCR amplification of the SopE gene and its cloning (2008) *Pak. J. Biol. Sci*; 11(11):1497-1501.
- Murray RA, Lee CA (2000) Invasion genes are not required for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to breach the intestinal epithelium: evidence that *Salmonella* pathogenicity island 1 has alternative functions during infection. *Infect. Immun* v. 68, p. 5050-5055.
- Narms. "Strategic Plan 2012-2016." (2012). Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/UCM236283.pdf>. Acesso em: 22.05.2014.
- Okamoto AS, Andreatti Filho RL, Rocha TS, Menconi A, Marietto-Gonçalves GA (2009) Relation between the *SpvC* and *InvA* virulence genes and resistance of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis isolated from avian material. *International Journal of Poultry Science*. 8(6):579-582.
- Oliveira SD, Santos LR, Schucha DMT, Silva AB, Salle CTP, Canal CW (2002) Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. *Vet. Microbiol.* 87:25-35.

Oliveira SD, Rodenbusch CR, Michael GB, Cardoso MIR, Canal CW, Brandelli A (2003) Detection of virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolated from different sources. Braz. J. Microbiol. 34(1):123-124.

Oliveira AP, Sola MC, Feistel JC, Moreira NM, Oliveira JJ (2013) *Salmonella* Enterica: genes de virulência e ilhas de patogenicidade. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 9, n.16, p. 1947 – 1972.

Prager R, Rabsch W, Streckel W, Voigt W, Tietze E, Tschäpe H (2003) Molecular properties of *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B distinguish between its systemic and its enteric pathovars. J. Clin. Microbiol. 41(9):4270-4278.

Skyberg JA, Logue MC, Nolan LK (2006) Virulence genotyping of *Salmonella* spp. with multiplex PCR. Avian Diseases 50:77-81.

Stepanovic S, Cirkovic I, Ranin L, Svabic-Vlahovic M (2004) Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surfasse. Letters in Applied Microbiology. 38:428-432.

Sukupolvi S, Lorenza RG, Gordon JI, Bian Z, Pfeifer JD, Normark SJ, Rhen M (1997) Expressin of thin aggregative fimbriae promotes interaction of *Salmonella* Typhimurium SR-11 with mouse small intestinal epithelial cells. Infection and Immunity, v.65, n.12. P.5320-5325.

Swamy SC, BarnhartHM, Lee MD, Dreesen DW (1996) Virulence determinants *invA* and *spvC* in Salmonellae isolated from poultry products, wastewater and human sources. Appl. Environ. Microbiol. 62(10):3768-3771.

UBABEF – União Brasileira de Avicultura. História da Avicultura no Brasil (2014) São Paulo. Disponível em:

http://www.ubabef.com.br/a_avicultura_brasileira/historia_da_avicultura_no_brasil. Acesso em: 16.06.2014.

- Van Asten AJAM, Van Dijk JE (2005) Distribution of “classic” virulence factors among *Salmonella* spp. FEMS Immunology and Medical Microbiology. 44:251-259.
- Vestby LK, Moretro T, Langsrud S, Heir E, Nesse LL (2009) Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. BMC Veterinary Research.
- Vieira MAM. Ilhas de Patogenicidade (2009) O Mundo da Saúde. 33(4):406-414.
- Whang YP, Lia L, Shena JZ, Yangb FJ, Wu YW (2009) Quinolone-resistance in *Salmonella* is associated with decreased mRNA expression of virulence genes *invA* and *avrA* growth and intracellular invasion and survival. Veterinary Microbiology, v. 133, n.4, p.328-334.
- Zou M, Keelara S, Thakur S (2012) 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.

5. CONCLUSÕES

O estudo aprofundado dos fatores que levam à patogenicidade da *Salmonella* Enteritidis são de relevância tanto para as indústrias de alimentos quanto para a avicultura comercial, já que a contaminação de seres humanos pode estar diretamente ligada ao consumo de ovos e carne de frango. Neste sentido, com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- a) Todas as *S. Enteritidis* provenientes de surtos de DTA e 80% das *S. Enteritidis* de origem avícola formaram biofilme;
- b) Além da formação de biofilmes, 50% destas *S. Enteritidis* foram multirresistentes aos antimicrobianos testados, e 20% também foram resistentes à biguanida;
- c) Apesar de todas as amostras analisadas pertencerem ao mesmo sorovar, houve variação no perfil genético, sendo o P1 (detecção dos genes *hilA*, *avrA*, *invA*, *sopE*, *spiA*, *agfA*, *lpfA*, *sefA* e *spvC*, *sivH*) o mais prevalente, com 16 *Salmonella* Enteritidis neste perfil;
- d) Estes resultados denotam grande relevância devido a possibilidade de permanência destas *Salmonella* Enteritidis em ambientes de manipulação de alimentos na forma de biofilmes e, em casos de transmissão a seres humanos, serem patógenos mais virulentos e apresentarem maior dificuldade de tratamento em virtude da multirresistência.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A *Salmonella* Enteritidis, como um dos principais agentes etiológicos causadores de doenças transmitidas por alimentos, torna relevante o estudo aprofundado dos mecanismos com que esta bactéria age no hospedeiro e, também, os fatores que levam cada vez um número maior de bactérias revelarem-se resistentes ao tratamento com antimicrobianos e à sanitização nas indústrias de alimentos.

Este trabalho analisou 20 amostras para a formação de biofilmes, resistência a antimicrobianos e sanitizantes e 18 para a presença de dez genes associados à virulência (*hilA*, *avrA*, *invA*, *sivH*, *sopE*, *spiA*, *agfA*, *lpfA*, *sefA* e *spvC*) e os resultados finais estão expressos na Tabela 1, e demonstrados nas Figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7. Estas amostras foram selecionadas a partir de 170 isolados de *Salmonella* Enteritidis, onde foram as mais formadoras de biofilme e são objeto de estudo do grupo de pesquisas há vários anos.

