**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Avaliação da capacidade de produção de biofilmes e detecção da
enzima KPC em *Salmonella* spp. isoladas de aviário e linha de
abate de aves**

Míriam Gonçalves Marquezini

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2015**

Míriam Gonçalves Marquezini
Bacharel em Ciências Biológicas

**Avaliação da capacidade de produção de biofilmes e detecção da enzima
KPC em *Salmonella* spp. isoladas de aviário e linha de abate de aves**
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador
Prof. Dra. **GILMA LUCAZECHI STURION**

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestra em Ciências. Área de concentração:
Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Marquezini, Míriam Gonçalves

Avaliação da capacidade de produção de biofilmes e detecção da enzima KPC em *Salmonella* spp. isoladas de aviário e linha de abate de aves / Míriam Gonçalves Marquezini. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.

66 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Biofilmes 2. *Salmonella* spp. 3. Carbapenêmicos 4. Resistência I. Título

CDD 664.93
M357a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICO

Aos meus pais Benedito e Joana, e ao meu
namorado Kleber pelo amor e confiança.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas conquistas e por sempre tomar conta do meu caminho.

Aos meus pais Benedito Marquezini e Joana D'arc Gonçalves Marquezini, por todo o esforço, carinho, amor e dedicação ao longo dos meus anos de vida.

Ao meu namorado Kleber Rodrigues, pelo amor, carinho, respeito, cumplicidade e acima de tudo paciência ao longo destes anos.

À minha irmã Caroline Gonçalves Marquezini Russo, meu sobrinho Daniel Marquezini Russo e minha sobrinha Júlia Marquezini Russo, pela motivação em todas as manhãs.

Ao Professor Dr. Ernani Porto (*In memoriam*) pela orientação, apoio e amizade.

À Professora Dra. Gilma Lucazechi Sturion por se mostrar presente em um momento tão delicado e com todo seu conhecimento e zelo ter transformado o meu sonho em realidade.

À Pesquisadora do Centro de Tecnologia de Carnes Dra. Renata Bromberg pelas longas conversas, orientações, conselhos e total apoio nesta fase.

Às Pesquisadoras do Centro de Ciência e Qualidade dos Alimentos Dra. Neliane Ferraz de Arruda Silveira e Ms. Margarete Okazaki, por sempre estarem ao meu lado e jamais desistirem do meu potencial.

Às minhas amigas do laboratório de microbiologia do CTC/ITAL pelas horas de auxílio no laboratório, conversas, risadas e pela compreensão das minhas atividades do mestrado.

Às minhas eternas amigas Fabiana Sabadini Resende, Cláudia Ap. Galusni Pagoto, Bruna Mariussi, Gláucia B. Francelin e Raquel Ruama pelas horas de conversa, almoços, desabafos, risadas e amizade sincera.

Aos meus sobrinhos Lucas Rodrigues Salvarani, Felipe Rodrigues e Guilherme Rodrigues pelos momentos de alegria, carinho e apoio nesta fase.

À Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", pelo aprendizado de todos esses anos.

Ao Centro de Tecnologia de Carnes do ITAL pela oportunidade de desenvolver meus conhecimentos e direcionar minha carreira profissional.

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos.”

Eleanor Roosevelt

SUMÁRIO

RESUMO	11
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 A Carne de Aves	17
2.2 <i>Salmonella</i> spp.	18
2.3 Mecanismo de patogenicidade	19
2.4 Estruturas relacionadas aos fatores de virulência	20
2.5 Epidemiologia e importância de <i>Salmonella</i> spp. na saúde pública	21
2.6 Antibióticos carbapenêmicos	22
2.7 Enzima carbapenemase	23
2.8 Métodos de verificação da resistência a carbapenêmicos	23
2.9 Biofilmes	24
2.10 Biofilmes na indústria de alimentos	24
2.11 Processo de adesão e formação de biofilmes	25
2.12 Métodos de detecção de biofilmes	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.1 Estirpes de <i>Salmonella</i> spp. utilizadas e preparo da suspensão inicial	29
3.2 Avaliação da resistência de <i>Salmonella</i> spp. a antibióticos carbapenêmicos .	31
3.3 Detecção do gene <i>bla</i> _{KPC}	33
3.4 Avaliação da produção de cápsula	34
3.5 Avaliação da produção de biofilme “in vitro”	35
3.6 Identificação dos genes relacionados aos fatores de virulência	38
4 RESULTADO E DISCUSSÃO	41
4.1 Avaliação da resistência de <i>Salmonella</i> spp. a antibióticos carbapenêmicos	41
4.2 Detecção do gene <i>bla</i> _{KPC}	42
4.3 Avaliação da produção de cápsula	43
4.4 Avaliação da produção de biofilme “in vitro”	44
4.5 Identificação dos genes relacionados aos fatores de virulência	46
5 CONCLUSÕES / CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
REFERÊNCIAS	55
ANEXO	63

RESUMO

Avaliação da capacidade de produção de biofilmes e detecção da enzima KPC em *Salmonella* spp. isoladas de aviários e linhas de abate de aves

De acordo com a *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO, 2013), o consumo mundial de carne de frango tem aumentado de maneira significativa nas últimas décadas. Por outro lado, a preocupação dos produtores de alimentos, com a inocuidade de seus produtos também tem aumentado na mesma proporção. Durante as etapas da operação de abate de maneira geral, as contaminações cruzadas são as principais causas de disseminação de microrganismos patogênicos nos produtos obtidos e causadores de gastroenterites no consumidor. Espécies da enterobactéria *Salmonella* se enquadram como um dos maiores riscos desse tipo de doença devido a sua associação com os inúmeros surtos ocorridos a nível mundial, após o consumo desses produtos. Algumas enterobactérias possuem um gene *bla_{KPC}*, que codifica a enzima carbapenemase, que confere resistência a antibióticos carbapenêmicos, agravando mais a situação. Alguns fatores de virulência encontrados nesse gênero de bactéria podem ainda estar associados a capacidade de adesão e formação de biofilmes em superfícies inertes, dificultando operações de higienização nas linhas de processamento. Assim sendo, a presente pesquisa objetivou a verificação da capacidade de estirpes de *Salmonella* spp isoladas de aviário e linha de abate de frangos de um frigorífico no estado do Rio Grande do Sul produzirem biofilmes e apresentarem resistência a antibióticos carbapenêmicos. Na avaliação da produção de biofilme, foi empregada a técnica de microplacas de polietileno e produção de cápsula segundo Stepanovic et al. (2004) e Rodrigues et al. (2006), respectivamente. Foram pesquisados os fatores de virulência de salmonelas, representados pelos genes *lpfA*, *agfA*, *sefA*, *invA*, *hilA*, *avrA*, *sopE*, *sivH*, e *spvC*, utilizando o método de Reação de cadeia de Polimerase (PCR), descrita por Borges et al. (2013). As estirpes foram submetidas ao teste de resistência a antibióticos carbapenêmicos pelo método de disco difusão com carbapenêmicos segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI* (2010) e pesquisa do gene de resistência a carbapenêmicos *bla_{KPC}*, pela técnica de PCR, segundo NAAS et al. (2007). Obteve-se quatro perfis genéticos das estirpes de *Salmonella* spp.: perfil 1: genes *ifpA*, *agfA*, *invA* e *avrA*; perfil2: genes *ifpA*, *agfA*, *sefA*, *invA* e *avrA*; perfil 3: genes *invA* e *avrA*; perfil4: genes *ifpA*, *agfA* e *invA*. Observou-se a resistência das estirpes somente ao antibiótico imipenen. Entre as 36 estirpes de *Salmonella* spp. isoladas, todas foram consideradas produtoras de biofilme *in vitro*, sendo que 69% destas, apresentaram-se como fortes produtoras, 25% como moderadas, e apenas 6% como fracas produtoras. O método Agar Vermelho Congo não se mostrou eficiente para teste presuntivo de produção de biofilme para estirpes de *Salmonella* spp. Não foi evidenciado o gene *bla_{KPC}* nas estirpes de *Salmonella* spp. isoladas na presente pesquisa.

Palavras-chave: Biofilmes; Resistência; Carbapenêmicos; *Salmonella* spp.

