

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

**FORMAÇÃO DE BIOFILMES E RESISTÊNCIA A
ANTIMICROBIANOS DE *Salmonella* spp. ISOLADAS EM
ABATEDOUROS AVÍCOLAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Jéssica Zolim Andreatto Mandelli

**Passo Fundo, RS, Brasil
2016**

**FORMAÇÃO DE BIOFILMES E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE
Salmonella spp. ISOLADAS EM ABATEDOUROS AVÍCOLAS**

Jéssica Zolim Andreatto Mandelli

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Passo Fundo (UPF), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestra em Bioexperimentação** – Área de concentração em Higiene, inspeção, microbiologia e composição química de alimentos.

Orientador: Profa. Luciana Ruschel dos Santos

**Passo Fundo, RS, Brasil
2016**

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

FORMAÇÃO DE BIOFILMES E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE
Salmonella spp. ISOLADAS EM ABATEDOUROS AVÍCOLAS

Elaborada por
Jéssica Zolim Andreatto Mandelli

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

Comissão Examinadora


Luciana Ruschel dos Santos, Dra., UPF
(Orientadora/Presidente)


Laura Beatriz Rodrigues, Dra., UPF


Andrea Tröller Pinto, Dra., UFRGS

Passo Fundo, RS, Brasil
2016

CIP – Catalogação na Publicação

M271f Mandelli, Jéssica Zolim Andreatto
Formação de biofilmes e resistência a antimicrobianos
de *Salmonella* spp. isoladas em abatedouros avícolas/ Jéssica
Zolim Andreatto Mandelli. – 2016.
45 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Luciana Ruschel dos Santos.
Dissertação (Mestrado em Bioexperimentação) –
Universidade de Passo Fundo, 2016.

1. Salmonella spp. 2. Agentes antiinfeciosos. 3. Drogas -
Resistência em micro-organismos. 4. Zoonoses. I. Santos,
Luciana Ruschel dos, orientadora. II. Título.

CDU: 636:616.993

Catalogação: Bibliotecário Luís Diego Dias de S. da Silva - CRB 10/2241

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar as dificuldades e colocar pessoas tão especiais a meu lado, sem as quais certamente eu não teria chegado até aqui.

À minha orientadora, doutora Luciana Ruschel dos Santos, pelos seus valiosos ensinamentos, amizade, confiança e exemplo profissional, que sempre fará parte da minha vida.

À minha família, que são a base de tudo, os quais amo muito e jamais teria conseguido sem o apoio e incentivo constante.

A todos os professores que compõe o grupo de docentes do Programa de Pós-Graduação em Bioexperimentação.

A todos os funcionários do Laboratório de Bacteriologia do Hospital Veterinário que não mediram esforços para auxiliar e trocar conhecimentos.

Enfim, a todos aqueles que, de uma maneira ou de outra, contribuíram para que este percurso pudesse ser concluído.

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado ao meu esposo Juliano, que me incentivou, acompanhou e apoiou em todos os momentos. Aos meus pais Jair e Jaqueline, que me ensinaram sempre a correr atrás dos meus sonhos. À minha orientadora Luciana, pela dedicação, amizade e incentivo.

Sem vocês, nada disso seria possível.

EPÍGRAFE

”Foi o tempo que dedicastes à tua rosa que a fez tão importante”.

Antoine de Saint-Exupéry

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 GÊNERO <i>Salmonella</i> spp.	14
2.2 FORMAÇÃO DE BIOFILMES	16
2.3 SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E PRODUÇÃO DE ESBL	18
3. CAPÍTULO 1. ESBL PRODUCTION AND BIOFILM FORMATION IN <i>Salmonella</i> serovars RESISTANT TO ANTIMICROBIAL AGENTS.	20
Abstract	21
INTRODUCTION	22
MATERIALS AND METHODS	23
RESULTS	27
DISCUSSION	31
REFERÊNCIAS	36
4. CONCLUSÕES	40
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
6. REFERÊNCIAS	42

LISTA DE TABELAS

3. CAPÍTULO 1

TABELA 1. <i>Salmonella</i> serovars and source of poultry slaughterhouse isolates.....	24
TABELA 2. Sensitivity of <i>Salmonella</i> serovars, ESBL production, and adhesion to polystyrene at different incubation temperatures	30

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Coleção Americana de Tipos de Cultura)
ESBL	β -lactamase de espectro estendido
BHI	<i>Brain-Heart Infusion</i> (caldocérebro-coração)
CDC	<i>Center of Disease Control and Prevention</i> (Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos)
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> (Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais)
DTA	Doença transmitida por alimento
EPS	Substância polimérica extracelular
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i> (Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos)
Fiocruz	Fundação Instituto Oswaldo Cruz
mL	Mililitro
pH	Potencial Hidrogeniônico
QS	<i>Quorum Sensing</i>
RS	Rio Grande do Sul
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i> (caldo tripticase de soja)
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UPF	Universidade de Passo Fundo
XLD	Ágar Xilose-Lisina Desoxicolato
WHO	<i>World Health Organization</i>
μ g	Microgramas
μ L	Microlitros

RESUMO

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

FORMAÇÃO DE BIOFILMES E RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE *Salmonella* spp. ISOLADAS EM ABATEDOUROS AVÍCOLAS

Autor: Jéssica Zolim Andreatto Mandelli

Orientador: Luciana Ruschel dos Santos

Passo Fundo, 05 de Agosto de 2016

Salmonella spp. é um microrganismo patogênico zoonótico, frequentemente interligado à surtos de doenças de origem alimentar associados à ingestão de alimentos de origem avícola. Possui ótima capacidade de adaptação a condições ambientais adversas e elevada capacidade de formação de biofilmes. A resistência aos antimicrobianos é um dos maiores problemas de saúde pública em âmbito mundial e microrganismos isolados de alimentos, principalmente *Salmonella* spp., podem ter alta ocorrência de resistência, principalmente devido ao uso inapropriado destes fármacos. Com base na relevância destes temas, esta dissertação foi elaborada com uma breve introdução e um artigo científico. O capítulo 1 apresentou a habilidade de formação de biofilmes em microplacas de poliestireno, sob diferentes temperaturas de incubação, de 10 sorovares distintos de *Salmonella* spp. e à resistência a antimicrobianos comumente utilizados na clínica humana e/ou em frangos de corte e produção de ESBL por estes sorovares. Estes testes foram realizados utilizando os antimicrobianos: Ampicilina, Amoxicilina + Clavulanato, Aztreonam, Ceftazidima, Cefotaxima, Cloranfenicol, Gentamicina, Enrofloxacina, Sulfonamida e Tetraciclina. Foi possível constatar que apenas o antimicrobiano Tetraciclina foi capaz de inibir o crescimento microbiano de 100% dos sorovares testados. Nos sorovares *S. Infantis*, *S. Panamá* e *S. Tennessee* foi observado produção de enzima beta-lactamase de espectro estendido, através da formação de “zonas fantasmas” ou alargamento do halo de inibição dos discos. Todos os sorovares testados aderiram ao poliestireno em pelo menos uma das temperaturas avaliadas. Na temperatura de 25°C, que mimetiza a temperatura ambiente, 50% dos isolados apresentaram-se moderadamente aderentes. Estes resultados denotam grande importância devido à possibilidade de permanência destes sorovares em ambientes de manipulação de alimentos na forma de biofilmes, devido ao aumento da capacidade de sobreviver a diversas temperaturas e condições ambientais. Os antimicrobianos devem ser utilizados com cautela, devido aos níveis de resistência encontrados. A ausência de uma metodologia indicada por órgãos internacionais para avaliação fenotípica da produção de ESBL por *Salmonella* spp. pode estar dificultando a comparação em pesquisas e subestimando sua ocorrência.

Palavras chaves: *Salmonella* spp. Biofilmes. Antimicrobianos. ESBL.