Figura 1: Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo com os produtos para amplificação compatíveis com o gene *agfA*

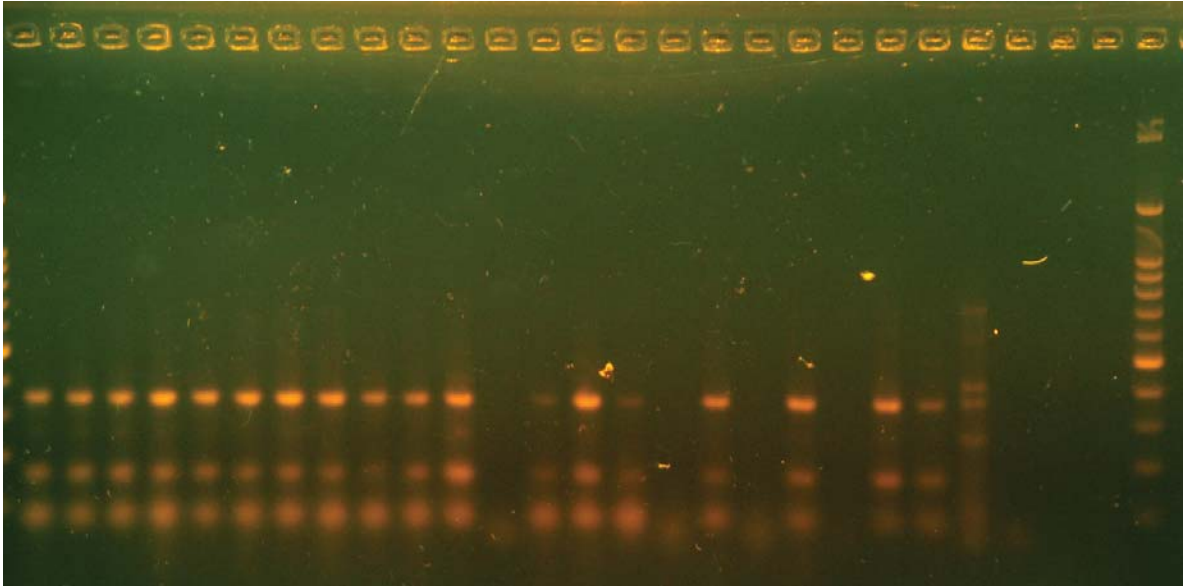


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo com os produtos para amplificação compatíveis com o gene *invA*

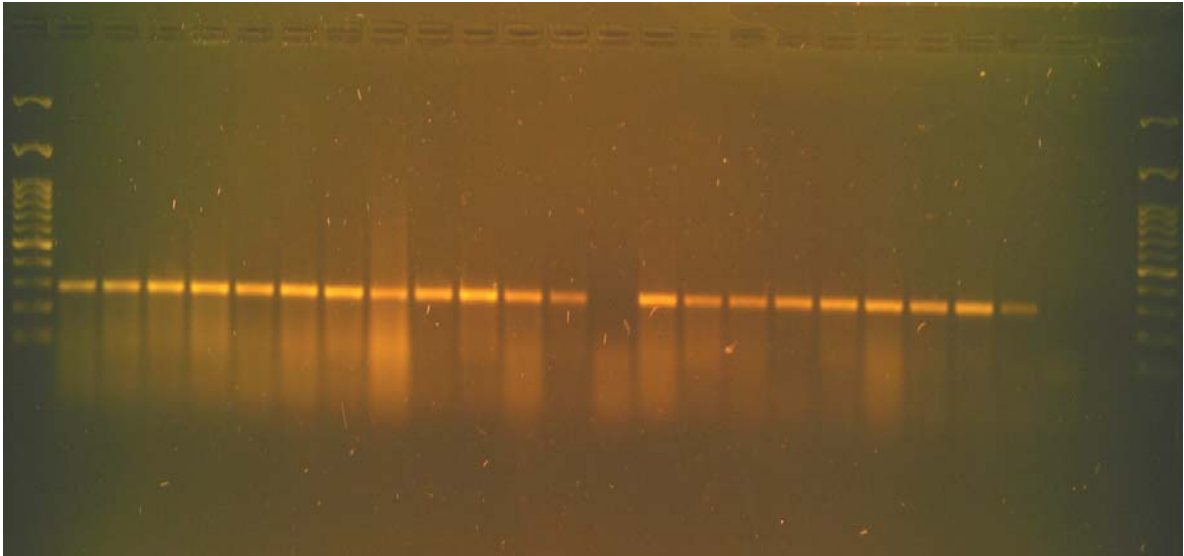


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo com os produtos para amplificação compatíveis com o gene *sefA* e *lpfA*.

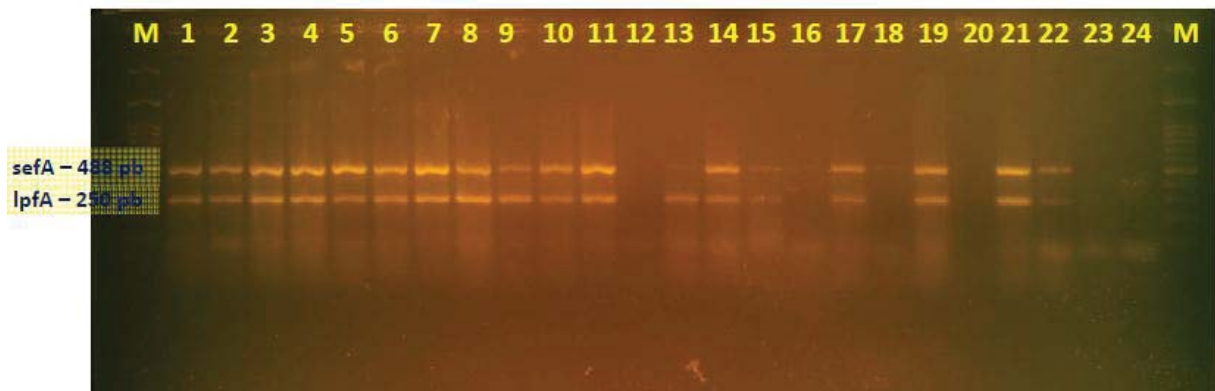


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo com os produtos para amplificação compatíveis com o gene *sivH*