ABSTRACT

Evaluation of biofilm production capacity and detection of enzyme KPC *Salmonella* spp. isolated from aviary and slaughter line of chicken

According to *Food and Agriculture Organization of the United Nations* (FAO, 2013), the world consumption of meat of chicken has been higher significantly in the last decades. On the other hand, the concern of the food producers with the safety of their products also has increased in the same proportion. During the steps of the slaughter operation in general, cross contamination are the main causes of pathogenic microorganisms dissemination in the obtained products and the causes of gastroenteritis in the consumer. Species of the Enterobacter *Salmonella* fall as the highest risks of this kind of disease, due to their association with countless outbreaks which occurred worldwide, after the consumption of these products. Some enterobacter have a *bla*_{KPC} gene, which codes for the carbapenemase enzyme that confers resistance to carbapenems antibiotics, aggravating the situation. Some virulence factors found in this bacteria genes can also be associated to the ability of adherence and the formation of biofilms in inert surfaces, making it difficult the operations of sanitation in the processing lines. Thus, the present research aimed to verify the capacity of *Salmonella* spp. strains isolated from aviary and slaughter line of chicken in a fridge of Rio Grande do Sul state to produce biofilms and be resistant to carbapenems antibiotics. In the evaluation of biofilm production, it was used the polyethylene microplates and capsule production technique according to Stepanovic et al. (2004) and Rodrigues et al. (2006), respectively. The virulence factors of salmonella were researched, represented by the genes *lpfA*, *agfA*, *sefA*, *invA*, *hlyA*, *avrA*, *sopE*, *sivH*, e *spvC*, using the *Polymerase Chain Reaction* (PCR) method described by Borges et al. (2013). The lineages were submitted to the carbapenems antibiotic resistance test by the disk diffusion method with carbapenems according to the *Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI* (2010), and the research of the resistance to carbapenems gene *bla*_{KPC}, by the strains *Salmonella* spp.: profile 1: genes *ifpA*, *agfA*, *invA* and *avrA*.; profile 2: genes *ifpA*, *agfA*, *sefA*, *invA* and *avrA*; profile 3: genes *invA* and *avrA*; profile 4: genes *ifpA*, *agfA* and *invA*. It was observed the resistance of the strains only to the imipenem antibiotic. Among the other 36 cultures of *Salmonella* spp. isolated, all were considered to produce biofilm *in vitro*, of which 69% were strong producers, 25% moderate, and only 6% were low producers. The method Congo Red Agar was not efficient to the presumptive test of biofilm production for the *Salmonella* spp. strains. It was not evidenced the gene *bla*_{KPC} in *Salmonella* spp. strains isolates in this research.

Keywords: Biofilms; Carbapenems; Resistance; *Salmonella* spp.

1 INTRODUÇÃO

Os alimentos possuem diversos nutrientes sujeitos à contaminação por microrganismos, que utilizam estes compostos como fonte para seu crescimento e produção de metabólitos que promovem alterações sensoriais. Na indústria de alimentos muitas contaminações podem estar vinculadas à formação de biofilmes aderidos à linha de processamento, onde um ou vários microrganismos estão relacionados (JAY, 2005).

Os biofilmes são constituídos por microrganismos, materiais poliméricos extracelulares (polissacarídeos, proteínas, lipídeos) e resíduos do ambiente, inseridos em uma matriz polimérica e aderidos a uma superfície sólida, formando uma estrutura complexa de exopolissacarídeos e pequenos canais abertos por entre as microcolônias (CAPELLETTI, 2006).

A formação do biofilme inicia com a adesão das bactérias planctônicas à superfície, seguida pela proliferação e acúmulo de camadas de células que formam uma comunidade microbiana inserida em matriz de exopolissacarídeo, excretada pelos próprios microrganismos durante seu crescimento. A adesão e a formação do biofilme podem ser limitadas por características específicas do microrganismo, como por exemplo, a expressão dos fatores de virulência e produção da cápsula exopolimérica, ou do material aderente e do meio envolvendo o microrganismo (CAIXETA, 2008).

Os microrganismos inseridos no biofilme são mais resistentes à ação de agentes químicos e físicos empregados pela indústria de alimento durante as etapas de sanitização. Sob a forma de biofilmes, os microrganismos sobrevivem por longos períodos protegidos de situações adversas (KIM et al., 2005).

A *Salmonella* spp. é uma bactéria pertencente a família *Enterobacteriaceae* e sua presença em alimentos é um problema de saúde pública relacionado a graves intoxicações alimentares, sendo a principal responsável por vários surtos ao redor do mundo (WHO, 2005).

Tendo em vista, o impacto das salmoneloses de origem alimentar na sociedade, seu potencial de resistência a antibióticos e o risco constante da aderência desses microrganismos a superfícies, se faz necessário um estudo sobre

a produção de biofilmes por salmonelas isoladas de aviário e linha de abate de aves e o potencial de resistência destas culturas a antibióticos carbapenêmicos.

Os objetivos da presente pesquisa foram:

- a) Verificar a presença do gene *blaKPC* em culturas de *Salmonella* spp. isoladas de aviário e da linha de abate de frango e relacionar a resistência desse patógeno a antibióticos carbapenêmicos;
- b) Verificar a viabilidade de empregar o método do ágar vermelho congo utilizado como técnica presuntiva para produção de biofilme em culturas de *Staphylococcus aureus* para culturas de *Salmonella* spp.;
- c) Verificar a capacidade das culturas de *Salmonella* spp para a produção de biofilme in vitro;
- d) Identificar os genes responsáveis pela codificação dos fatores de virulência de linhagens de *Salmonella* spp. isoladas de aviário e da linha de abate de frangos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A carne de aves

O consumo mundial de carne de aves teve um elevado crescimento entre os anos de 2000 e 2011, que passou de 29,09Kg/ano por habitante a 47,38Kg/ano. Ao longo do ano de 2012 houve uma pequena retração, sendo o consumo estimado em 45Kg por habitante (ROCHA, 2006; UBABEF, 2013). O fator determinante para a alteração do consumo foi o econômico, pois os métodos de exploração na indústria agrícola e o desenvolvimento da tecnologia de abate permitiram produzir carne de aves a preços mais baixos do que outros tipos de carnes, tornando-as mais atrativas para o consumidor (GOKSOY et al., 2004).

Por se tratar de um alimento altamente nutritivo, a carne de frango pode apresentar uma elevada contaminação microbiana, com microrganismos patogênicos e deteriorantes. Estes últimos, representam a causa mais frequente das alterações físicas e sensoriais, que através de seu metabolismo secretam enzimas responsáveis pela decomposição de proteínas e açúcares. Os microrganismos mais relevantes em carne de aves no geral são: *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* (MORENO, 2006).

Os microrganismos patogênicos e os deteriorantes são introduzidos na cadeia da carne por meio das próprias aves ao adentrarem nos abatedouros, disseminando-se pelas instalações, equipamentos e utensílios (MORENO, 2006). Durante as etapas do abate, as contaminações cruzadas são responsáveis pela disseminação dos microrganismos, cuja quantidade nas carnes frescas e produtos cárneos pode ser suficiente para provocar, nos consumidores, gastroenterites e doenças de origem alimentar (BERRANG et al., 2000). A contaminação das carcaças de frango e a sua extensão dependem de dois fatores: a higiene do abatedouro e dos processos adotados, e das condições sanitárias das aves destinadas ao abate (ROSTAGNO et al., 2006). As operações de abate como a depenagem, evisceração e o "chiller" têm sido consideradas as maiores fontes de contaminação das carcaças de aves. Nestas etapas são muito frequentes as contaminações cruzadas. As patas e penas sujas com fezes também são veículos de transporte desses microrganismos para o ambiente de abate. Assim, vários

fatores contribuem para a fácil contaminação da carne de aves (SARCINELLI et al., 2007). Destaca-se a presença de *Salmonella* spp. no papo e moela da ave cuja ruptura contribui para a contaminação das carcaças e a disseminação interna e externa destas com material fecal (SMITH et al., 2007). Associa-se aos fatores citados o difícil controle dos microrganismos durante as operações de abate, devido às limitações de “*design*” dos equipamentos de depenagem e evisceração, à dificuldade de lavar a cavidade abdominal após a evisceração, visto que a retenção de água na pele, facilita a entrada das bactérias nas fendas e folículos (GOKSOY et al., 2004).

Pode-se considerar, então, que as operações de abate, conservação e manipulação da carne de aves até o seu consumo devem ser efetuadas de modo que garantam a estabilidade da vida útil da carcaça. Para a carne não existe um tratamento eficiente sem alterar a sua qualidade sensorial e os efeitos alcançados com os procedimentos de higiene, utilizando água quente, não garantem a segurança do alimento (BERRANG et al., 2000).