ABSTRACT

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

BIOFILM FORMATION AND ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF *Salmonella* spp. ISOLATED IN POULTRY SLAUGHTERHOUSES

Author: Jéssica Zolim Andreatto Mandelli

Advisor: Luciana Ruschel dos Santos

Passo Fundo, 05 de Agosto de 2016

Salmonella spp. Is a zoonotic pathogenic microorganism, often interconnected with outbreaks of food-borne diseases associated with the ingestion of food of poultry origin. It has an excellent ability to adapt to adverse environmental conditions and high biofilm formation capacity. Antimicrobial resistance is one of the greatest public health problems worldwide and isolated food microorganisms, especially *Salmonella* spp., may have a high occurrence of resistance, mainly due to the inappropriate use of these drugs. Based on the relevance of these themes, this dissertation was elaborated with a brief introduction and a scientific article. Chapter 1 presented the ability to form biofilms in polystyrene microplates under different incubation temperatures of 10 different serovars of *Salmonella* spp. and antimicrobial resistance commonly used in human clinical and / or broiler chickens and ESBL production by these serovars. These tests were performed using the antimicrobials: Ampicillin, Amoxicillin + Clavulanate, Aztreonam, Ceftazidime, Cefotaxime, Chloramphenicol, Gentamicin, Enrofloxacin, Sulfonamide and Tetracycline. It was possible to verify that only the antimicrobial Tetracycline was able to inhibit the microbial growth of 100% of the serovars tested. In serovars *S. Infantis*, *S. Panama* and *S. Tennessee* beta-lactamase enzyme production of extended spectrum was observed, through the formation of "ghost zones" or widening of the disc inhibition halo. All tested serovars adhered to polystyrene in at least one of the evaluated temperatures. At the temperature of 25°C, which mimics the ambient temperature, 50% of the isolates were moderately adherent. These results are of great importance due to the possibility of these serovars staying in food handling environments in the form of biofilms due to their increased ability to survive various temperatures and environmental conditions. Antimicrobials should be used with caution due to the resistance levels found. The absence of a methodology indicated by international bodies for the phenotypic evaluation of ESBL production by *Salmonella* spp. may be hindering comparison in research and underestimating its occurrence.

Key words: *Salmonella* spp. Biofilms. Antimicrobial. ESBL.

1. INTRODUÇÃO

Salmonella é uma das principais bactérias causadoras de gastroenterites que acometem humanos em todo o mundo. Frequentemente está interligada a surtos de origem alimentar, associada à ingestão de alimentos como carne de aves e ovos, podendo ser isolada também em água e vegetais. Possui ótima capacidade de adaptação a condições ambientais adversas como solo e adubo, sobrevivendo no meio ambiente por longos períodos, o que facilita sua transmissão para mamíferos, aves, reptéis e para o homem.

Por se tratar de um microrganismo patogênico zoonótico, todas as informações adquiridas sobre *Salmonella* spp. são de suma importância para a saúde pública, contribuindo para a implementação de medidas de controle e prevenção de surtos. O rastreamento deste patógeno, bem como as características nativas e adquiridas de cada sorovar, possibilitam a vigilância epidemiológica ao longo do tempo.

A verificação sobre a possível formação de biofilmes é de extrema importância para a saúde pública e segurança alimentar da população. Os biofilmes são células com forte adesão e difícil eliminação por agentes sanitizantes, responsáveis pela contaminação de alimentos, superfícies e utensílios. Estudos demonstram que diversos sorovares de *Salmonella* spp. possuem elevada capacidade de formação de biofilmes e adesão celular.

A resistência a antimicrobianos é um dos maiores problemas de saúde pública a nível mundial. Os microrganismos isolados de alimentos, principalmente a *Salmonella* spp., tem tido alta prevalência de resistência a antimicrobianos. Entre os fatores considerados como causas desta resistência estão o uso inapropriado de antimicrobianos, a falta de fiscalização efetiva no controle da venda de medicamentos em farmácias e o uso de antibióticos humanos para tratar animais.

Atualmente, mais de 2500 sorovares de *Salmonella* spp. já foram identificados, destacando-se os estudos sobre os sorovares mais prevalentes em surtos alimentares ou enfermidades em animais, mas existem poucos relatos sobre a patogenicidade de sorovares como *S. Agona*, *S. Anatum*, *S. Bredeney*, *S. Brandenburg*, *S. Infantis*, *S. Lexington*, *S. Panamá*, *S. Rissen*, *S. Schwarzengrund* e *S. Tennessee*.

As salmoneloses são um problema de saúde pública e experimentos avaliando a possível capacidade de formação de biofilmes destes sorovares, bem como a ação de antimicrobianos sobre estas bactérias são importantes para a identificação da patogenicidade de sorovares não comumente associados à gastroenterites em humanos, mas regularmente isolados em materiais de origem avícola.

Nesse contexto, os objetivos deste trabalho foram avaliar a capacidade de formação de biofilmes mono-espécie de 10 sorovares distintos de *Salmonella* spp. isoladas de abatedouros avícolas em microplacas de poliestireno, a 42°C, 36°C, 25°C, 9°C e 3°C, durante 24 horas, utilizando microbiologia convencional, bem como, avaliar a resistência aos antimicrobianos Ampicilina 10 µg, Amoxicilina+Clavulanato 20/10 µg, Aztreonam ATM 30 µg, Ceftazidima CAZ 30 µg, Cefotaxima CTX 30 µg, Cloranfenicol CLO 30 µg, Gentamicina GEN 10 µg, Enrofloxacin 5 µg, Sulfonamida SUL 300 µg e Tetraciclina TET 30 µg, utilizados na clínica humana e/ou em frangos de corte e avaliar a produção de enzima beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) por estes sorovares.

A presente dissertação é composta por esta introdução, uma breve revisão de literatura sobre o gênero *Salmonella* spp., sorovares utilizados, formação de biofilmes, suscetibilidade a antimicrobianos e produção de ESBL e por um trabalho científico. O Capítulo 1, “***Salmonella* spp. produtoras de ESBL, resistentes a antimicrobianos e formadoras de biofilmes**” teve como objetivo avaliar a formação de biofilmes de 10 sorovares distintos de *Salmonella* spp. em microplacas de poliestireno, sob diferentes temperaturas de incubação, bem como, a resistência aos antimicrobianos utilizados na clínica humana e/ou em frangos de corte e avaliar a produção de enzima beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) por estes sorovares. O artigo será submetido à Revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 GÊNERO *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* pertence à família das enterobactérias e foi dividido em duas espécies, sendo *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. A espécie *Salmonella enterica* é subdividida em seis subespécies, onde a subespécie I representa quase todos os sorotipos isolados comumente (1). Em 1880, este microrganismo foi isolado por Eberth nos linfonodos e baço de seres humanos e chamada de *Bacterium typhosa*. Em 1884, o microbiologista americano Dr. Daniel E. Salmon isolou a mesma bactéria no intestino de suínos e denominou *Bacillus cholerae suis*. O nome *Salmonella* surgiu em 1900, quando Lignières propôs uma homenagem ao Dr. Salmon (2).

Morfologicamente, são classificadas como bastonetes Gram-negativos, anaeróbios facultativos e não produtores de esporos, quem medem 2 a 3 por 0,4 a 0,6 µm. As salmonelas produzem ácido a fermentação da glicose, reduzem nitratos, não produzem citocromo oxidase e com exceção da *S. Typhi* e produzem gás (H₂S) pela fermentação de glicose. A maioria dos sorovares é móvel por meio de flagelos peritríquios, exceto *S. Gallinarum* e a *S. Pullorum*(1).

Salmonella spp. podem multiplicar-se em uma variação de temperatura de cerca de 5°C à 45 °C, com uma temperatura ótima de crescimento em torno de 38 °C, enquanto o pH varia de 4.5 a 9.0, com pH ótimo de 6.5 - 7.5. Pelo fato de não serem produtores de esporos, podem ser destruídas a 60° C por aproximadamente 15 minutos (3).