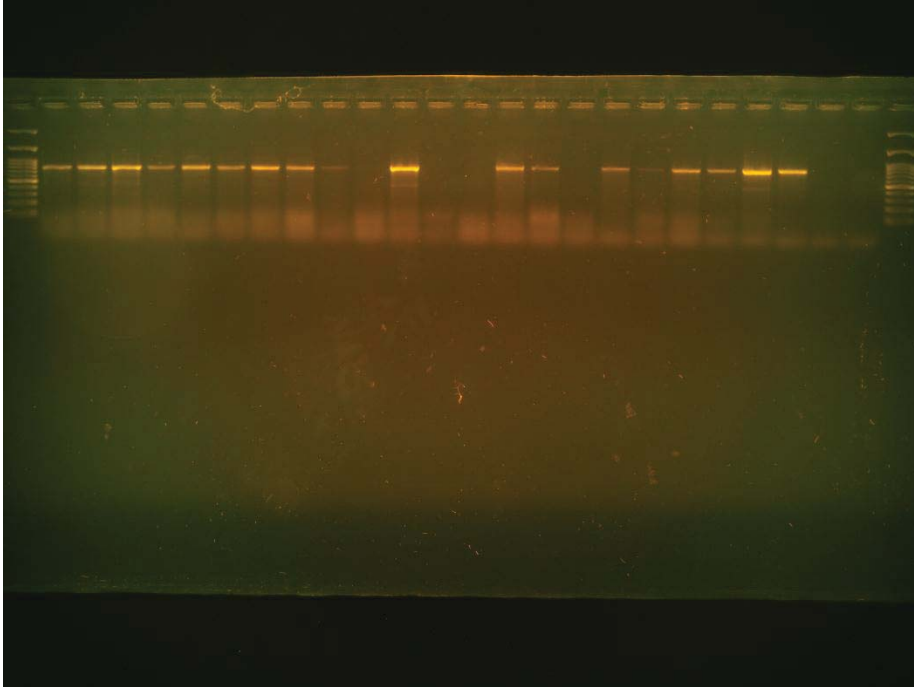


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo com os produtos para amplificação compatíveis com o gene *sopE*

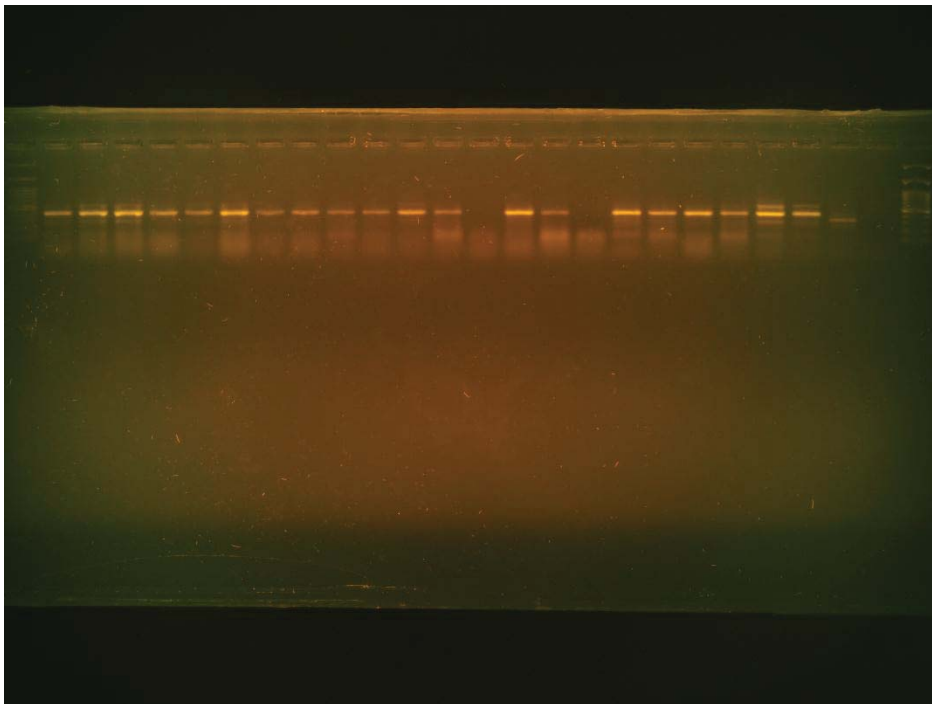


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo com os produtos para amplificação compatíveis com o gene *spiA*

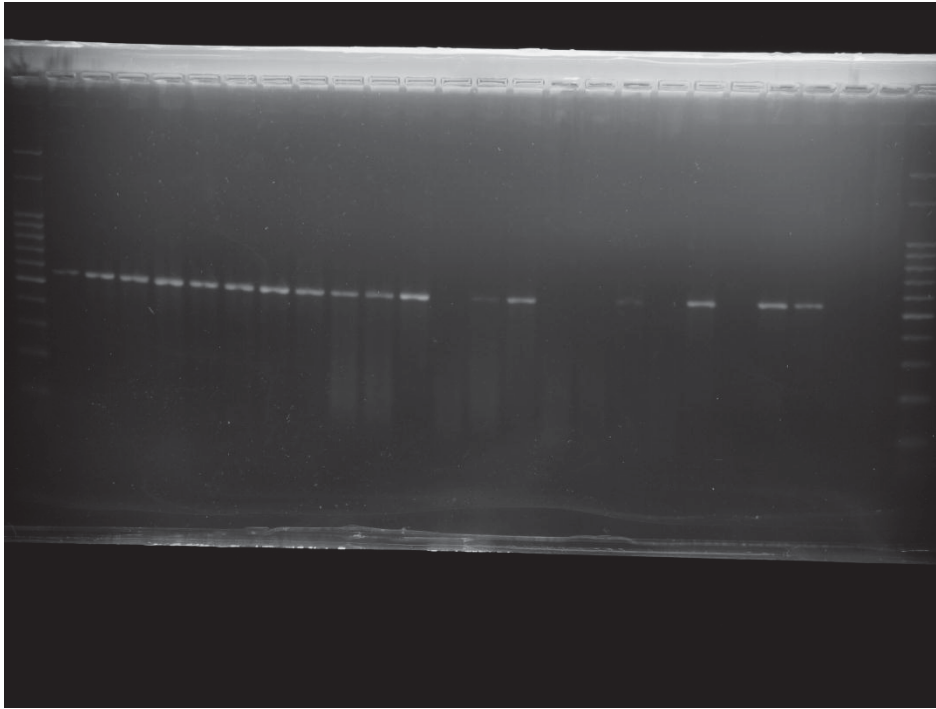


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose corado com brometo de etídeo com os produtos para amplificação compatíveis com o gene *spvC*