De acordo com o Relatório Anual Preliminar de Notificações da União Europeia, a carne de frango e os produtos a base de frango aparecem como a principal fonte de notificações de *Salmonella* spp. em doenças de origem alimentar, sendo o Brasil um dos principais envolvidos (EUROPEAN COMMISSION, 2014).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) possui dois programas de monitoramento da qualidade em aves, sendo que ambos buscam a redução e prevenção dos principais agentes infecciosos em aves e no ser humano. Um desses é o Programa Nacional de Sanidade Agrícola (PNSA) e o outro é o Programa de Redução de Patógenos (PRP), que através de medidas de controle na cadeia de processamento de aves procuram obter alimentos inócuos (BRASIL, 1994; BRASIL, 2003).

2.2 *Salmonella* spp.

As salmonelas estão distribuídas na natureza, sendo seu principal reservatório o trato intestinal do homem e animais de sangue quente e frio, exceto peixes, moluscos e crustáceos, os quais podem contaminar-se após a pesca. Entre os animais, as aves como as galinhas, os gansos, perus e os patos são os

reservatórios mais importantes desse microrganismo. (MACHADO & BERNARDO, 1990; FRANCO & LANDGRAF, 1996).

Uma classificação do gênero *Salmonella* o divide em duas espécies: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, sendo bastonetes Gram-negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos e oxidase negativos (SILVA et al., 2007). A espécie *Salmonella enterica* é subdividida em seis subespécies, designadas por números romanos, onde aproximadamente 99.5% dos sorotipos mais comumente isolados pertencem à subespécie enterica (FERREIRA & CAMPOS, 2008).

2.3 Mecanismo de patogenicidade

A dose infectante de uma toxinfecção alimentar por *Salmonella* spp. pode variar de 10^5 a 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC), mas este valor pode ser menor (10^3 UFC) para imunocomprometidos, crianças e idosos. Os primeiros sintomas incluem quadros entéricos agudos ou crônicos, infecções septicêmicas, artrite, osteomielite, etc. A idade do paciente pode determinar o sorovar presente, como por exemplo *S. Infantis* e *S. Agona* que estão fortemente envolvidas em infecções graves em crianças (FONSECA et al., 2006)

O mecanismo de patogenicidade inicia-se com a ingestão via oral do alimento contaminado, algumas células passam pela acidez estomacal, chegam ao intestino, invadem a mucosa intestinal, disseminam-se para a submucosa causando a enterocolite aguda. Este quadro clínico apresenta diarreia moderada, sem a presença de sangue, porém, em alguns casos pode ocorrer a perda de pequeno volume deste nas fezes (FERREIRA & CAMPOS, 2008).

A facilidade que as cepas de *Salmonella* spp. possuem em se locomover através do sistema retículo-endotelial e a adaptação de multiplicação no interior dos macrófagos possibilitam sua rápida disseminação no organismo. Em pacientes aidéticos a incidência de infecção gastrointestinal encontra-se entre 20 e 60% (FONSECA et al., 2006).

As culturas de *Salmonella* spp. possuem virulência multifatorial, apresentam mobilidade, habilidade de penetrar e replicar em células epiteliais, produção de enterotoxina, citotoxina e endotoxina, sendo o quadro clínico determinado pelo papel de cada uma destas toxinas. Alguns sorovares apresentam uma região de DNA exógeno da bactéria que é mediada por um plasmídeo que contém os genes responsáveis pelos fatores de virulência denominada Ilha de Patogenicidade - PAI, (VIEIRA, 2009).

2.4 Estruturas relacionadas aos fatores de virulência

Algumas estruturas encontradas nas bactérias estão fortemente relacionadas aos fatores de virulência. A formação destas estruturas está condicionada a ativação de genes plasmidiais, encontrados nas PAI, que podem ou não estar vinculados a condições de estresse bacteriano (VIEIRA, 2009).

O lipopolissacarídeo (LPS) é parte constituinte da parede das bactérias Gram negativas e está dividido em três porções: cadeia de polissacarídeos (antígeno O), oligossacarídeos e molécula lipídica. O fator de virulência do LPS está relacionado a molécula lipídica, considerada uma endotoxina, e que no hospedeiro causa febre, hipotensão, choque séptico e morte (FERREIRA & CAMPOS, 2008).

Alguns gêneros de *Salmonella* spp. possuem em sua estrutura flagelos que conferem mobilidade à célula. De acordo com Van Asten e Van Dijk (2005) a variação da fase flagelar pode estar relacionada com a capacidade das cepas de salmonela não serem inativadas pelo hospedeiro.

As fímbrias são estruturas menores que os flagelos, compostas por uma proteína estrutural, a pilina e encontram-se distribuídas ao longo das células bacterianas. São responsáveis pela fixação da bactéria em seu hospedeiro e superfícies, sendo um dos principais indicativos para a primeira etapa de formação de biofilme. Classificam-se em três tipos: fímbria codificada por um plasmídeo *Plasmid Encoded Fimbriae* - PEF, fímbria polar longa - LPF e a fímbria agregativa AGF. Estudos demonstraram que os tipos diferentes de fímbrias estão relacionados a adesão em diferentes células e superfícies. Os genes que codificam a formação das fímbrias são o *lpfA*, *agfA* e *sefA* (GIBSON et al., 2007).

Os fatores relacionados a invasão e persistência intestinal estão vinculados ao Sistema de Secreção tipo III e a PAI. Nas cepas de *Salmonella* spp. o sistema serve como um canal para a secreção de proteínas efetoras no interior da célula, causando infecção bacteriana. Os genes relacionados com a invasão celular são *invA*, *hilA* e *sivH* e os genes relacionados a produção de proteínas efetoras são *avrA* e *sopE* (VAN ASTEN & VAN DIJK, 2005).

Associado também aos fatores de virulência em *Salmonella* spp., encontra-se o gene *spvC*. Este gene localizado em uma porção plasmidial confere virulência à bactéria amplificando sua capacidade de multiplicação no hospedeiro (VAN ASTEN & VAN DIJK, 2005).

2.5 Epidemiologia e importância de *Salmonella* spp. na saúde pública

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde, realizou um estudo em 14 estados, com uma unidade amostral de 2.710 frangos analisados entre 2004 e 2006, e traçaram o perfil preliminar de resistência bacteriana aos antibióticos utilizados na produção de frango. Nas linhagens isoladas de *Salmonella* spp. foi encontrada uma prevalência de 3,03%, de cepas resistentes, sendo que 250 foram submetidas a caracterização antigênica, 18 sorovares isolados, dos quais destacaram-se *S. Enteritidis* (48,8%), *S. Infantis* (7,6%), *S. Typhimurium* (7,2%), *S. Heidelberg* (6,4%) e *S. Mbandaka* (4,8%) (ANVISA, 2012).

Os casos de salmonelose em humanos provocam gastroenterites caracterizadas por diarreia, febre e cólicas abdominais, sendo necessária a utilização de antibióticos em seu tratamento somente nos casos severos de infecções sistêmicas (BOXSTAEL et al., 2013). Os antibióticos mais utilizados anos atrás eram a ampicilina, sulfametoxazol-trimetoprim e cloranfenicol, mas uma ocorrência cada vez maior de cepas resistentes a esses agentes provocou mudanças no tratamento, sendo que hoje o grupo das fluoroquinolonas, carbapenêmicos e terceira geração de cefalosporinas são os mais utilizados (ANVISA, 2012).

2.6 Antibióticos carbapenêmicos

Os antimicrobianos carbapenêmicos pertencem ao grupo de antibióticos beta-lactâmicos nos quais o átomo de enxofre no anel tiazolidínico da molécula de penicilina é substituído por um átomo de carbono. Tienamicinas integram um subgrupo de carbapenêmicos que têm um átomo de enxofre como o primeiro componente da corrente lateral (ANVISA, 2012). A partir de 1980, o imipenem, meropenem e ertapenem foram indicados como alternativas terapêuticas de última escolha em casos de infecções graves provocadas por bactérias Gram-negativas resistentes a outros antibióticos. Os carbapenêmicos formam um dos principais conjuntos terapêuticos de amplo espectro contra infecções causadas por bactérias Gram-negativas, como as *Enterobacteriaceae*, e os bacilos Gram-negativos não fermentadores da lactose como o *Acinetobacter* spp. e a *Pseudomonas aeruginosa*. Esta característica está relacionada a sua estabilidade a hidrólise das enzimas beta lactamases (SHA, 2008; ZHANEL et al., 2007).

Bactérias produtoras de outras enzimas beta lactamases, como por exemplo, ESBL, CTX-M, TEM, AmpC, e CMY, podem apresentar resistência a carbapenêmicos quando associadas a outros mecanismos, como a alteração na permeabilidade da membrana externa (LIVERMOR & WOODFORD, 2006).