Anualmente, estima-se que ocorram 1 milhão e 400 mil casos de salmoneloses nos Estados Unidos, totalizando 16.000 hospitalizações e aproximadamente 600 mortes (4). No Brasil, de acordo com dados da Agência Nacional da Vigilância Sanitária, entre os anos de 2000 a 2011, foram notificados 1600 surtos de salmoneloses. No Rio Grande do Sul, de 1980 a 2012 foram notificados 4.071 surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA), acometendo 49.451 pessoas por diarreia e gastroenterite infecciosa, totalizando 11 óbitos. Deste total de surtos, estima-se que aproximadamente 60% foi causado por *Salmonella* spp. (5).

Salmonella spp. é uma bactéria cosmopolita, adaptada a condições ambientais adversas como solo, adubo e sobrevivem no meio ambiente por longos períodos, podendo colonizar aves, répteis, gado, roedores, animais domésticos e o homem. Nos meses de verão e outono, a incidência de infecções por *Salmonella* spp. é muito grande, principalmente em crianças com menos de 5 anos e adultos com mais de 60 anos, quando consomem alimentos contaminados sem o devido cozimento ou refrigeração. As fontes mais comuns de infecções em humanos são produtos de origem avícola e laticínios, bem como, superfícies que entraram em contato com produtos contaminados e são reutilizados sem a desinfecção adequada(4).

Devido a grande similaridade genética que as *Salmonelas* possuem, atualmente são diferenciadas por sorovares. Há quase um século, Kauffman e White estabeleceram as interações dos anticorpos com as superfícies antigênicas, que tem por base a composição dos antígenos somáticos (O), capsulares (Vi) e flagelares (H). Esses antígenos estão situados na superfície celular e determinam a sorotipificação do gênero (6).

Em 2007 foram descritos 2.579 sorotipos de *Salmonella*, e todas as formulas antigênicas conhecidos como sorovares estão listadas no esquema Kauffman-White. 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. Panamá*. A nomenclatura e classificação da *Salmonella* sofreram diversas variações e ainda não estão totalmente definidas. Atualmente, os nomes são escritos com a primeira letra maiúscula, como no caso da *Salmonella enterica* subespécie *enterica* sorovar Enteritidis utiliza-se apenas *S. Enteritidis* (7).

A *Salmonella* Lexington não é rotineiramente isolada em aves comerciais no Brasil, mas já foi relatada em carne de pato comercializada no varejo do Vietnã (8). Em um estudo realizado com codornas no estado de São Paulo, foi possível identificar que 75% das amostras estavam contaminadas com *Salmonella* spp., e a *S. Lexington* foi isolada em tanques de escaldagem, água de refrigeração e carcaças (9).

A *S. Panamá*, assim como os demais sorovares, é um importante causador de gastroenterite aguda, mas, além disto, pode ser um causador de bacteremia em potencial (10). Sabe-se que existem genótipos de *S. Panamá* com grande perfil de multirresistência a diversos antimicrobianos, sendo uma ameaça de saúde pública, principalmente em ambientes hospitalares (11). A maior parte dos casos relatados de infecção hospitalar por *S. Panamá* ocorreu em neonatos e crianças, que desenvolveram bacteremia, meningite, abscesso cerebral, gastroenterite ou osteomielite (10). A principal rota de transmissão ocorre de forma fecal-oral, devido à má higiene de mãos e superfícies (12). Ocorreu em Taiwan, um caso de meningite por *S. Panamá* acometendo um neonato e sendo associado ao consumo de leite materno. Este foi o primeiro caso associado a esta forma de transmissão (13).

A *Salmonella* Rissen é pouco frequente em infecções que acometem humanos, visto que não possui um reservatório específico identificado (14). Para a população brasileira, apresenta riscos quando relacionada principalmente ao consumo de carne suína, uma vez que este sorovar é comumente isolado nesta espécie (15). Na Tailândia, a importância deste sorovar está aumentando, com ocorrência em alimentos, mas principalmente frutos do mar. Já na Finlândia, desde 2003, é frequentemente isolada em aves (16). No Brasil, há relatos de isolamento deste sorovar em humanos entre 1950 e 1990 (17).

A *S. Typhimurium* é comumente isolada em casos clínicos, bem como, apresenta multirresistência a antimicrobianos e conhecida capacidade de formar biofilmes, sendo capaz de aderir em diversas superfícies (18). As salmoneloses são causa significativa de diarreia aguda e crônica, e morte em várias espécies de animais e em seres humanos. A *S. Typhimurium* é o segundo patógeno de origem alimentar mais comum em seres humanos, e é frequentemente isolada em suínos. Estudos demonstraram elevado perfil de resistência a antimicrobianos envolvendo este sorovar (19).

1.4 FORMAÇÃO DE BIOFILMES

A formação de biofilmes foi identificada muito antes de 1970 (20). Inicialmente, acreditava-se que os microrganismos eram apenas células suspensas livres que

desenvolviam crescimento em meios de cultura nutritivos, ou seja, células planctônicas. Em meio a diversos estudos, sabe-se que a maior parte da atividade bacteriana na natureza não ocorre com as células individualizadas crescendo na forma livre, e sim com as bactérias organizadas em biofilmes (21).

Biofilmes consistem em grupos celulares bacterianos aderidos a superfícies bióticas, como células e tecidos, ou abióticas, como vidro, poliestireno, fibra de aço, envolvidos por uma matriz de exopolissacarídeo (EPS), caracterizadas por estruturas tridimensionais complexas com grande resistência aos ambientes de estresse. Acredita-se que os microrganismos representem menos de 10% da massa de um biofilme, e os 90% restantes sejam de materiais extracelulares (22).

A função multicelular e a heterogeneidade da matriz dos biofilmes contam também com componentes como água, polissacarídeos e outras macromoléculas, bem como micro canais internos, úteis na distribuição de água e nutrientes, no escoamento de metabólitos e enzimas indispensáveis para o funcionamento das células e distribuição de moléculas sinalizadoras de *quórum sensing* (23).

O *quórum sensing* (QS) é o método que as células bacterianas utilizam para se comunicar, sejam elas da mesma espécie ou de espécies distintas. É mediado por sinais químicos similares a auto indutores, que são sintetizados e secretados pelas próprias bactérias. As células bacterianas utilizam o QS para aperfeiçoar a expressão de genes de virulência e a colonização do hospedeiro, melhorar o acesso aos nutrientes e reforçar a competição com outros microrganismos (23).

Acredita-se que os biofilmes são formados em cinco etapas, que compreendem: 1) as células planctônicas começam a se aproximar de superfícies sólidas. Durante esta etapa, a célula bacteriana pode se mover e a forças que influencia essa reversibilidade é atração de Van der Waals, forças eletrostáticas e interações hidrofóbicas; 2) mudança da fase reversível para irreversível. Produção de polímeros ou adesinas específicas na superfície das bactérias, tornando imobilizados estes organismos ao substrato, iniciando sua multiplicação na superfície e formação de monocamada; 3) início do desenvolvimento de formação do biofilme; 4) formação de micro colônias no biofilme maduro. As substâncias extracelulares possibilitam o acesso aos nutrientes. Nesta etapa, formam-se canais de água que permitem a entrada dos nutrientes e saída de metabólitos do biofilme. Os microrganismos desenvolvem diferenciação metabólica e fisiológica

com relação às células planctônicas; 5) nesta fase, ocorre à dispersão das bactérias do biofilme e o ciclo é reiniciado (24,25).

Sabe-se que, algumas propriedades físico-químicas das superfícies contribuem para a melhor adesão do microrganismo, em especial a hidrofobicidade. Superfícies mais hidrofóbicas, ásperas e em locais onde ocorre o processamento de alimentos são mais aderentes ao microrganismo e no substrato (24).