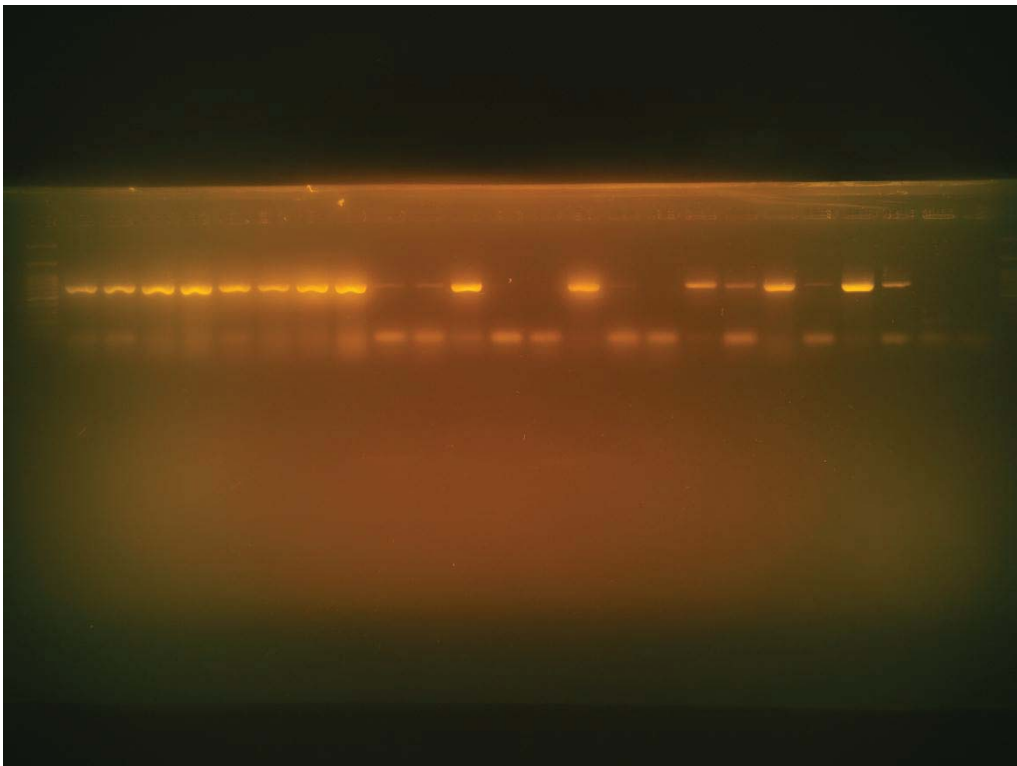


Tabela 1: Formação de biofilmes, perfil de resistência a antimicrobianos e sanitizantes e perfil genético de *Salmonella* Enteritidis.

Amostra	Origem	Formação de biofilmes	Perfil de resistência aos antimicrobianos	Resistência à biguanida	Perfil genético
SE09	Surto DTA	Moderada	P8 (Eri)	R	P1 (<i>hilA</i> , <i>avrA</i> , <i>invA</i> , <i>sivH</i> , <i>sopE</i> , <i>spiA</i> , <i>agfA</i> , <i>lpfA</i> , <i>sefA</i> , <i>spvC</i>)
SE10	Surto DTA	Moderada	P1 (Amp, Entro, Eri, Neo, SFN)	R	P1 (<i>hilA</i> , <i>avrA</i> , <i>invA</i> , <i>sivH</i> , <i>sopE</i> , <i>spiA</i> , <i>agfA</i> , <i>lpfA</i> , <i>sefA</i> , <i>spvC</i>)
SE24	Surto DTA	Forte	P1 (Amp, Entro, Eri, Neo, SFN)	R	P1 (<i>hilA</i> , <i>avrA</i> , <i>invA</i> , <i>sivH</i> , <i>sopE</i> , <i>spiA</i> , <i>agfA</i> , <i>lpfA</i> , <i>sefA</i> , <i>spvC</i>)
SE29	Surto DTA	Moderada	P2 (Entro, Eri, Neo, SFN)	R	P1 (<i>hilA</i> , <i>avrA</i> , <i>invA</i> , <i>sivH</i> , <i>sopE</i> , <i>spiA</i> , <i>agfA</i> , <i>lpfA</i> , <i>sefA</i> , <i>spvC</i>)
SE36	Surto DTA	Forte	P2 (Entro, Eri, Neo, SFN)	R	P1 (<i>hilA</i> , <i>avrA</i> , <i>invA</i> , <i>sivH</i> , <i>sopE</i> , <i>spiA</i> , <i>agfA</i> , <i>lpfA</i> , <i>sefA</i> , <i>spvC</i>)
SE41	Surto DTA	Forte	P7 (Eri, SFN)	R	P1 (<i>hilA</i> , <i>avrA</i> , <i>invA</i> , <i>sivH</i> , <i>sopE</i> , <i>spiA</i> , <i>agfA</i> , <i>lpfA</i> , <i>sefA</i> , <i>spvC</i>)
SE59	Surto DTA	Moderada	P7 (Eri, SFN)	S	P1 (<i>hilA</i> , <i>avrA</i> , <i>invA</i> , <i>sivH</i> , <i>sopE</i> , <i>spiA</i> , <i>agfA</i> , <i>lpfA</i> , <i>sefA</i> , <i>spvC</i>)
SE65	Surto DTA	Moderada	P3 (Amp, Eri, Neo, SFN)	S	P1 (<i>hilA</i> , <i>avrA</i> , <i>invA</i> , <i>sivH</i> , <i>sopE</i> , <i>spiA</i> , <i>agfA</i> , <i>lpfA</i> , <i>sefA</i> , <i>spvC</i>)
SE72	Surto DTA	Fraca	P1 (Amp, Entro, Eri, Neo, SFN)	S	P1 (<i>hilA</i> , <i>avrA</i> , <i>invA</i> , <i>sivH</i> , <i>sopE</i> , <i>spiA</i> , <i>agfA</i> , <i>lpfA</i> , <i>sefA</i> , <i>spvC</i>)
SE75	Surto DTA	Fraca	P4 (Eri, Neo, SFN)	S	P2 (<i>hilA</i> , <i>avrA</i> , <i>invA</i> , <i>sopE</i> , <i>spiA</i> , <i>agfA</i> , <i>lpfA</i> , <i>sefA</i> , <i>spvC</i>)
SE82	Avícola	Não formadora	P6 (Eri, Neo)	S	P1 (<i>hilA</i> , <i>avrA</i> , <i>invA</i> , <i>sivH</i> , <i>sopE</i> , <i>spiA</i> , <i>agfA</i> , <i>lpfA</i> , <i>sefA</i> , <i>spvC</i>)
SE84	Avícola	Fraca	P8 (Eri)	S	P2 (<i>hilA</i> , <i>avrA</i> , <i>invA</i> , <i>sopE</i> , <i>spiA</i> , <i>agfA</i> , <i>lpfA</i> , <i>sefA</i> , <i>spvC</i>)
SE85	Avícola	Fraca	P6 (Eri, Neo)	S	-
SE88	Avícola	Fraca	P3 (Amp, Eri, Neo, SFN)	S	P1 (<i>hilA</i> , <i>avrA</i> , <i>invA</i> , <i>sivH</i> , <i>sopE</i> , <i>spiA</i> , <i>agfA</i> , <i>lpfA</i> , <i>sefA</i> , <i>spvC</i>)
SE90	Avícola	Moderada	P6 (Eri, Neo)	S	P1 (<i>hilA</i> , <i>avrA</i> , <i>invA</i> , <i>sivH</i> , <i>sopE</i> , <i>spiA</i> , <i>agfA</i> , <i>lpfA</i> , <i>sefA</i> , <i>spvC</i>)
SE106	Avícola	Fraca	P4 (Eri, Neo, SFN)	S	-
SE111	Avícola	Forte	P9 (Entro)	R	P1 (<i>hilA</i> , <i>avrA</i> , <i>invA</i> , <i>sivH</i> , <i>sopE</i> , <i>spiA</i> , <i>agfA</i> , <i>lpfA</i> , <i>sefA</i> , <i>spvC</i>)
SE114	Avícola	Fraca	P5 (Entro, Eri, SZT)	R	P1 (<i>hilA</i> , <i>avrA</i> , <i>invA</i> , <i>sivH</i> , <i>sopE</i> , <i>spiA</i> , <i>agfA</i> , <i>lpfA</i> , <i>sefA</i> , <i>spvC</i>)
SE163	Avícola	Não formadora	P10 (Neo)	R	P1 (<i>hilA</i> , <i>avrA</i> , <i>invA</i> , <i>sivH</i> , <i>sopE</i> , <i>spiA</i> , <i>agfA</i> , <i>lpfA</i> , <i>sefA</i> , <i>spvC</i>)
SE170	Avícola	Fraca	P7 (Eri, SFN)	R	P1 (<i>hilA</i> , <i>avrA</i> , <i>invA</i> , <i>sivH</i> , <i>sopE</i> , <i>spiA</i> , <i>agfA</i> , <i>lpfA</i> , <i>sefA</i> , <i>spvC</i>)