Os carbapenêmicos ertapenem, imipenem e meropenem, apresentam atividade microbiana diferenciada. O meropenem possui resposta superior contra bactérias Gram-negativas, o imipenem, superior contra Gram-positivos, o ertapenem não apresenta ação contra *Pseudomonas aeruginosa*. A variação da atividade microbiana está relacionada ao mecanismo de ação de cada antibiótico (MITSUGUI et al., 2009; GALES et al., 2002).

Sua utilização não criteriosa em hospitais e clínicas permitiram o elevado surgimento de bactérias resistentes, superinfecções por fungos oportunistas e o alto índice de mortalidade de pacientes críticos por sepse grave e choque séptico. As dificuldades para interrupção e/ou adequação da antibioticoterapia em pacientes com infecções de alta gravidade tem-se associado ao aumento do tempo de uso de carbapenêmicos em internados em UTI e ao agravamento da multirresistência microbiana nos hospitais (TSAKRIS et al., 2009).

2.7 Enzima carbapenemase

Isolada primeiramente em *Klebsiella pneumoniae*, no estado da Carolina do Norte, nos Estados Unidos em 1996, a enzima carbapenemase recebeu o nome de KPC. Tornou-se emergente quanto à saúde pública mundial com sua rápida disseminação em outros países (TSAKRIS et al., 2009).

No Brasil, bactérias produtoras de carbapenemases foram registradas pela primeira vez em 2005, mas somente em 2010 passaram a causar surtos no país. O Distrito Federal foi o principal foco das infecções em 2010, com aumento das notificações de casos em 68% de 2010 (426) para 2011 (715), e registro de 56 óbitos. No Espírito Santo, foram confirmados 7 casos em 2010 e 37 casos em 2011, com 9 óbitos. O estado de Santa Catarina registrou 3 casos em 2010, e 43 com três óbitos em 2011 (BRASIL, 2008). Em Campinas, houve um surto em 2013 no Hospital das Clínicas da Unicamp, onde foram registrados 11 casos e nenhum óbito (ESTADÃO, 2013).

O gene plasmidial que codifica a enzima KPC, identificado como *blaKPC*, é transmissível entre as espécies da família Enterobacteriaceae (MARTINS et al., 2010). Por ser um gene localizado em um plasmídeo móvel, é facilmente transferido entre bactérias da mesma espécie ou entre espécies diferentes durante etapas de crescimento. Onze diferentes variantes KPC foram isoladas até o presente momento, sendo a KPC-2 e KPC-3 as mais comuns no Brasil, sendo que, a diferença entre as enzimas está na substituição de um ou dois aminoácidos (ROBLEDO et al., 2010; WHO, 2013).

2.8 Métodos de verificação da resistência a carbapenêmicos.

Os métodos analíticos para a detecção de KPC são diversificados como a focalização isoelétrica, disco-difusão, teste de Hodge modificado, dentre outros. A detecção do gene *blaKPC* por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) também pode ser empregada em conjunto com a sensibilidade via disco-difusão, pois muitas bactérias podem conte-lo, mas o mesmo não estar expresso (BRASIL, 2008).

2.9 Biofilmes

O primeiro relato sobre biofilmes foi realizado no século XVII por Antoni Van Leeuwenhock que observou, com auxílio de um microscópio primitivo, uma placa em dentes humanos. Somente no século XIX, John William Costerton descreveu a primeira teoria, considerando que células de bactérias sésseis poderiam se aderir em superfícies, interagir entre si e formar biofilmes (AGLE, 2007).

O biofilme pode ser descrito como uma comunidade microbiana formada a partir de uma ou de múltiplas espécies de microrganismos, aderidas a superfícies de uma forma isolada ou combinada. Esta complexa interação microbiana está associada a seus produtos extracelulares (constituídos por uma matriz polimérica) e encontram-se aderidos a uma superfície biótica ou abiótica. O interior do biofilme é subdividido em microcolônias e microcanais que permitem a circulação de nutrientes e outros fluidos (TRAVAGIN, 2010).

Acredita-se que um dos fatores iniciadores da formação de biofilme é o sistema "*quorum sensing*", responsável pela comunicação entre as bactérias coordenação de uma população na realização de uma função em particular. Este sistema é iniciado quando os microrganismos são submetidos a condições adversas e tem como função sua sobrevivência e proteção (CHOI et al., 2007; MILLER et al., 2004).

2.10 Biofilmes na indústria de alimentos

Ao longo das etapas de processamento dos alimentos, resíduos e contaminantes da própria matéria-prima são frequentemente encontrados dispersos nas superfícies. Durante as etapas de higienização, algumas falhas podem permitir que estes resíduos permaneçam nas superfícies, tornando-as uma fonte potencial para aderência de microrganismos e produção de biofilmes (MACEDO, 2006). O biofilme aderido às superfícies das indústrias de alimentos é uma das principais causas de deterioração e de perdas de produtos processados e "*in natura*" (PIRES et al., 2006)

Na indústria de carnes, os biofilmes podem ser encontrados em equipamentos fechados e de difícil acesso como *cutter*, embutideira, funil de descascamento, esteiras, calhas de gotejamento, escovas de depenagem, *chiller*, entre outros (MORENO, 2006).

2.11 Processo de adesão e formação de biofilmes

A formação de um biofilme pode ser dividida em cinco etapas distintas (Figura 1).

Figura 1 - Processo de adesão e formação de biofilmes em superfícies, dividido em quatro etapas: a) pré-adesão do microrganismo no substrato; b) adesão reversível; c) adesão irreversível com produção de EPS; d) incorporação de novos grupos de microrganismos e e) maturação do biofilme e início da liberação de células planctônicas

Fonte: Adaptado de Forsythe (2002)

Na primeira etapa, ocorre a pré-adesão, onde os microrganismos, na sua forma de vida planctônica, recebem algum estímulo para se aderir em superfícies. Fatores podem influenciar esse processo, como o pH, concentração e biodisponibilidade de nutrientes, autoindutores do “*quorum sensing*”, presença de compostos orgânicos, inorgânicos e temperatura (ZERAUK, 2009).

Durante a segunda etapa, chamada de adesão reversível, ocorre a interação celular com a superfície de suporte e sua colonização inicial. O processo de adesão depende de alguns fatores, como os flagelos, fímbrias e pili da bactéria e o

substrato. Esta adesão é considerada reversível, pois é possível observar o retorno de células aderidas ao seu estado planctônico. As principais forças deste evento são as pontes de hidrogênio, Van der Waals, ácido-base de Lewis e hidrofobicidade. Alguns relatos indicam que a produção de exopolissacarídeos pode ser iniciada após 15 minutos de contato entre célula e a superfície (FORSYTHE, 2002).

Na terceira etapa, ocorre a adesão irreversível, que acontece, aproximadamente, duas horas após a adesão inicial, e se caracteriza pelo aspecto “amontoadado” das células aderidas entre si e à superfície. A motilidade das células cessa a partir do início desta etapa e os genes envolvidos na comunicação célula-célula “*quorum sensing*” e na produção de exopolissacarídeos (EPS) são ativados. A principal força de ligação célula-superfície é conferida pela matriz de EPS (BOARI, 2008);

A maturação ocorre na quarta etapa de formação do biofilme e garante uma maior estabilidade a este sistema. Pode ser considerada como a etapa correspondente à maturação da estrutura que já vem sendo formada. Ocorre de três a seis dias após a adesão inicial, podendo se estender até o 10º dia. Acontece por meio do aumento da densidade populacional e também, pela elevada produção e deposição de EPS, aumentando a espessura do biofilme e a estabilidade da colônia contra alterações ambientais (FORSYTHE, 2002).

Na última etapa ocorre a liberação de células móveis localizadas no interior do biofilme, que disseminam a contaminação os alimentos que entrarem em contato com esta superfície. O tempo médio de destacamento de células é de 12 dias após o início do processo (FORSYTHE, 2002).

2.12 Métodos de detecção de biofilmes

Para a detecção de biofilmes são utilizados métodos microbiológicos, químicos, microscópicos e de biologia molecular. Os métodos práticos para avaliar as superfícies de trabalho frente a estes microrganismos permitem estabelecer protocolos específicos de limpeza. O monitoramento dos processos utilizando-se técnicas culturais realizados por meio de amostras de suabe, lavagens de superfícies e placas de contato direto nem sempre é representativo dos

microrganismos presentes nos biofilmes, se consideradas as linhas de abate e processamento com instalações antigas (LELIEVELD et al., 2005).