A verificação sobre a possível formação de biofilmes é de extrema importância para a saúde pública e segurança alimentar da população. Estudos como o de Rodrigues et al., (2009) já demonstram que diversos sorovares de *Salmonella* spp. possuem uma elevada capacidade de formação de biofilmes e adesão celular. Deste modo, necessitam-se pesquisas sobre a capacidade de adesão e formação de biofilme de sorovares como *S. Lexington*, *S. Panamá*, *S. Rissen* e *S. Typhimurium*, testando métodos de controle para a adesão bacteriana.

1.5 SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E PRODUÇÃO ESBL

A resistência a antimicrobianos é um dos maiores problemas de saúde pública a nível mundial. Os microrganismos isolados de alimentos, principalmente a *Salmonella* spp., tem tido alta prevalência de resistência a antimicrobianos (27). Entre os fatores considerados como causas desta resistência, estão o uso inapropriado de antimicrobianos, a falta de fiscalização efetiva no controle da venda de medicamentos em farmácias e o uso de antibióticos humanos para tratar animais (28).

Os antimicrobianos utilizados na produção animal, através da profilaxia, suplemento aditivo na alimentação, promoção de crescimento ou tratamentos contribuem para a seleção de linhagens resistentes. Os antimicrobianos que são utilizados no tratamento de doenças humanas, como anfenicóis, β -lactâmicos, quinolonas, sulfonamidas e tetraciclina não devem ser utilizados como aditivos alimentares, conservantes de alimentos para animais ou promotores de crescimento(29).

Sabe-se que os antimicrobianos não tornam um microrganismo resistente, mas destroem as bactérias sensíveis e selecionam as mais resistentes em uma população quando o tratamento adequado e a dose correta não são administrados (30).As

salmoneloses provocam gastroenterites auto limitantes em adultos, apresentando sintomas como diarreia, febre e cólicas abdominais. Na maioria dos casos, a utilização de terapia antimicrobiana não é necessária para estes casos. Porém, a *Salmonella* pode ser responsável por quadros de bacteremia e infecções sistêmicas, sendo necessária a utilização de antibióticos. A terceira geração das cefalosporinas e as fluoroquinolonas são normalmente o tratamento de escolha, seguido de antimicrobianos como amoxicilina, ampicilina, cloranfenicol e trimetoprim (31,32).

As mutações e a aquisição de novos genes podem codificar mecanismos de resistência e ser transmitidos de um microrganismo a outro, sem a necessidade de ambos serem da mesma espécie. Um exemplo disto é a inativação enzimática que confere ao microrganismo a capacidade de produzir β -lactamases, que clivam o anel β -lactâmico, fazendo com que ocorra a inativação do princípio ativo do medicamento, degradando ou modificando sua estrutura (33).

O principal mecanismo de resistência de bactérias Gram-negativas, como *Salmonella* spp. é produção de beta-lactamases, gerando resistência aos β -lactâmicos. O grau de resistência do microrganismo varia da capacidade da enzima em hidrolisar o antimicrobiano, da permeabilidade da membrana e da quantidade de enzima produzida pela bactéria. Diversos autores têm relatado um aumento da resistência aos antibióticos beta-lactâmicos, chamadas de bactérias produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) em *Salmonella* spp. Estas enzimas são capazes de degradar uma ampla gama de antibióticos, incluindo cefalosporinas de quarta geração. Pacientes com infecção por *E. coli* produtoras de ESBL foram tratados por períodos mais longos do que os infectados por *E. coli* não produtoras de beta-lactamases (34). Uma vez contaminado com uma bactéria produtora de ESBL resistente a antibióticos que são comumente utilizados para o tratamento de humanos, torna a terapia mais difícil e onerosa, sendo muitas vezes necessárias hospitalizações por períodos mais longos, pois é possível que a droga não seja suficiente para eliminá-la (35).

3. CAPÍTULO 1

ESBL production and biofilm formation in *Salmonella* serovars resistant to antimicrobial agents

Running title: *Salmonella* biofilm and ESBL-producing.

Jéssica Zolim Andreatto Mandelli¹, Alexandre Ehrhardt², Alana Patrícia da Silva³,
Bruna Weber⁴ Laura Beatriz Rodrigues¹ & Luciana Ruschel dos Santos¹

¹Program in Bioexperimentation, Universidade de Passo Fundo, Brazil.

²Graduate Program in Pharmacology and Therapeutics, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

³School of Biological Sciences, Universidade de Passo Fundo, Brazil.

⁴Graduate Program in Veterinary Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

*Corresponding author: jessica_andreatto@yahoo.com.br

ABSTRACT

BACKGROUND Antimicrobial resistance is a serious public health problem, and foodborne pathogens, especially *Salmonella* spp., are highly resistant to antimicrobial agents. Biofilms are important in the food industry due to their formation on products, utensils, and surfaces, difficulty in their removal, and source of contamination, in addition to the increase in resistance to antimicrobials used in the cleaning of establishments and in the treatment of foodborne diseases. **OBJECTIVES** To assess ESBL production, antimicrobial resistance, and biofilm production of 10 *Salmonella* serovars isolated from poultry slaughterhouses. **METHODS** Antimicrobial susceptibility was assessed by the disk diffusion assay proposed by Kirby & Bauer, following the Clinical and Laboratory Standards Institute M100-S25 document (CLSI 2015). The beta-lactamase inhibitor (amoxicillin+clavulanate) was placed at the center of the Mueller Hinton agar plate and the other disks (aztreonam and two third-generation cephalosporins – cefotaxime and ceftazidime) were placed within a radius of 20 mm from the beta-lactamase inhibitor. The following antimicrobials were tested: ampicillin, amoxicillin+clavulanate, aztreonam, ceftazidime, cefotaxime, chloramphenicol, gentamicin, enrofloxacin, sulfonamide, and tetracycline. **FINDINGS** Serovars Infantis, Panamá, and Tennessee were found to produce ESBL; eight serovars were resistant to sulfonamides, and four were resistant to enrofloxacin. All serovars were sensitive to tetracycline and serovar Brandenburg was sensitive to all drugs tested. Serovars Panamá, Anatum, Infantis, and Schwarzengrund were moderate biofilm producers at 3 °C and 9 °C±1 °C, respectively, showing possible adaptation of these serovars to these temperatures. **MAIN CONCLUSIONS** Antimicrobials should be used

with caution because of the levels of resistance observed and because of ESBL production, and hygiene and sanitary measures should be enhanced to minimize the adhesion of biofilm-forming *Salmonella* serovars at refrigeration temperatures.

Key words: *Salmonella*. ESBL. Drug resistance. Biofilms.

Antimicrobial resistance is one of the major public health problems worldwide and microorganisms, especially *Salmonella* spp., isolated from foods, show high resistance to these agents (Markle et al. 2015). Among the predisposing factors are the injudicious use of antimicrobials, lack of an effective control over the commercialization of drugs, and use of antibiotics targeted at humans in the treatment of animals (Schwarz et al. 2001).

Both mutations and the acquisition of new genes can encode resistance mechanisms and be transmitted from one microorganism to another without their belonging to the same species. A few microorganisms can produce β -lactamases, which cleave the β -lactam ring, inactivating the active ingredient of the drug as a result of degradation or modification of its structure, which is one of the resistance mechanisms of gram-negative bacteria such as *Salmonella* spp (Foley & Lynne 2008). The level of resistance varies according to the capacity of the enzyme to hydrolyze the antimicrobial, as well as to membrane permeability and to the amount of enzyme produced by the bacterium (Bradford 2001).

Bacteria of the genus *Salmonella* are ubiquitous, adapt to adverse environmental conditions, and can survive in the environment for long periods, colonizing wild species, domestic animals, and man. The most common sources of infection among humans are products of poultry origin, dairy products, and surfaces in contact with

contaminated products reused without proper disinfection, which could stimulate biofilm formation (Murray et al. 2015).