Com relação às amostras de *Salmonella* Enteritidis isoladas de surtos de doenças transmitidas por alimentos, 100% foram formadoras de biofilmes, sendo 30% fortemente formadoras, 50% moderadamente formadoras e apenas 20% fracamente formadoras, 70% foram multirresistentes aos antimicrobianos, 60% mostraram-se resistentes à biguanida e 90% apresentaram o perfil genético 1, ou seja, apresentando 100% dos genes avaliados. Apenas a SE75, isolada de maionese de batata, apresentou o perfil genético 2, que é apenas a ausência do gene *shivH*.

De acordo com Cerca (19), as células em biofilme são até 1000 vezes mais resistentes aos agentes antimicrobianos do que células em suspensão e biofilmes com *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Proteus mirabilis* são cerca de 10 a 100 vezes mais resistentes a desinfetantes usados na indústria alimentar e especula-se que bactérias formadoras de biofilmes são causadoras de até 65% das infecções ocorridas.

As amostras estudadas de origem avícola, não originadas de surtos, foram 80% formadoras de biofilme, sendo que 70% foram fracamente formadoras, 10% moderadamente formadoras e 20% não formaram biofilmes, 30% foram multirresistentes aos antimicrobianos testados e 40% foram resistentes à biguanida como sanitizante. Quanto ao perfil genético, 7 amostras analisadas pertencem ao perfil genético 1, e uma, isolada de suabe de arrasto de galpão de frangos de corte, ao perfil genético 2 não possuindo apenas o gene *shivH*.

As duas *S. Enteritidis* pertencentes ao perfil genético 2 foram fracamente formadoras de biofilmes, sendo que a proveniente de surto de doenças transmitidas por alimentos foi multirresistente aos antimicrobianos testados e sensível à biguanida e a de origem avícola foi resistente apenas à eritromicina e também sensível à biguanida.

As causas descritas como responsáveis pela resistência dos biofilmes frente aos antimicrobianos são: a penetração limitada do agente antibiótico pela matriz do biofilme; a alteração do crescimento dos vários organismos que o compõem; outras alterações fisiológicas, como a expressão de genes de resistência; o tamanho do antibiótico e a organização das células no biofilme (19).

Estes dados levam a crer que vários fatores podem estar envolvidos na virulência da *Salmonella* Enteritidis, mas que a formação de biofilmes torna a bactéria mais resistente tanto aos procedimentos de sanitização em indústrias de alimentos quanto aos antimicrobianos utilizados no tratamento de pacientes acometidos por doenças transmitidas por alimentos e

também na avicultura, para tratamento de doenças das aves ou como promotores de crescimento.

A formação do biofilme pela *Salmonella* é uma séria preocupação na indústria de alimentos, uma vez que a persistência da bactéria em biofilmes formados em superfícies de contato com alimentos pode tornar-se uma fonte constante de contaminação do produto (38).

Todas as amostras de *S. Enteritidis* foram sensíveis ao cloranfenicol e isto se deve, provavelmente, por este antimicrobiano estar proibido pelo Ministério da Agricultura na alimentação animal desde o ano de 2003 (11).

A resistência bacteriana a antimicrobianos e a sanitizantes pode ser inata, controlada comossomicamente e associada naturalmente ao microrganismo, na forma de barreiras naturais que impedem a entrada do antimicrobiano, e relatada em ensaios e condições aplicadas (28).