Os métodos químicos utilizados para se verificar a presença de biofilmes são indiretos, baseados na utilização ou produção de compostos específicos como os polissacarídeos, proteínas ou ATP. A medição do ATP é um método de luminescência baseado na reação luciferina-luciferase, onde o ATP contido nos biofilmes é proporcional ao número de células existentes e fornece informação sobre a sua atividade metabólica. Por meio desse método é possível se identificar as células de bactérias viáveis aderidas ao biofilme.

A técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) apresenta a vantagem da possibilidade de visualização das células diretamente da superfície. A desvantagem do método encontra-se na necessidade de remover a superfície para o laboratório, uma alternativa inviável para a indústria. O método de MEV é indicado em casos onde o estudo seja realizado em superfícies, por exemplo, inox, pvc e borracha e se faça necessária a confirmação visual da fixação das bactérias e produção do EPS (LELIEVELD et al., 2005).

O método do Ágar Vermelho Congo (AVC) é utilizado em culturas de *S. aureus* por ser rápido e alternativo para a verificação da capacidade de produção de biofilme através da confirmação da presença da cápsula. Para este método recomenda-se a utilização de Ágar Infusão de Cérebro e Coração (BHI) suplementado com 0,08% de Vermelho Congo. Após o período de incubação é possível visualizar o indicativo da produção de cápsula, através do crescimento das culturas com coloração preta. Este método foi testado somente com culturas de *S. aureus* (FREEMAN et al., 1989; FREITAS et al., 2010).

Para o gênero *Salmonella* spp. não existe um método de biologia molecular indicado, mas estudos relacionam a ativação de genes codificadores de fatores de virulência como responsáveis por algumas etapas na formação de biofilme, como por exemplo, o gene *ipfA*, *agfA*, *sefA* como promotores da fixação da bactéria em superfícies (BORGES et al., 2013; VAN ASTEN & VAN DIJK, 2005)

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no laboratório de microbiologia do Centro de Tecnologia de Carne (CTC), pertencente ao Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), no período de janeiro de 2014 a abril de 2015.

3.1 Estirpes de *Salmonella* spp. utilizadas e preparo da suspensão inicial

As estirpes de *Salmonella* spp. utilizadas no experimento foram obtidas da coleção do Laboratório de Microbiologia do Centro de Tecnologia de Carnes (CTC), pertencente ao Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL), isoladas previamente de amostras coletadas em um aviário e abatedouro de aves nos locais apresentados na Tabela 1. Essas estirpes foram mantidas em ultrafreezer a -82°C em criotubos contendo Caldo Triptona de Soja (TSB) suplementado com 30% de glicerol.

As estirpes selecionadas foram descongeladas em geladeira convencional. A ativação foi realizada a partir da inoculação de 1mL em 10mL de caldo TSB, incubado a 35°C por 24h e estocados até o uso em geladeira a 8±1°C (UZUNOVA-DONEVA & DONEV, 2005).

Para o experimento, as estirpes foram reativadas com duas transferências sucessivas, sendo a primeira para tubos contendo Caldo TSB, com incubação a 35°C por 24h e a segunda transferência para tubos inclinados com Ágar Triptona de Soja (TSA), também com incubação a 35°C por 24h. durante estas etapas foram realizados testes de coloração de Gram e sorologia somática para controle das estirpes.

Tabela 1 - Origem das estirpes de *Salmonella* spp. integrantes da pesquisa

Codificação das Estirpes	Local de isolamento
1	Propé de cama de aviário
2	Propé de cama de aviário
3	Propé de cama de aviário
4	Propé de cama de aviário
5	Propé de cama de aviário
6	Propé de cama de aviário
7	Propé de cama de aviário
8	Propé de cama de aviário
9	Propé de cama de aviário
10	Propé de cama de aviário
11	Propé de cama de aviário
12	Propé de cama de aviário
13	Propé de cama de aviário
14	Propé de cama de aviário
15	Propé de cama de aviário
16	Propé de cama de aviário
17	Propé de cama de aviário
18	Propé de cama de aviário
19	Propé de cama de aviário
20	Propé de cama de aviário
21	Propé de cama de aviário
22	Intestino de pintinho
23	Intestino de pintinho
24	Intestino de pintinho
25	Intestino de pintinho
26	Pele de pescoço após depenação
27	Pele de pescoço após depenação
28	Pele de pescoço após depenação
29	Pele de pescoço após depenação
30	Pele de pescoço após depenação
31	Pele de pescoço após depenação
32	Frango Resfriado
33	Frango Resfriado
34	Frango Resfriado
35	Frango Resfriado
36	Frango Resfriado

Na preparação da solução bacteriana, a estirpe foi suspensa em solução salina 0,85%, agitado em Vortex (AP56, Phoenix) por aproximadamente 1min e a turbidez obtida foi aferida utilizando-se o equipamento Densimat (Ref. 99 234, Biomerieux) até a leitura de 0,5 McFarland (Figura 2). Desta forma foi obtida uma solução bacteriana de 10^8 UFC de *Salmonella* spp. por mL. Para aferir a contagem real das células em suspensão, foi realizada a contagem por plaqueamento em profundidade em TSA, com incubação a 35°C por 24h (DOWNES & ITO, 2001).

Figura 2 – Equipamento utilizado para ajustar a turbidez da suspensão do inóculo (Densimat)
Fonte: Acervo pessoal

3.2 Avaliação da resistência de *Salmonella* spp. a antibióticos carbapenêmicos

As estirpes foram submetidas ao teste de resistência a antibióticos carbapenêmicos pelo método de disco difusão com carbapenêmicos segundo Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI (2010).

Após o ajuste da concentração do inóculo (que ocorreu dentro de no máximo 15 minutos), mergulhou-se um suabe de algodão estéril na suspensão. O suabe sofreu rotação várias vezes e foi pressionado firmemente contra a parede interna do tubo, acima do nível do líquido, para retirar o excesso de inóculo. A superfície seca

da placa de Petri contendo o ágar Müller-Hinton foi inoculada deslizando-se suabe em toda a superfície estéril do ágar. Repetiu-se o procedimento deslizando-se outras duas vezes, girando a placa aproximadamente 60° cada vez, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo e ao final, passou-se o suabe na margem interna da placa de ágar.

O conjunto de antimicrobianos (imipenem, meropenem, ertapenem) na concentração de 10µg em discos foi colocado na superfície da placa de ágar semeada. Cada disco inoculado foi manualmente distribuído por igual, de maneira que a distância de centro para centro não excedeu 24mm (Figura 3). As placas foram invertidas e colocadas numa estufa, a 35°C, até 15min após a aplicação dos discos. Após 16-18 horas de incubação, examinou-se cada placa. Foi realizada a medição dos halos de inibição com o auxílio de uma régua e, os resultados, comparados às tabelas A2 e 2I disponíveis no M23 — *Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters* do CLSI (2010) para classificação quanto a resistência.

Figura 3 - Semeadura dos antibióticos na placa de Petri de ágar Müller-Hinton
Fonte: Acervo pessoal

3.3 Detecção do gene *bla_{KPC}*

O gene *bla_{KPC}* responsável pela codificação da enzima carbapenemase, foi selecionado para o estudo por ser o mais indicado no estudo de resistência a antibióticos carbapenêmicos (imipenem, meropenem e ertapenem) NAAS et al. (2005).

Na detecção do gene *bla_{KPC}* empregou-se a técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), realizada paralelamente ao teste de disco difusão com carbapenens.

Para a extração do DNA, foi realizada a transferência de 1mL da cultura ativa e padronizada na escala de 0,5 McFarland para um tubo tipo eppendorf. O tubo foi submetido à centrifugação por 4min a 9000rpm, em centrífuga de bancada (Q222E24, Quimis), o sobrenadante descartado e o *pallet* ressuspendido e homogeneizado em 100µL de água estéril. O tubo foi congelado a -82°C por 15min e, em seguida aquecido em banho seco (MA651, Marconi) a 90°C por 15min. Os tubos foram estocados a -20±2°C até o momento da amplificação (aproximadamente 12 horas).

Para a etapa de amplificação, foi preparada uma solução mix composta de:

- *primer blaKPC* forward: sequência 5' -3': CTGTCTTGTCTCTCATGGCC
- *primer blaKPC* reverse: sequência 5' -3': CCTCGCTGTGCTTGTCATCC
- Taq DNA polimerase recombinante
- Mix de desoxyrribonucleotídeos (dNTPs)
- Tampão de MgCl₂
- DNA previamente extraído

Os tubos de reação foram levados ao termociclador (Proflex, Life Technology) apresentado na figura 4, onde realizou-se a amplificação do DNA com desnaturação inicial de 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 seg, anelamento do primer a 65°C por 45seg e extensão a 72°C por 45seg, além de uma extensão final de 72°C por 7min.