Biofilms are bacterial cell groups attached to biotic surfaces such as cells and tissues or to abiotic surfaces such as glass, polystyrene, and steel fiber, enveloped by an exopolysaccharide matrix, characterized by complex three-dimensional structures with high resistance to stressful environments (Flemming & Wingender 2010). The physicochemical properties of surfaces allow microorganisms to adhere to them, and hydrophobicity is of special concern, since more hydrophobic and rougher surfaces and food processing sites contribute to bacterial adhesion (Donlan & Costerton 2002).

Therefore, the present study assessed extended spectrum beta-lactamase (ESBL) production, antimicrobial resistance, and biofilm formation by *Salmonella* serovars isolated from poultry slaughterhouses with some potential impact on public health and animal production.

MATERIALS AND METHODS

Sampling and *Salmonella* serovars

The study was conducted at the Laboratory of Bacteriology and Mycology of the Veterinary Hospital affiliated with the School of Agronomy and Veterinary Medicine of Universidade de Passo Fundo (UPF). The following *Salmonella* serovars, previously isolated from poultry slaughterhouses located in southern Brazil, were tested: Agona, Anatum, Brandenburg, Bredeney, Infantis, Lexington, Panamá, Rissen, Schwarzengrund, and Tennessee (Santos et al. 2015), as shown in Table I.

Table I. *Salmonella* serovars and source of poultry slaughterhouse isolates.

<i>Salmonella</i> serovars	Source
<i>S. Agona</i>	Transport cages after cleaning
<i>S. Anatum</i>	Cloacal swabs
<i>S. Brandenburg</i>	Chilled broiler carcasses
<i>S. Bredeney</i>	Cloacal swabs
<i>S. Infantis</i>	Transport cages after cleaning
<i>S. Lexington</i>	Transport cages after cleaning
<i>S. Panamá</i>	Cloacal swabs
<i>S. Rissen</i>	Cloacal swabs
<i>S. Schwarzengrund</i>	Cloacal swabs
<i>S. Tennessee</i>	Chilled broiler carcasses

The samples were stored in brain heart infusion broth (Oxoid; Cambridge, UK) and frozen at -18 °C. The isolates were reactivated by the inoculation of aliquots into BHI broth, incubation at 35±2 °C for 24 hours, seeding onto xylose lysine deoxycholate agar (Oxoid; Cambridge, UK), and incubation at 36±1 °C. After 24 hours, the colonies were found to be compatible with *Salmonella* spp. and the genus was confirmed by triple sugar iron, lysine iron agar, sulfite indole motility, urea broth, and polyvalent anti-O antiserum tests.

Determination of phenotypic profile of antimicrobial susceptibility and ESBL production

Antimicrobial susceptibility was assessed by the disk diffusion assay proposed by Kirby & Bauer, following the Clinical and Laboratory Standards Institute M100-S25 document (CLSI 2015). The bacterial suspensions were prepared in sterile saline solution (0.85% NaCl) equivalent to a 0.5 McFarland standard (approximately 1.5×10^8 CFU/mL) and seeded with a sterile swab in five directions onto a Mueller Hinton agar plate, at an average 4-mm thickness. After seeding, the plates were pre-incubated for 5 minutes to remove excess moisture and the antibiotic disks were placed on the medium surface using flame-sterilized and cold-sterilized tweezers. Drug selection met the FDA guidelines for *Enterobacteriaceae* and the therapeutic or prophylactic use in industrial poultry production, as follows: ampicillin (10 µg), amoxicillin+clavulanate (20/10 µg), aztreonam (30 µg), ceftazidime (30 µg), cefotaxime (30 µg), chloramphenicol (30 µg), gentamicin (10 µg), enrofloxacin (5 µg), sulfonamide (300 µg), and tetracycline (30 µg).

The disk diffusion assay was used for testing ESBL production, following the CLSI M100-S25 document (CLSI 2015). The susceptibility test was performed using two disks containing third-generation cephalosporins, a beta-lactamase inhibitor, and a monobactam. The beta-lactamase inhibitor (amoxicillin+clavulanate) was placed at the center of the Mueller Hinton agar plate and the other disks (aztreonam and two third-generation cephalosporins – cefotaxime and ceftazidime) were placed within a radius of 20 mm from the beta-lactamase inhibitor, and the plates were incubated in a bacteriological incubator at 36 °C for 18 to 24 hours.

The diameters of the inhibition halos of each disk were measured using a caliper and the classification was made according to CLSI VET01-S2 (2014) and M100-S25

(2015) performance standards for inhibition halo sizes expected for *Enterobacteriaceae*, determining whether the microorganism was sensitive, moderately sensitive, or resistant to each of the tested drugs. ESBL production was considered positive when the formation of “inhibition zones” or an increase in inhibition halo size was observed. The quality control of antimicrobials was made with *Escherichia coli* ATCC 25922 incubated at 35 ± 2 °C for 20 to 24 hours and the positive control for ESBL production was obtained by using a *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 strain.

Biofilm-forming ability of *Salmonella* serovars

Biofilm-forming ability was assessed on polystyrene plates following the protocols proposed by Rodrigues et al. (2009). The isolates were transferred into 2 mL of tryptic soy broth (TSB) with 0.5% of sodium chloride and incubated at 36 °C for 24 hours. Dilutions in TSB equivalent to a 1 McFarland standard were obtained and 200 μ L of bacterial suspension of each sample was inoculated onto biologically inert flat-bottomed 96-well polystyrene plates, in triplicate, and sterile TSB was used as negative control and incubated for 24 hours.

The following incubation temperatures were chosen to mimic some of those recommended for poultry slaughterhouses: 3 ± 1 °C (temperature used for refrigeration of meat cuts, maximum 4 °C), 9 ± 1 °C (cutting room temperature for export to the European Union, maximum 10 °C), 25 ± 1 °C (ambient temperature), 36 ± 1 °C (optimal pattern for the growth of mesophiles), and 42 °C ± 1 °C (temperature for selective enrichment due to thermotolerance of *Salmonella* spp.)

After incubation, the bacterial suspensions were aspirated from the plates and each well was washed three times in 250 μ L of sterile 0.9% sodium chloride for

removal of planktonic cells. An aliquot of 200 μ L of methanol p.a. was added for 15 minutes to fixate the microbial cells, the methanol was then removed, and the extract was allowed to dry at ambient temperature. Thereafter, 200 μ L of 2% Hucker's crystal violet was added for 5 minutes in order to stain the microorganisms, and plates were washed under running water and left to dry at ambient temperature. Subsequently, the biofilm was resuspended in 300 μ L of glacial acetic acid for 15 minutes and absorbance was read at 550 nm in an ELISA device. The arithmetic mean of the absorbance values for each sample (ODa) was compared with the average absorbance of the wells containing noninoculated sterile TSB (OD) and the following classification was used to determine the level of adhesion: non-adherent: $ODa \leq OD$; weakly adherent: $OD < ODa \leq 2OD$; moderately adherent: $2OD < ODa \leq 4OD$; strongly adherent: $4OD < ODa$.

RESULTS

The serovars whose antimicrobial activity was categorized as intermediate were included in the group of resistant serovars for the analysis of their susceptibility to antimicrobials, according to WHO guidelines (WHO 2016). Thus, Table II displays ESBL production, the susceptibility profiles of *Salmonella* serovars, and their capacity to adhere to polystyrene at different incubation temperatures.

Table II. Sensitivity of *Salmonella* serovars, ESBL production, and adhesion to polystyrene at different incubation temperatures.