A amônia quaternária e o ácido peracético foram eficientes frente a todas as amostras, em todas as concentrações e tempos testados, comprovando sua eficiência nos procedimentos de sanitização tanto de indústrias de alimentos quanto na avicultura. A utilização de um único princípio ativo ininterruptamente propicia o aparecimento de amostras bacterianas resistentes ao produto utilizado e para que esta resistência seja evitada, é necessária a elaboração de programas de desinfecção com rodízio de princípios ativos. Em galpões recomenda-se que a periodicidade seja inferior a 15 semanas (45). As células de biofilmes sobreviventes à sanitização parecem desenvolver uma resposta ao estresse e/ou tornam-se mais virulentas, o que pode comprometer a segurança dos alimentos e potencializar o risco para a saúde pública (74).

Com tudo isso, pode-se pensar que a capacidade da *Salmonella* Enteritidis causar doenças é a associação de vários fatores, como a presença de genes de virulência e a formação de biofilmes. Esta associação também pode levar as bactérias a tornarem-se multirresistentes a antimicrobianos usados no tratamento das aves e de humanos, e também aos sanitizantes utilizados nas indústrias de processamento de alimentos. Tudo isso, associado à falta de boas práticas de manipulação de alimentos, pode causar surtos de DTA de difícil tratamento em seres humanos.

Como perspectivas futuras para deste trabalho estão os testes para estas mesmas amostras de *Salmonella* Enteritidis quanto à formação de biofilme mono-espécie em aço inoxidável, polietileno e poliuretano e sensibilidade destes biofilmes frente à água quente, amônia quaternária e ácido peracético; a detecção, por biossensores, de moléculas

sinalizadoras do quórum sensing; a verificação da formação de biofilmes multiespécies por estas mesmas amostras juntamente com amostras de *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em aço inoxidável, polietileno e poliuretano e sua sensibilidade frente a tratamentos com água quente, amônia quaternária e ácido peracético.

7. REFERÊNCIAS

1. Alves R. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos. 2013. Disponível em https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&ved=0CC0QFjAC&url=http%3A%2F%2Fwww2.camara.leg.br%2Fatividade-legislativa%2Fcomissoes%2Fcomissoes-permanentes%2Fcmads%2Faudiencias-publicas%2Faudiencia-publica-2013%2Fcrueidade-a-que-os-animais-de-producao-sao-expostos-em-abatedouros-municipais%2Fapresentacoes%2Fapresentacao-da-sra-rejane-alves%2Fview&ei=fNO_U_CAJqbesATMuYLwBw&usg=AFQjCNGn4M1nEY-6xwcIS5G0L_uwpQfgvg. Acesso em 11 jul 2014.
2. Andrade NJ. Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. São Paulo: Varela, 2008. 412p.
3. Annous AA, Fratamico PM, Smith JL. Quorum sensing in biofilms: why bacteria behave the way they do. *Journal of food science*. 2009; 74(1).
4. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova o Regulamento Técnico para Produtos Saneantes com Ação Antimicrobiana harmonizado no âmbito do Mercosul. 2007. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a450e9004ba03d47b973bbaf8fded4db/RD_C+14_2007.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em 14 jul 2014.
5. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Relatório de pesquisa em vigilância sanitária de alimentos. 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/relatorios/relatorioprebaf.pdf>. Acesso em 11 jul 2014.
6. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Antimicrobianos – bases teóricas e uso clínico. 2014. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/conceitos.htm. Acesso em: 23 jul 2014.
7. Barnhart MM, Chapman MR. Curli biogenesis and function. *Annu Rev Microbiol*. 2006; 60: 131-147.
8. Barrow PA, Jones MA, Thomson N. *Salmonella*. In: Gyles CL, Prescott JF, Songer G, Thoen CO (Ed). *Pathogenesis of bacterial infections in animals*, 4 ed. Ames: Blackwell Publishing, 2010. P.231-266.
9. Bäumlér JA, Tsoilis RM, Heffron F. The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella* Typhimurium to murine Peyer's patches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 1996 Jan; 93:279-283.

10. Blom BC, Pedrosa TMG. Disponível em: <http://www.bibliomed.com.br/bibliomed/bmbooks/infec/livro1/cap/cap17.htm>. Acesso em 14 jul 2014.
11. BRASIL (2003). Instrução Normativa nº 9, de 27 de junho de 2003.
12. BRASIL (2012). Instrução Normativa nº 14 de 17 de maio de 2012.
13. Bonafonte MA, Solano C, Sesma B, Alvarez M, Montuenga L, García-Ros D, Gamazo C. The relationship between glycogen synthesis, biofilm formation and virulence in *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiology Letters*. 2000; 191:31-36.
14. Borges K. Pesquisa de genes associados à virulência em cepas de *Salmonella* Enteritidis através da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.
15. Brown TA. *Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução*. 4. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2003, 376 p.
16. Câmara B. *Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)*. Disponível em: <http://www.biomedicinapadiao.com/2011/10/reacao-em-cadeia-da-polimerase-pcr.html>. Acesso em 24 out. 12.
17. Cardona-Castro N, Restrepo-Pineda E, Correa-Ochoa M. Detection of *hlyA* gene sequences in serovars of *Salmonella enterica* subspecies Enterica. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2002 DEC; 97(8):1153-1156.
18. CDC – Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: http://www.cdc.gov/nczved/divisions/dfbmd/diseases/salmonella_enteritidis/. Acesso em: 15 jul 2014.
19. Cerca N. *Biofilmes: na saúde, no ambiente, na indústria*. Porto:Publindústria, Edições Técnicas. 2012.
20. CNI/SENAI/SEBRAE Elementos de apoio para o sistema APPCC. Brasília, SENAI/ND, Série Qualidade Alimentar. 1999, 371p.
21. Colla FL, Rodrigues LB, Dickel EL, Borsoi A, Nascimento VPN, Santos LR. Avaliação *in vitro* de clorexidina, amônia quaternária e ácido peracético frente a amostras de *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola em 2005 e 2009. *Pesq. Vet. Bras*. 2012; 32:289-292.
22. Collinson SK, Doig PC, Doran JL, Clouthier S, Trust TJ, Kay WW. Thin aggregative fimbriae mediate binding of *Salmonella* Enteritidis to fibronectin. *Journal of Bacteriology*. 1993; 175(1):12-18.
23. Collinson SK, Emody L, Muller KH, Trust TJ, Kay WW. Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae form *Salmonella* Enteritidis. *Journal of Bacteriology*. 1991; 173:4773-4781.