O resultado da amplificação foi visualizado por meio da presença de uma banda específica em eletroforese em gel de agarose 1,5%. Para controle negativo foi

utilizada uma cultura de *S. Typhimurium* ATCC 14028 e como controle positivo, uma cepa de *K. pneumoniae* IAL 2470, cedida pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL), confirmada como produtora de KPC.

Figura 4 - Termociclador Life Technology modelo Proflex

Fonte: Acervo pessoal

3.4 Avaliação da produção de cápsula

O método empregado para a determinação da capacidade de produção de cápsula foi o de semeadura em Ágar Vermelho Congo (AVC), de acordo com Freeman et al. (1989) e Freitas et al. (2010), adaptado para *Salmonella* spp., substituindo o ágar Infusão Cérebro Coração (BHI) pelo ágar Triptona de Soja (TSB).

As estirpes de *Salmonella* spp. (preparadas de acordo com o item 3.1) foram inoculadas através da técnica de picada em Ágar Vermelho Congo (AVC). As placas foram incubadas invertidas a 37°C por 24h e verificada a presença de crescimento característico. Colônias de *S. aureus* ATCC12600 e *E. coli* ATCC 25922 foram inoculadas no meio de cultura como controle positivo e negativo, respectivamente. Os resultados foram avaliados a partir da comparação da coloração apresentada pelas colônias testadas com os controles, após o período de incubação. Foram consideradas produtoras de cápsula, as colônias que apresentaram coloração preta e, as não produtoras, quando apresentaram coloração vermelha. O teste foi realizado com 5 replicatas, em dois períodos distintos (Figura 5).

Figura 5 - Avaliação da resistência a antibióticos carbapenêmicos, colônia típica para produção de cápsula **(a)**; colônia atípica para produção de cápsula **(b)**

3.5 Avaliação da produção de biofilme “*in vitro*”

A metodologia empregada para a determinação da produção de biofilme “*in vitro*”, foi da técnica de microplacas de polietileno com 96 poços em U, de acordo com Stepanovic et al. (2004) e Rodrigues et al. (2006), adaptada para *Salmonella* spp., substituindo o caldo Infusão Cérebro Coração (BHI) pelo caldo Triptona de Soja (TSB).

Foi preparado 200mL de meio TSB suplementado com 1% de glicose e um inóculo padronizado pela escala de McFarland no valor de 0,5. Os poços da placa de microtitulação foram preenchidos, sequencialmente, com alíquotas de 180μL de caldo TSB e 20μL do inóculo bacteriano. Cada estirpe a ser testado ocupou oito poços da placa, ou seja, oito repetições. No controle positivo, foram transferidos 180μL de TSB e um inóculo de 20μL de suspensão de *S. epidermidis* (ATCC 35984) para oito poços da placa. No controle negativo, foi transferido somente 200μL de caldo TSB para oito poços. As microplacas foram inoculadas em duplicata, embaladas em filme de cloreto de polivinila (PVC) e incubadas a 7°C por 72h, com a troca dos meios de cultura dos poços (200μL) a cada 24 horas. Após o período de incubação, as microplacas foram lavadas cuidadosamente, por três vezes, com solução de Tampão Fosfato Salina (PBS) numa lavadora de microplacas (RT-2600C, Rayto) e em seguida submetidas à fixação em estufa controlada a 50°C por 1h e em fluxo laminar por 20 minutos, para reduzir a temperatura. Com o auxílio de uma micropipeta multicanal, foi acrescentado a cada poço 150μL do corante de

Gram cristal violeta e deixadas em repouso por 20 minutos. Logo após, as placas foram lavadas delicadamente em água corrente até que a água do enxágue não apresentasse mais a cor do corante. A placa foi exposta em fluxo laminar até sua completa secagem e acrescentou-se 150µL de Etanol 92°GL com micropipeta multicanal realizando movimentos de lavagem (Figura 6). O conteúdo dos poços foi transferido para uma nova microplaca, e realizada a leitura em uma leitora de microplacas (RT-2100C, Rayto) na faixa de absorvância de 620nm. O ponto de corte considerado correspondeu ao valor médio das absorvâncias do controle negativo somado a três vezes o seu desvio padrão. Todas as estirpes com valores acima do ponto de corte foram consideradas produtoras de biofilme. Com base nos resultados, foi realizada uma classificação de formação de biofilme em: fraca (absorvância média entre uma e duas vezes a nota de corte), moderada (absorvância média entre duas e quatro vezes o ponto de corte), fortemente produtora (absorvância média superior a quatro vezes o ponto de corte) e não produtoras de biofilme as que apresentaram absorvância média abaixo da nota de corte.

De acordo com Stepanovic et al. (2004), foi realizada uma recomendação da classificação da produção de biofilme em relação Densidade Óptica (OD) e à nota de corte (NC), sendo:

- Não produtor de biofilme: $OD \leq NC$
- Fraco produtor de biofilme: $NC < OD < 2 \times NC$
- Moderado produtor de biofilme: $2 \times NC \leq OD < 4 \times NC$
- Fortemente produtor de biofilme: $OD \geq 4 \times NC$

Figura 6 - Procedimento para a formação de biofilme em microplacas. Inoculação de 180µL de meio de cultura estéril e 20µL da estirpe ativa em cada poço (8 replicatas) na microplaca **(a)**; A microplaca foi embalada em filme de cloreto de polivinila (PVC) seguida de incubação **(b)**; Lavagem dos poços com solução de tampão fosfato **(c)**; Fixação do biofilme aderido estufa a 50°C/1h **(d)**; Inoculação de 150µL de solução de cristal violeta por 15min **(e)**; Lavagem em água corrente e ressuspensão com 150µL de etanol a 95% **(f)**

3.6 Identificação dos genes relacionados aos fatores de virulência

Os genes utilizados na presente pesquisa (Tabela 2) foram selecionados com base em estudo realizado por Borges et al. (2013) e levantamento de genes pelo GenBank (NCBI, 2014).

Borges et al. (2013) apresentou em seu trabalho uma relação de genes, selecionados de estudos com *Salmonella* spp. isoladas em hospitais, dentre os quais foram selecionados para o presente trabalho os relacionados a fatores de virulência e a utilização desses genes em amostras de matrizes cárneas.

No banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) constam todas as sequências de DNA publicamente disponíveis. O GenBank é parte da colaboração do Banco de Dados Internacional de Sequências de Nucleotídeos, que compreende o DNA DataBank do Japão (DDBJ), o Laboratório Europeu de Biologia Molecular (EMBL), e o NCBI GenBank (NCBI, 2014). Confirmou-se no referido banco a presença dos genes selecionados e as citações de trabalhos científicos publicados mundialmente.

Tabela 2 - Genes dos fatores de virulência identificados em *Salmonella* spp

Gene	Fatores Virulência	Sequência do <i>primer</i> (5'-3')	Pares de Base
lpfA	Fímbria	CTTTCGCTGCTGAATCTGGT CAGTGTTAACAGAAACCAGT	250
agfA	Fímbria	TCCACAATGGGGCGGCGGCG CCTGACGCACCATTACGCTG	350
sefA	Fímbria	GATACTGCTGAACGTAGAAGG GCGTAAATCAGCATCTGCAGTAGC	488
invA	Invasão	GTGAAATTATCGCCACGTTTCGGGCAA TCATCGCACCGTCAAAGGAACC	284
hilA	Invasão	CTGCCGCAGTGTTAAGGATA CTGTGCGCTTAATCGCATGT	497
avrA	Proteína Efetora	GTTATGGACGGAACGACATCGG ATTCTGCTTCCCGCCGCC	385
sopE	Proteína Efetora	ACACACTTTCACCGAGGAAGCG GGATGCCTTCTGATGTTGACTGG	398
sivH	Invasão	CAGAATGCGAATCCTTCGCAC GTATGCGAACAAGCGTAACAC	763
spvC	Virulência Plasmidial	CGGAAATACCATCTACAAATA CCCAAACCCATACTTACTCTG	669

Fonte: Borges et al. (2013) e NCBI (2014)

Para a extração do DNA transferiu-se 1mL da cultura ativa para um tubo tipo Eppendorf. O tubo foi submetido à centrifugação por 4min a 9000rpm, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 100µL de água deionizada estéril. Realizou-se a homogeneização e o congelamento a -82°C por 15min. Após o período foi realizado aquecimento em banho seco a 90°C por 15min. As culturas foram estocadas a -20±2°C até o momento da amplificação.