<i>Salmonella</i> serovars	Antimicrobial		Adhesion to polystyrene					
	resistance	ESBL production	3 °C±1 °C	9 °C±1 °C	25 °C±1 °C	36 °C±1 °C	42 °C±1 °C	
S. Agona	ENO, SUT	-	Non-adherent	Non-adherent	Weak	Non-adherent	Non-adherent	
S. Anatum	SUT	-	Weak	Moderate	Weak	Weak	Moderate	
S. Brandenburg	-	-	Weak	Weak	Moderate	Weak	Weak	
S. Bredeney	CLO, SUT	-	Weak	Weak	Moderate	Weak	Weak	
S. Infantis	ENO, GEN, SUT	Yes	Weak	Moderate	Moderate	Weak	Weak	
S. Lexington	SUT	-	Non-adherent	Non-adherent	Weak	Non-adherent	Weak	
S. Panamá	AMP, ENO, SUT	Yes	Moderate	Weak	Moderate	Weak	Non-adherent	
S. Rissen	SUT	-	Non-adherent	Non-adherent	Weak	Non-adherent	Weak	
S. Schwarzengrund	CLO, SUT	-	Weak	Moderate	Moderate	Weak	Weak	
S. Tennessee	ENO, GEN	Yes	Weak	Weak	Moderate	Weak	Weak	

Legend: AMP = Ampicillin 10 µg, CLO = Chloramphenicol 30 µg, GEN = Gentamicin 10 µg, ENO = Enrofloxacin 5 µg, SUT = Sulfonamides

300 µg, TET = Tetracycline 30 µg. ESBL = Amoxicillin+Clavulanate 20/10 µg, Aztreonam 30 µg, Cefotaxime 30 µg, Cefotaxime 30 µg.

Serovars Infantis, Panamá, and Tennessee were ESBL producers. Eight out of the 10 serovars were resistant to sulfonamides and four were resistant to enrofloxacin. All serovars were sensitive to tetracycline and serovar Brandenburg was sensitive to all tested drugs.

Note that serovar Panamá was a moderate biofilm producer at $3\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ compared to serovars Anatum, Infantis, and Schwarzengrund at $9\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, whereas six serovars were moderately adherent to polystyrene at $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. None of the assessed serovars showed moderate adhesion and consequent biofilm formation when incubated at $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ and only serovar Anatum adhered to polystyrene at $42\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

DISCUSSION

Serovars Infantis, Panamá, and Tennessee phenotypically demonstrated ESBL production, being resistant to amoxicillin+clavulanate, aztreonam, ceftazidime, and cefotaxime due to the formation of “inhibition zones” or to an increase in inhibition halo size, accounting for 30% of the assessed serovars (3/10). In the study undertaken by Ziech (2015), who also used the double disk diffusion test, 45% (44/98) of *Salmonella* samples collected from birds were ESBL producers.

A global increase in ESBL-producing *Salmonella* spp. is likely to be occurring, but although *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* are the most common ESBL-producing species and despite international committees recommend the method for phenotypic assessment, these enzymes have been detected in other enterobacteria (ECDC 2015, Resende 2015, Ziech 2015).

Regarding the method for detection of ESBL, the study of Nogueira-Miranda et al. (2012) is noteworthy since it compares six phenotypic tests performed in *Enterobacter* spp. for the detection of ESBL production, demonstrating 100% specificity and 89.2% sensitivity of the double disk diffusion assay for the Mueller-Hinton agar.

Resistance to sulfonamides was detected in 80% (8/10) of the tested serovars (Table II), at odds with the data obtained by Silva et al. (2014), according to whom 58.8% of 17 *Salmonella* serovars of poultry origin were resistant to these drugs. Sulfa drugs are among the most largely sold antimicrobials and are widely used in industrial poultry production. High resistance to these drugs is probably related to their extensive use, leading to an increase in the selective pressure on resistant strains and in the dissemination of resistance genes (ECDC 2015, WHO 2011, Machinski Junior et al. 2005).

Among the 10 serovars assessed, 40% (4/10) were resistant to enrofloxacin (Table II), a lower rate than that found by Colla et al. (2014), who observed that 61.5% of 39 *Salmonella* strains isolated from pork carcasses were resistant to this drug. Enrofloxacin belongs to the class of fluoroquinolones and is exclusively used in veterinary medicine; however, despite its restricted use, it has been shown that enrofloxacin-resistant bacteria can develop resistance to ciprofloxacin, for instance. Fluoroquinolones and quinolones play a crucial role in human clinical practice, as they are used in the treatment of severe infections caused by nonhuman microorganisms and are the main treatment option against salmonellosis (WHO 2011, Souza et al. 2010).

Resistance to chloramphenicol was found to be 20% (2/10), even though it cannot be used in animal production in Brazil since 2003 (Table II) (Brasil 2003). As this antimicrobial was used for many years in veterinary medicine, resistance to it might not have been reversed yet, or else, florphenicol, which is exclusively used by veterinarians, could be favoring the transmission of resistance genes that are common to these two antimicrobials (Mattiello et al. 2015, Nógrády et al. 2012).

Gentamicin also showed a resistance rate of 20% (2/10), consistent with the findings of Ziech (2015), who found that 15% of 98 *Salmonella* strains isolated from conveyor belts of cutting rooms were resistant to gentamicin. Gentamicin is an aminoglycoside that is widely

used in the treatment of infections in production animals, in incubators, and in the treatment against enterobacteria, and its large use may cause the dissemination of resistant strains. However, the use of gentamicin is restricted due to its toxicity and residual persistence in animal tissues (Neves 2014).

All tested serovars were sensitive to tetracycline, in line with the findings of Galdino et al. (2013), who observed that 18 *Salmonella* serovars in drag swabs from broiler flocks were also sensitive to the drug. Hence, it may be inferred that prohibiting the use of tetracyclines in animal feed for prophylactic purposes and as growth promoter caused bacterial resistance to this drug to decrease remarkably (Brasil 1992).

Serovars Anatum, Lexington, and Panamá; Agona and Tennessee; Schwarzengrund; and Infantis were considered to be moderately resistant to sulfonamides, enrofloxacin, chloramphenicol, and gentamicin, respectively. These are alarming findings as the assessed antimicrobials are widely used in veterinary and human medicine and also because the use of drugs with moderate resistance could result in the selection of a resistant bacterial population (Machinski Junior et al. 2005).

It should be also highlighted that even those serovars considered sensitive to a given antimicrobial are not totally inhibited by the usual concentration of the drug and therefore higher doses may be necessary, in agreement with WHO (2016) recommendation that serovars classified as intermediate should actually be deemed resistant to the active ingredient.

Aside from ESBL production and antimicrobial resistance, *Salmonella* serovars were capable of adhering to polystyrene, leading to biofilm formation. This piece of information is of relevance since serovars which remain in slaughterhouse premises and food products in the form of biofilm are a public health problem, owing to easy dissemination and to the fact that they belong to one of the bacterial genera most commonly found in foodborne diseases.

Note that serovars Panamá, Anatum, Infantis, and Schwarzengrund were moderate biofilm producers at 3 °C and 9 °C±1 °C, respectively, demonstrating a possible adaptation of these serovars to these temperatures. These findings are in line with those of Rodrigues et al. (2017), who tested biofilm formation in 170 *S. Enteritidis* strains isolated from poultry and observed biofilm formation at these temperatures, with strongly adherent strains.

These findings are relevant because these serovars adhered moderately to polystyrene at unfavorable temperatures for the multiplication of *Salmonella* spp., which is recommended as conventional method for food preservation under refrigeration (Gast 2008). In this respect, the Technical Standard for Technological and Hygiene-Sanitary Inspection of Poultry Meat determines that the temperature in cutting and/or deboning facilities should not exceed 12 °C and that refrigeration temperatures should be within 0 °C and 4 °C (carcasses, cuts or trimmings, offal and/or derivatives), with a tolerance limit of 1 °C, whereas the temperature of meats handled in the deboning room should not exceed 7 °C. Those establishments that export to the European Union (EU) should guarantee ambient temperature below 10 °C in their cutting rooms (Rodrigues et al. 2017).