24. Collinson SK, Clouthier SC, Doran JL, Banser PA, Kay WW. *Salmonella* Enteritidis *agfBAC* operon encoding thin, aggregative fimbriae. *J. Bacteriol.* 1996; 178:662-667.
25. Costerton JW, Lewandowski J, Caldwell DE, Korber DR, Lappinscott HM. Microbial biofilms. *Annu Ver Microbiol.* 1995; 49: 711-745
26. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1987; 41:435-464.
27. Davey ME, O'Toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2000; 64:847-867.
28. Davidson PM, Harrison MA. Resistance and Adaptation to Food Antimicrobials, Sanitizers, and Other Process Controls. *Food Technology.* 2002 Nov; 56(11).
29. Divisão de doenças de transmissão hídrica e alimentar CVE/SES/SP, 2008. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/hidrica/salmonella_pergresp.htm. Acesso em 11.07.2014.
30. Dong H, Peng D, Jiao X, Zhang X, Geng S, Liu X. Roles of the *spiA* gene from *Salmonella* Enteritidis in biofilm formation and virulence. *Microbiology.* 2011; 157:1798-1805.
31. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases.* 2002 Sep; 8(9).
32. Donlan RM, Costerton W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews,* 2002; 15(2):167-193.
33. Edwards RA, Matlock BC, Heffernan BJ, Maloy SR. Genomic analysis and growth-phase-dependent regulation of the SEF14 fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Microbiology.* 2001; 147:2705-2715.
34. EFSA Journal 2014; 12(3):3590,336 pp., doi:10.2903/j.efsa.2014.3590.
35. Forsythe SJ. *Microbiologia da segurança alimentar.* Porto Alegre: Artmed, 2002; 424 p.
36. Frazier WC. *Microbiologia de los Alimentos.* Zaragoza, Espanha: Ed. Acribia, 1972. Tradução de: *Food microbiology.*
37. Ghigo JM. Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature.* 2001; 412:442-445.
38. Giaouris E, Chorianopoulos N, Skandamis P, Nychas GJ. Attachment and biofilm formation by *Salmonella* in food processing environments. Disponível em: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/26427.pdf>. Acesso em 26 jul 2014.

39. Gibson DL, White AP, Rajotte CM, Kay WW. AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella* Enteritidis. *Microbiology*. 2007; 153:1131-1140.
40. Grimont PAD, Weill FX. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars 9th edition. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. Institut Pasteur, Paris, France, 2007.
41. Groisman EA, Ochman H. Pathogenicity island: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell*. 1996; 87:791-794.
42. Guo L, Killefer J, Kenney PB, Amick-Morris JD. Use of arbitrarily primed polymerase chain reaction to study *Salmonella* ecology in a turkey production environment. *Poultry Science*, 1999; 78(1):24-31.
43. Hardt WD, Galán JE. A secreted *Salmonella* protein with homology to an avirulence determinant of plant pathogenic bacteria. *Proceeding of the National Academy of Science*. 1997; 94:9887-9892.
44. Hopkins KL, Threlfall J. Frequency and polymorphism of *sopE* in isolates of *Salmonella enterica* belonging to the ten most prevalent serotypes in England and Wales. *Journal of Medical Microbiology*. 2004; 53:539-543.
45. Jaenisch FRF, Coldebella A, Machado HGP, Abreu PG, Abreu VMN, Santiago V. Importância da higienização na produção avícola. Comunicado Técnico dez 2004. Disponível em: http://www.cnpasa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/cot363.pdf. Acesso em: 22 jul 2014.
46. Jay, J. M. *Microbiologia de Alimentos*. Porto Alegre, 6 ed.: Artmed, 2005. 711 p.
47. Jessen B, Lammert L. Biofilm and disinfection in meat processing plants. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2003; 51:265-269.
48. Jones BD. *Salmonella* invasion gene regulation: a story of environmental awareness. *The Journal of Microbiology*, 2005; 43:110-117.
49. Kingsley RA, Humphries AD, Weening EH, Zoete MR, Winter S, Papaconstantinopoulou A,
50. Kumar GC, Anand SK. Significance of microbial biofilm in food industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 1998; 42:9-27.
51. Landínez MP. Ribotificação de sequências intergênicas de isolados de *Salmonella entérica* subespécie *entérica* provenientes de produtos avícolas do Brasil e da Colômbia. Tese de Doutorado. Porto Alegre, 2013.
52. Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW, Caldwell DE. Optical sectioning of microbial biofilms. *Journal of Bacteriology*, 1991; 173:6558-6567.

53. Levy DDB, Sharma TA. Single-nucleotide polymorphism mutation spectra and resistance to quinolones in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis with a mutator phenotype. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48:2355-2363.
54. Lu Y., Chen S., Dong H, Sun H, Peng D, Liu X. Identification of genes responsible for biofilm formation or virulence in *Salmonella enterica* serovar Pullorum. *Avian Diseases.* 2012 MAR; 56(1): 134-143.
55. Lucas RL, Lostroh P, Lee CA. Multiple factors independently regulate *hila* and invasion gene expression in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J. Bacteriol.* 2000; 182 (7):1872-1882.
56. Malheiros PS, De Paula CMD, Tondo EC. Cinética de crescimento de *Salmonella* Enteritidis envolvida em surtos alimentares no RS: uma comparação com linhagens de outros sorovares. *Cienc. Tecnol. Aliment.* 2007 out.-dez. 27(4):751-755.
57. Malorni B, Hoorfar J, Bunge C, Helmuth R. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003; 69(1):290-296.
58. Manijeh M, Mohammad J, Roha KK. Biofilm formation by *Salmonella* Enteritidis on food contact surfaces. *Journal of Biological Science.* 2008; 8(2):502-505.
59. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action and resistance. *Clinical Microbiology.* 1999; 12:147-179.
60. Merianos JJ. Quaternary ammonium antimicrobial compounds. In: Block SS *Disinfection, sterilization and preservation.* 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger. 1991p.225-253.
61. Mehtabuddin, Mian AA, Ahmad T, Nadeem S, Tanveer ZI, Arshad J. Sulfonamide residues determination in commercial poultry meat and eggs. *The Journal of Animal & Plant Sciences.* 2002; 22(2):473-478.
62. Melo VV, Duarte IP, Soares AQ. *Guia Antimicrobianos.* 2012; 1.
63. Miljkovic-Selimovic B, Babic T, Stojanovic P. *Salmonella enterica* subspecies enterica serovar Enteritidis – actualities and importance. *Acta Medica Medianae.* 2010; 49(3).
64. Miriagou VA, Carattoli A, Fanning S. Antimicrobial resistance islands: resistance gene clusters in *Salmonella* chromosome and plasmids. *Microbes Infect.* 2006; 8:1923-1930.
65. Mirmomeni MH, Kiani S, Sisakhtnezhad S. Rapid detection of *Salmonella* Dublin by PCR amplification of the SopE gene and its cloning. *Pak. J. Biol. Sci.* 2008 Jun 01; 11(11):1497-1501.
66. Moraes MSV, Andrade NJ, Chaves JBP, Passos FJV, Gomide LAM. Isolament of aerobic mesophilic and thermophilic spores in equipments of poultry slaughter and their resistance against the chemists disinfectants. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 1997; 17:325-329.