Para a realização da reação de amplificação, foi preparado uma solução mix, a qual contém os “*primers*” específicos para cada gene (Tabela 3), água deionizada estéril, solução tampão, dNTPs e Taq DNA Polimerase. Foi adicionado DNA ao mix e realizada a reação conforme indicado na Tabela 3.

Tabela 3 - Condições e reagentes utilizados para o PCR no estudo da detecção dos fatores de virulência de *Salmonella* spp.

Gene	Quantidade e concentração dos reagentes	Amplificação	Ciclos
lpfA	0.2µL dNTPs (2.5mM), 1µL <i>primer</i> (20pmol), 2µL MgCl ₂ (4mM)	94°C, 1sec 55°C, 1sec 74°C, 21sec	35
agfA	2µL dNTPs (2.5mM), 1 µL <i>primer</i> (20pmol), 1.25µL MgCl ₂ (2.5mM)	94°C, 1sec 58°C, 1sec 74°C, 21sec	35
sefA	2 µL dNTPs (2.5mM), 1µL <i>primer</i> (20pmol), 1.25µL MgCl ₂ (2.5mM)	94°C, 1sec 55°C, 1sec 74°C, 21sec	35
invA	2µL dNTPs (2.5mM), 1µL <i>primer</i> (20 pmol), 1.25µL MgCl ₂ (2.5mM)	94°C, 1sec 58°C, 1sec 74°C, 21sec	35
hilA	2µL dNTPs (2.5mM), 1 µL <i>primer</i> (20pmol), 0.75µL MgCl ₂ (1.5mM)	94°C, 120sec 62°C, 60sec 72°C, 60sec	30
avrA	2µL dNTPs (2.5mM), 1 µL <i>primer</i> (20pmol), 1µL MgCl ₂ (2mM)	94°C, 60sec 64°C, 60sec 72°C, 60sec	30
sopE	2µL dNTPs (2.5mM), 1 µL <i>primer</i> (20pmol), 1µL MgCl ₂ (2mM)	94°C, 60sec 55°C, 60sec 72°C, 60sec	30
sivH	2µL dNTPs (2.5mM), 1 µL <i>primer</i> (20pmol), 1µL MgCl ₂ (2mM)	94°C, 30sec 56°C, 45sec 72°C, 45sec	30
spvC	3µL dNTPs (2.5mM), 3.5 µL <i>primer</i> (20pmol), 1µL MgCl ₂ (2mM)	93°C, 60sec 42°C, 60sec 72°C, 120sec	30

Fonte: Borges et al. (2013) e NCBI (2014)

Foram utilizados reagentes como controle branco da reação, *S. Typhimurium* ATCC 14028 como controle positivo para o gene *agfA* e *S. Enteritidis* ATCC 13076 para os genes *ipfA*, *sefA*, *invA*, *hila*, *avrA*, *sopE*, *shivH*. Como controle negativo foi utilizada *E. coli* ATCC 25922 (BORGES et al., 2013).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da resistência de *Salmonella* spp. a antibióticos carbapenêmicos

Dentre as 36 estirpes de *Salmonella* spp. avaliadas, 100% apresentaram-se sensíveis aos antimicrobianos ertapenem e meropenem. As estirpes resistentes foram resistentes ao imipenem, 33% e resistência intermediária de 59% (Figura 7).

Figura 7 - Perfil de suscetibilidade de *Salmonella* spp. a antibióticos carbapenêmicos

A alta frequência de estirpes resistentes à imipenem pode ser explicada pela capacidade de algumas estirpes de *Salmonella* spp. possuírem genes que codificam enzimas beta-lactamase. As beta-lactamases interferem na estrutura do anel β -lactâmico dessa classe de fármacos deixando-os sem atividade antimicrobiana (MARTINS et al., 2010).

De acordo com CDC (2013), mesmo tendo apresentado nesta pesquisa um perfil de resistência, o imipenem apresenta menor sensibilidade (42 a 94%) e especificidade (28 a 93%) com a enzima KPC quando comparado com o ertapenem e o meropenem, que apresentam melhores afinidades com a enzima, com sensibilidade de 90 a 100% e 48-94%, e especificidade de 81 a 93% e 96-100%, respectivamente.

Nos Estados Unidos o Sistema Nacional de Monitoramento da Resistência Antimicrobiana realizou entre 2002 e 2006, uma avaliação em amostras de carne de varejo, onde nenhuma das estirpes isoladas e avaliadas apresentou resistência ao imipenem, ertapenem e meropenem. Foram encontradas, no entanto resistências a outras classes de antibióticos, como a ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamidas e tetraciclina (ZHAO *et al.*, 2009).

4.2 Detecção do gene *bla*_{KPC}

A presença do gene *bla*_{KPC}, responsável pela codificação da enzima carbapenemase, após análise de PCR, não foi evidenciada nas 36 estirpes analisadas. O padrão positivo de *K. pneumoniae* IAL 1420 apresentou o gene conforme indicado na figura 9, comprovando a eficiência do *primer* utilizado no método analítico (Figura 8).

Figura 8 - Amplificação de PCR de fragmentos de DNA das estirpes de *Salmonella* spp. isoladas, com o emprego do *primer* do gene *bla*_{KPC}

No Brasil, mesmo com uma alta incidência de *Salmonella* spp. e outras enterobactérias, não foram relatados casos de microrganismos isolados de produtos de origem alimentar com resistência aos antibióticos carbapenêmicos. Os estudos em relação a este tipo de resistência estão concentrados na área hospitalar, onde são comumente encontrados em casos de septicemia ou infecções hospitalares (MONTEIRO; SANTOS, 2009; PEIRANO *et al.*, 2009; ALVES; BEHAR, 2013).

O resultado da resistência a imipenem encontrado no trabalho, pode estar relacionado a uma enzima codificada por um gene cromossomal (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV},

*bla*_{CTX-H} e *bla*_{OXA}), já que o gene plasmidial *bla*_{KPC} não foi localizado nas estirpes durante o estudo.

No Brasil, foram isoladas de aviários, estirpes de *Salmonella enterica* sorotipo Schwarzengrund resistentes a β -lactâmicos, incluindo cefalosporinas de espectro expandido (cefotaxima, ceftazidima, cefepime), aztreonam, e carbapenens. Através de análise molecular foram encontrados os genes β -lactamase do *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-H} e *bla*_{OXA}, e o gene plasmidial *bla*_{KPC} (SILVA et al., 2011).

Na Alemanha, foram encontradas estirpes de *Salmonella* spp. isoladas de uma fazenda de suínos e frango de corte, as quais foram submetidas a avaliações (genotípicas e fenotípicas) e foram confirmadas a presença da resistência a antibióticos carbapenêmicos (FISCHER et al., 2012).

O uso indiscriminado de antibióticos nas etapas de criação dos animais pode contribuir para o surgimento de microrganismos adaptados a estes fármacos. Como uma medida inicial de controle de antibióticos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) criou o Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (BRASIL, 2008) e vem realizando um monitoramento da contaminação de resíduos veterinários (ANVISA, 2012).

4.3 Avaliação da produção de cápsula

Na avaliação da capacidade de produção de cápsula pelo método do AVC, as estirpes de *Salmonella* spp. apresentaram coloração vermelha, característica atípica para o teste, enquanto a estirpe de *S. aureus* apresentou coloração preta típica. Foram realizadas três repetições no experimento e todas apresentaram os mesmos resultados. Dessa forma, a partir dos resultados encontrados, pode-se afirmar que o método do AVC para as estirpes de *Salmonella* spp., utilizadas neste experimento não pode ser considerado como teste presuntivo válido para a avaliação da produção de biofilme, conforme vem sendo utilizado para estirpes de *S. aureus* cuja eficiência já é comprovada (STEPANOVIC et al., 2004; RODRIGUES et al., 2006)

4.4 Avaliação da produção de biofilme “*in vitro*”

Dentre as 36 estirpes analisadas, a 19 e 36 apresentaram os melhores resultados médios de produção de biofilme, sendo a densidade óptica (OD) de 1,01 e 1,03, respectivamente. As estirpes que obtiveram os resultados menos relevantes na produção de biofilme foram a 6 e 28, com OD de 0,18 e 0,16, respectivamente (Figura 9). O desvio padrão médio de produção de biofilme nas culturas foi de 0,02. O controle positivo *S. aureus* ATCC 12600 apresentou OD média de 1,27 e desvio padrão de 0,02. O controle negativo apresentou resultado de OD de 0,11 e desvio padrão de 0,02. Os dados dos valores médios de absorbância das amostras de *Salmonella* spp no teste de produção de biofilme “*in vitro*” são apresentados no Anexo.