The results obtained in the present study allow inferring that even if the recommended temperatures are complied with, there could be multiplication of *Salmonella* spp. in slaughterhouses and consequent contamination of the final products, which may lead to foodborne diseases if labeling of poultry products does not follow the recommendations. These recommendations are included in the Technical Standard for Instructions on Usage, Preparation, and Preservation in Labels of Poultry Meat and Uncooked, Refrigerated or Frozen Viscera (Brasil 2001), containing basic information on the maintenance of refrigerated products, thawing in refrigerator or microwave oven, maintenance of raw products away from other food items, washing of workbenches, utensils, and hands, and consumption of foods only after they are completely cooked, fried, or roasted.

Antimicrobials must be used with caution owing to the observed resistance levels and to ESBL production, and hygiene and sanitary measures should be strengthened in order to minimize the adhesion of biofilm-forming *Salmonella* serovars at refrigeration temperatures.

REFERENCES

- Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14 (4): 933-51.
- BRASIL. Portaria nº 159, de 23 de junho de 1992. Brasília, 1992.
- BRASIL. Resolução RDC nº 13, de 02 de janeiro de 2001.
- BRASIL. Instrução Normativa nº 9, de 27 de junho de 2003. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2003.
- CLSI. CLSI publication M100-S25 Suggested Grouping of US-FDA Approved Antimicrobial Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Nonfastidious Organisms by Clinical Laboratories, 2015.
- Colla FL, Mion L, Parizotto L, Santos LA, Pilotto F, Rodrigues LB, et al. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e eficácia de sanitizantes frente aos isolados de *Salmonella* spp. oriundos de carcaças suínas no Rio Grande do Sul. *Pesq Vet Bras.* 2014; 34 (4): 320-24.
- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15 (2): 167-93.
- ECDC. Fourth external quality assessment scheme for *Salmonella* typing. ECDC – Technical Report, 2015.
- Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8 (9): 623-33.

Foley SL, Lynne AM. Food animal-associated Salmonella challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. *J Anim Sci.* 2008; 86 (Suppl. 14): E173-87.

Galdino VMCA, Melo RT, Oliveira RP, Mendonça EP, Nalevaiko PC, Rossi DA. Virulence of Salmonella spp. of poultry products origin and antimicrobial resistance. *Biosci J.* 2013; 29 (4): 932-39.

Gast RK. *Salmonella* infections – Paratyphoid Infections. *In:* Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DA, Diseases of poultry. Ames: Blackwell Publishing Professional; 2008.

Machinski Junior M, Benini A, Netto DP, Nunes MP, Vedovello Filho D, Benatto A, et al. Medicamentos Veterinários Utilizados na Avicultura de Postura no Estado do Paraná. PAMvet-PR, 2005.

Markle WH, Fisher MA, Smego RA Jr. *Compreendendo a Saúde Global* - 2.ed. Porto Alegre: Artmed; 2015.

Mattiello SP, Drescher G, Barth VC Jr, Ferreira CA, Oliveira SD. Characterization of antimicrobial resistance in Salmonella enterica strains isolated from Brazilian poultry production. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2015; 108 (5): 1227-38.

Murray P, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiologia Médica*. Rio de Janeiro: Elsevier Health Sciences Brazil; 2015.

Neves GB. Diferenças na expressão gênica de isolados de campo e de frigorífico da *Salmonella* resistente aos antimicrobianos e desinfetantes. [Dissertação de Mestrado]. Lages: Universidade do Estado de Santa Catarina; 2014. 120 pp.

Nógrády N, Király M, Davies R, Nagy B. Multidrug resistant clones of *Salmonella* Infantis of broiler origin in Europe. *Int J Food Microbiol.* 2012; 157(1): 108-12.

Nogueira-Miranda Kda S, Palmeiro JK, Conte D, Maia FV, Reason IT, Monteiro CL, et al. Detection of extended-spectrum β -lactamase in *Enterobacter* spp. – evaluation of six phenotypic tests. *Microb Drug Resist.* 2012; 18 (1): 66–70.

Resende AR. Fatores de patogenicidade e estudo epidemiológico de *Salmonella* Minnesota de origem avícola. [Dissertação de Mestrado]. Uberlândia: Univerdade Federal de Uberlândia; 2015. 60 pp.

Rodrigues LB, Santos LR, Pilotto F, Silva CF, Gehlen SS, Diedrich LN, et al. Biofilm formation at different incubation temperatures by *Salmonella* Enteritidis. *Braz J Microbiol.* 2017.

Rodrigues LB, Santos LR, Rizzo NN, Tagliari VZ, Oliveira AP, Trenhago G, et al. Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola. *Acta Sci Vet.* 2009; 37: 225-30.

Schwarz S, Kehrenberg C, Walsh TR. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 17 (6): 431-7.

Santos LA, Mion L, Marotzki M, Parizotto L, Rodrigues LB, Nascimento VP, et al. Número mais provável miniaturizado e microbiologia convencional para isolamento de *Salmonella* spp. em abatedouros de frangos de corte. *Pesq Vet Bras.* 2015; 35(3): 223-29.

Silva CJ, Tejada TS, Timm CD. Resistência de *Salmonella* isoladas de humanos e de frangos a antimicrobianos. *RBHSA* 2014; 8 (4): 120-31.

Souza RB, Magnani M, Oliveira TCRM. Mecanismos de resistência às quinolonas em *Salmonella* spp. *Ciênc Agrárias* 2010; 31 (2): 413.

WHO. Critically important antimicrobials for human medicine. World Health Organization, 2011.

WHO. Antimicrobial resistance. WHO, 2016.

Ziech RE. Caracterização de *Salmonella* sp. isolada de indústrias de aves baseada na formação de biofilmes, tolerância a sanitizantes e resistência a antimicrobianos. [Dissertação de Mestrado]. Palotina: Universidade Federal do Paraná; 2015.

CONCLUSÕES

O estudo foi realizado para avaliar a capacidade de diferentes sorovares de *Salmonella* em aderir e formar biofilmes em poliestireno em diferentes temperaturas, bem como a resistência a antimicrobianos e produção de ESBL, sendo de grande relevância tanto para as indústrias de alimentos quanto para a saúde pública. Neste sentido, com os resultados obtidos neste trabalho, pode-se concluir que:

- a) Todos os sorovares testados aderiram ao poliestireno em pelo menos uma das condições ambientais avaliadas, sendo a maioria fracamente aderente;
- b) Na temperatura de 25°C, que mimetiza a temperatura ambiente, 50% dos isolados apresentaram-se moderadamente aderentes à placa de poliestireno podendo permanecer nas superfícies de manipulação de alimentos;
- c) Em relação aos testes de suscetibilidade a antimicrobianos, foi observada multirresistência em 30% das amostras, ou seja, resistência a pelo menos um antimicrobiano de três ou mais classes farmacológicas;
- d) Apenas o antimicrobiano Tetraciclina foi capaz de inibir o crescimento microbiano de 100% dos sorovares testados. A proibição do uso de tetraciclinas com finalidade profilática em rações e como promotor de crescimento pode ter acarretado esta redução significativa de resistência;
- e) Em 30% dos sorovares testados foi observado produção de enzima beta-lactamase de espectro estendido, através da formação de “zonas fantasmas” ou alargamento do halo de inibição dos discos.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estes resultados denotam grande relevância devido à possibilidade de permanência dos sorovares de *Salmonella* Agona, Anatum, Bredeney, Brandenburg, Infantis, Lexington, Panamá, Rissen, Schwarzengrund e Tennessee em ambientes de manipulação de alimentos na forma de biofilmes, devido ao aumento da capacidade de resistência a diversas temperaturas e condições ambientais. Adicionalmente, estes resultados devem ser utilizados como alerta para a implantação de programas de autocontrole efetivos na indústria avícola.