67. Murrain RA, Lee CA. Invasion genes are not required for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium to breach the intestinal epithelium: evidence that *Salmonella* pathogenicity island 1 has alternative functions during infection. *Infect. Immun.* 2000; 68:5050-5055.
68. Narms. "Strategic Plan 2012-2016." 2012. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/UCM236283.pdf>. Acesso em: 22.05.2014.
69. Oliveira AP, Sola MC, Feistel JC, Moreira NM, Oliveira JJ. *Salmonella* Enterica: genes de virulência e ilhas de patogenicidade. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, Goiânia. 2013 JUL 01; 9(16):1947 – 1972.
70. Oliveira SD, Rodenbusch CR, Michael GB, Cardoso MIR, Canal CW, Brandelli A. Detection of virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolated from different sources. *Braz. J. Microbiol.* 2003 NOV; 34(1):123-124.
71. Okamoto AS, Andreatti Filho RL, Rocha TS, Menconi A, Marietto-Gonçalves GA. Relation between the *SpvC* and *InvA* virulence genes and resistance of *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis isolated from avian material. *International Journal of Poultry Science.* 2009; 8(6):579-582.
72. Pelczar M. et al. *Microbiologia*. São Paulo: McGraw-Hill do Brasil, 1980. Volume I.
73. Prouty AM, Gunn JS. Comparative analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium biofilm formation on gallstones and on glass. *Infection and Immunity.* 2003; 71(12):7154-7158.
74. Rodrigues D, Cerca N, Teixeira P, Oliveira R, Ceri H, Azeredo J. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Enteritidis biofilms susceptibility to different disinfectants and stress-response and virulence gene expression of surviving cells. *Microbial Drug Resistance.* 2011; 17(2):181-189.
75. Romão CMCA. Desinfecção e esterilização química. In: Teixeira P, Valle S. (Org). *Biossegurança: uma abordagem multidisciplinar*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 1996; 133-162.
76. Rossoni EMM, Gaylarde CC. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *International Journal of Food Microbiology.* 2000; 61:81-85.
77. SBP – Sociedade Brasileira de Pediatria (2014) Macrolídeos, glicopeptídeos e Tetraciclina. Disponível em: http://www.sbp.com.br/show_item2.cfm?id_categoria=24&id_detalhe=667&tipo_detalhe=s. Acesso em 23 jul 2014.
78. Sesti L. Biossegurança em granjas de frango de corte: conceitos e princípios gerais. V Simpósio Brasil Sul de Avicultura, 2004. Disponível em:

- http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/anais_V_bsa_LSesti.pdf. Acesso em 22 jul 2014.
79. Solano C, Garcia B, Valle J, Berasain C, Ghigo JM, Gamazo C, Lasa I. Genetic analysis of *Salmonella* Enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose. *Molecular Microbiology*. 2002; 43(3):793-808.
 80. Stepanovick S, Cirkovic I, Ranin L, Svabic-Vlahovic M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surfasse. *Letters in Applied Microbiology*. 2004; 38:428-432.
 81. Su LH, Chiu C H. *Current system of Salmonella nomenclature used by WHO, CDC, and ASM*. Disponível em URL: <http://www.antimicrobe.org/h04c.files/history/Nomenclature%20of%20Salmonella.pdf>. Acesso em 22 Out. 2012.
 82. Sukupolvi S, Lorenza RG, Gordon JI, Bian Z, Pfeifer JD, Normark SJ, Rhen M. Expressin of thin aggregative fimbriae promotes interaction of *Salmonella* Typhimurium SR-11 with mouse small intestinal epithelial cells. *Infection and Immunity*. 1997; 65(12):5320-5325.
 83. Swamy SC, BarnhartHM, Lee MD, Dreesen DW. Virulence determinants *invA* and *spvC* in Salmonellae isolated from poultry products, wastewater and human sources. *Appl. Environ. Microbiol*. 1996; 62(10):3768-3771.
 84. Toddar K. *Salmonella and Salmonellosis*. Disponível em: http://textbookofbacteriology.net/salmonella_2.html. Acesso em 22 Out. 2012.
 85. UBABEF – UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. História da Avicultura no Brasil. São Paulo: UBABEF, 2014. Disponível em: http://www.ubabef.com.br/a_avicultura_brasileira/historia_da_avicultura_no_brasil. Acesso em: 16 jul 2014.
 86. Van Asten AJAM, Van Dijk JE. Distribution of “classic” virulence factors among *Salmonella* spp. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2005; 44:251-259.
 87. Vestby LK, Moretro T, Langsrud S, Heir E, Nesse LL. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. *BMC Veterinary Research*, 2009.
 88. Vicente E, Toledo MCF. Metodologia para determinação de digluconato de clorhexidina em carcaças de frango utilizando CLAE - pariônico e avaliação de resíduos durante a refrigeração e congelamento. *Ciênc. Tecnol. Aliment*. 2003; 23(3).
 89. Vieira MAM. Ilhas de Patogenicidade. *O Mundo da Saúde*, São Paulo: 2009; 33(4):406-414.

90. Whang YP, Lia L, Shena JZ, Yangb FJ, Wu YW. Quinolone-resistance in *Salmonella* is associated with decreased mRNA expression of virulence genes *invA* and *avrA* growth and intracellular invasion and survival. *Veterinary Microbiology*. 2009; 133(4):328-334.
91. Wiest, JM. Desinfecção e Desinfetantes. In: Guerreiro et al. *Bacteriologia Especial: com interesse em saúde animal e saúde pública*. Porto Alegre: Sulina, 1984, cap.5, p.51-66.
92. 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*. 2012; 9(3):232-238.