Os antimicrobianos devem ser utilizados com cautela, devido aos níveis de resistência encontrados. Sugere-se a necessidade de um monitoramento constante dos patógenos na indústria avícola. Ainda, a ausência de uma metodologia indicada por órgãos internacionais para avaliação fenotípica da produção de ESBL para *Salmonella* spp. pode estar dificultando a comparação em pesquisas e subestimando sua ocorrência.

6. REFERÊNCIAS

1. Kasper D, Fauci A. Doenças Infeciosas de Harrison. Porto Alegre: Artmed; 2015.
2. Merchant IA, Packer RA. Bacteriologia e Virologia Veterinária. Zaragoza: Acribia; 1980.
3. Sgarbieri VC. Proteínas em alimentos proteicos: propriedades-degradacoes-modificacoes. São Paulo: Varela; 2006.
4. Murray P, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiologia Médica. Rio de Janeiro: Elsevier Health Sciences Brazil; 2015.
5. Fischer MM. Contaminação microbiológica de alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos ocorridas no Estado do Rio Grande do Sul entre 2004 e 2012 [Internet]. 2013 [cited 2016 May 19]. Available from: <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/87565>
6. Case GJT| BRF| CL. Microbiologia. Porto Alegre: Artmed; 2012.
7. Grimont. Antigenic Formulae of the Salmonella Serovars. 9th Edition, World Health Organization Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella, Institut Pasteur, Paris. - Open Access Library [Internet]. 2007 [cited 2016 May 19]. Available from: <http://www.oalib.com/references/7887139>.
8. Ben Aissa R, Al-Gallas N, Troudi H, Belhadj N, Belhadj A. Trends in Salmonella enterica serotypes isolated from human, food, animal, and environment in Tunisia, 1994-2004. J Infect [Internet]. 2007 Oct [cited 2016 Jun 8];55(4):324–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17706289>.
9. Neto O de F, Angela H da, Soares N, Guastalli E, Almeida A de, Berchieri JA. Salmonella spp. in Meat-type Quails (*Coturnix coturnix coturnix*) in the State of São Paulo, Brazil. Rev Bras Ciência Avícola [Internet]. 2013 [cited 2016 Jun 8]. Available from: <http://www.redalyc.org/resumen.oa?id=179728536016>.
10. Brito NPM. CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE Salmonella enterica sorovar Panama DE ORIGEM AMBIENTAL. 2010.
11. Tsai KS, Yang YJ, Wang SM, Chiou CS, Liu CC. Change of serotype pattern of Group D non-typhoidal Salmonella isolated from pediatric patients in southern Taiwan. J Microbiol Immunol Infect [Internet]. 2007 Jun 1 [cited 2016 Jun 8];40(3):234–9. Available from: http://www.researchgate.net/publication/6199747_Change_of_serotype_pattern_of_Group_D_non-typhoidal_Salmonella_isolated_from_pediatric_patients_in_southern_Taiwan.
12. Buseti M, Longo B, Colonna F, Dibello D, Barbi E, Campello C. Case report: Salmonella panama osteomyelitis in a Ghanaian child with sickle cell disease. Pediatr

- Med Chir [Internet]. 2002 Jan [cited 2016 Jun 1]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12494543>.
13. Chen T-L, Thien P-F, Liaw S-C, Fung C-P, Siu LK. First report of *Salmonella enterica* serotype panama meningitis associated with consumption of contaminated breast milk by a neonate. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2005 Oct [cited 2016 Jun 1]. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1248486&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
 14. Andriva L, Mion L, Marotzki M, Parizotto L, Rodrigues LB, Pinheiro V. Número mais provável miniaturizado e microbiologia convencional para isolamento de *Salmonella* spp . em abatedouros de frangos de corte. 2015.
 15. Fernandes SA, Tavechio AT, Ghilardi ÂCR, Dias ÂMG, Almeida IAZC de, Melo LCV de. *Salmonella* serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* [Internet]. 2006 Aug [cited 2016 Jun 8]. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652006000400001&lng=en&nrm=iso&tlng=en.
 16. Bangtrakulnonth A, Pornreongwong S, Pulsrikarn C, Sawanpanyalert P, Hendriksen RS, Lo Fo Wong DMA, et al. *Salmonella* serovars from humans and other sources in Thailand, 1993-2002. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2004 Jan [cited 2016 Jun 8]. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3322742&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
 17. Kumar S, Sadana JR, Mishra SK. Studies on clinical signs, growth response and haematological changes in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) infected with *Salmonella typhimurium*. *Indian J Poult Sci* [Internet]. Indian Poultry Science Association; 2001 [cited 2016 Jun 8]. Available from: <http://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:ijps&volume=36&issue=3&article=027>.
 18. Castelijns GAA, Parabirsing J-A, Zwietering MH, Moezelaar R, Abee T. Surface behaviour of *S. Typhimurium*, *S. Derby*, *S. Brandenburg* and *S. Infantis*. *Vet Microbiol* [Internet]. 2013. [cited 2016 Jun 9]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22906529>.
 19. McGavin MD. *Bases da Patologia Em Veterinária*. São Paulo: Elsevier; 2013 [cited 2016 May 11].
 20. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* [Internet]. 1987 Jan [cited 2016 Apr 21]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3318676>.
 21. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* [Internet]. 2000 Jan [cited 2015 Dec 10]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11018124>.

22. Flemming H-C, Wingender J. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2010 Sep [cited 2016 Jul 10]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20676145>.
23. Boyen F, Eeckhaut V, Van Immerseel F, Pasmans F, Ducatelle R, Haesebrouck F. Quorum sensing in veterinary pathogens: Mechanisms, clinical importance and future perspectives. *Vet Microbiol* [Internet]. 2009 Mar 30 [cited 2016 Apr 9]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19185433>.
24. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2002 Apr [cited 2016 Jan 16]. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=118068&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
25. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* [Internet]. 2002 Jan [cited 2016 Jul 21]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12142477>.
26. Rodrigues LB, Santos LR Dos, Rizzo NN, Tagliari VZ, Oliveira AP De, Trenhago G, et al. Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella Heidelberg* isoladas de abatedouro avícola. *Acta Sci Vet*. 2009 (December 2008).
27. Markle WH, Fisher MA, Smego RA, Jr. *Compreendendo a Saúde Global - 2.ed.* Porto Alegre: Artmed; 2015.
28. Schwarz S, Kehrenberg C, Walsh TR. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2001 Jun [cited 2016 Jun 2]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11397611>.
29. BRASIL. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 26, DE 9 DE JULHO DE 2009 [Internet]. 2009. Available from: <http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1984822284>.
30. Trabulsi LR, Alterthum F. *Microbiologia*. 5ª Edição. Rio de Janeiro: Atheneu; 2008.
31. Ziech RE. Caracterização de *Salmonella* sp. isolada de indústrias de aves baseada na formação de biofilmes, tolerância a sanitizantes e resistência a antimicrobianos [Internet]. 2015 [cited 2016 Apr 20]. Available from: <http://dspace.c3sl.ufpr.br:8080/dspace/handle/1884/37368>.
32. Miriagou V, Tassios PT, Legakis NJ, Tzouvelekis LS. Expanded-spectrum cephalosporin resistance in non-typhoid *Salmonella*. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2004 Jun [cited 2016 Jun 2]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15194124>.

33. Foley SL, Lynne AM. Food animal-associated Salmonella challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. *J Anim Sci* [Internet]. 2008 Apr [cited 2016 Jun 2]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17878285>.
34. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. 2001 Oct [cited 2016 Apr 2], table of contents. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=89009&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
35. Neves GB das. DIFERENÇAS NA EXPRESSÃO GÊNICA DE ISOLADOS DE CAMPO E DE FRIGORÍFICO DE SALMONELLA RESISTENTE AOS ANTIMICROBIANOS E DESINFETANTES Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal na Universidade do Estado de. 2014.