Figura 9 - Valores médios de produção de biofilme das estirpes de *Salmonella* spp. nos três experimentos

Todas as 36 estirpes analisadas foram consideradas produtoras de biofilme, e de acordo com a classificação sugerida por Stepanovic et al. (2004), 69% apresentaram-se fortemente produtoras de biofilme, enquanto 25% foram consideradas moderadas e somente 6% fracas (Figura 10).

Figura 10 - Distribuição percentual das estirpes de *Salmonella* spp. produtoras de biofilme de acordo com a classificação sugerida por Stepanovic et al. (2004)

As etapas de produção de biofilme e a quantidade de biofilme produzido podem estar relacionadas aos fatores de virulência encontrados em *Salmonella* spp., mas é necessário que os genes que codificam os fatores de virulência se expressem (DE MACÊDO, 2002).

4.5 Identificação dos genes relacionados aos fatores de virulência

As estirpes analisadas apresentaram diferentes frequências para os genes pesquisados, conforme descrito na Tabela 4. Todas as estirpes analisadas apresentaram, pelo menos, três genes associados à virulência.

Tabela 4 - Distribuição percentual da frequência da presença de genes associados à virulência nas estirpes de *Salmonella* spp. analisadas ($n = 36$)

Gene	Estirpes Positivas		Estirpes Negativas	
	nº	%	nº	%
<i>lpfA</i>	35	97,2	1	2,8
<i>agfA</i>	36	100	0	0
<i>sefA</i>	2	5,6	34	94,4
<i>invA</i>	36	100	0	10
<i>hilA</i>	0	0	36	100
<i>avrA</i>	18	50	18	50
<i>sopE</i>	0	0	36	100
<i>sivH</i>	0	0	36	100
<i>spvC</i>	0	0	36	100

Com base na frequência dos genes encontrados nas diferentes estirpes de *Salmonella* spp., foram separados quatro perfis genéticos. Os diferentes perfis e o número de estirpes classificadas por perfil estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Perfil genético das estirpes de *Salmonella* spp. das amostras analisadas ($n = 36$)

Perfil genético	Número de estirpes	Genes								
		<i>lpfA</i>	<i>agfA</i>	<i>sefA</i>	<i>invA</i>	<i>hilA</i>	<i>avrA</i>	<i>sopE</i>	<i>sivH</i>	<i>spvC</i>
Perfil 1	15	+	+	-	+	-	+	-	-	-
Perfil 2	2	+	+	+	+	-	+	-	-	-
Perfil 3	1	-	+	-	+	-	+	-	-	-
Perfil 4	18	+	+	-	+	-	-	-	-	-

As Figuras 12, 13 e 14 mostram a eletroforese em gel de agarose, com produtos de amplificação dos genes encontrados nas estirpes durante este experimento.

Figura 12 - Amplificação de PCR de fragmentos de DNA das estirpes de *Salmonella* spp. isoladas, usando *primers* dos fatores de virulência: gene *ipfA* relacionado a produção de fímbria (a); gene *agfA* relacionado a produção de fímbria (b); gene *sefA* relacionado a produção de fímbria (c) gene *invA* relacionado a invasão celular (d)

Figura 13 - Amplificação de PCR de fragmentos de DNA das estirpes de *Salmonella* spp. isoladas, usando *primers* dos fatores de virulência: gene *hilA* relacionado a invasão celular (a); gene *avrA* relacionado a produção de proteína efetora (b); gene *sopE* relacionado a produção de proteína efetora (c)

Figura 14 - Amplificação de PCR de fragmentos de DNA das estirpes de *Salmonella* spp. isoladas, usando *primers* dos fatores de virulência: gene *sivH* relacionado a invasão celular (a); gene *spvC* relacionado ao fator de virulência plasmidial (b)

O estudo das fímbrias tem um papel importante, por serem responsáveis pela ligação entre a bactéria e as células do hospedeiro, mediando a colonização bacteriana e a distribuição de endotoxinas. Podem estar relacionadas à fase inicial da produção de biofilmes, sendo responsáveis pela fixação no substrato.

Das 36 estirpes analisadas, 100% apresentaram o gene *agfA*, 97,2% o gene *ipfA* e apenas 5,6% o gene *sefA*. Bäumlér & Heffron (1995) realizaram um estudo filogenético em estirpes de *Salmonella* spp. e demonstraram que o operon *agf* aparenta ser o mais antigo, sendo encontrado no ancestral comum de *Salmonella* e *E. coli*. Demonstraram também, que o operon *ipf* foi adquirido na formação do gênero *Salmonella*. Já o operon *sef* possui uma distribuição genética limitada, indicando que foi recentemente adquirido através de cruzamentos genéticos entre estirpes de enterobactérias (DORAN et al., 1993; EDWARDS PUENTE., 1998).

Das estirpes de *Salmonella* spp. analisadas 50% apresentaram o gene *avrA*. Estudos realizados por Streckel et al. (2004) e Prager et al. (2000) identificaram 80% de frequência do gene *avrA*, sendo encontrado em culturas que apresentaram alto índice de virulência. Mesmo com uma incidência relativamente alta, somente algumas cepas de *Salmonella* spp. expressam a proteína efetora *avrA*, importante na efetivação da sua capacidade de adaptação a meios com baixo pH, possibilitando a contaminação por *Salmonella* spp. em alimentos ácidos (BEM-BARAK et al., 2006; LEYER & JHONSON, 1992). As proteínas efetoras podem exercer um papel fundamental na produção de biofilme, caracterizando sorovares de *Salmonella* spp. com adaptações a pH baixos e resistência a alguns princípios ativos de sanitizantes.

Estudos realizados por Bacci et al. (2006) e Okamoto et al. (2009), demonstraram a frequência do gene *invA* abaixo de 100%, resultado compatível com o encontrado no presente estudo (100 %). Devido aos vários estudos realizados com este gene e a alta taxa de frequência apresentada pelos mesmos, é possível considerar que o gene é conservado entre as espécies de *Salmonella* spp., e portanto, é um importante objeto de estudo para a detecção desse microrganismo (OLIVEIRA et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2003; SALEHI et al., 2005; AMINI et al., 2010).

A partir dos resultados de produção e classificação de biofilme e os genes encontrados neste experimento relacionado aos fatores de virulência, não foi possível determinar a relação entre os mesmos. Mesmo com a presença de alguns genes, foi observado que algumas estirpes apresentaram resultados divergentes em relação à classificação da produção de biofilme formado. Como exemplo pode-se citar as amostras 6 e 28, que apresentaram genes responsáveis pela codificação de fímbrias e/ou proteína efetora, mas foram classificados como fracas produtores de biofilme. Em contra partida, as amostras 7 e 27, apresentaram os mesmos genes e foram classificadas como fortemente produtoras. As variações encontradas na classificação de produção de biofilme podem ser explicadas pela presença, mas não expressão dos genes, modificando sua característica fenotípica (HANSEN-WESTER & HENSEL, 2001; HSUA et al., 2013).

5 CONCLUSÕES / CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados desta pesquisa pode-se concluir que:

1. 90% das estirpes de *Salmonella* spp estudadas foram resistentes ao antibiótico imipenem, mas com este resultado isolado não se pode caracterizar uma resistência a antibióticos carbapenêmicos, sendo necessária uma maior investigação;
2. Não foi evidenciada a presença do gene *bla*_{KPC} nas estirpes de *Salmonella* spp. isoladas do aviário e linha de abate de frangos;
3. O teste do ágar vermelho congo adaptado não é a técnica presuntiva indicada para a avaliação da produção de biofilme em culturas de *Salmonella* spp.;
4. Todas as estirpes de *Salmonella* spp. apresentaram produção de biofilme "*in vitro*", onde 69% apresentou-se como fortemente produtora;
5. Todas as estirpes de *Salmonella* spp. apresentaram genes dos fatores de virulência com diferentes frequências que foram classificados em .quatro perfis genéticos: Perfil 1 - 41,7% (presença dos genes *ifpA*, *agfA*, *invA* e *avrA*), Perfil 2 - 5,5% (presença dos genes *ifpA*, *agfA*, *sefA*, *invA* e *avr*), Perfil 3 - 2,8%(presença dos genes *invA* e *avrA*) e Perfil 4 - 50,0% (*ifpA*, *agfA*, *invA*);

Considera-se que os resultados desta pesquisa poderão contribuir para subsidiar os estudos de controle do uso de antibióticos na cadeia avícola visando a garantia do alimento seguro e a saúde do consumidor. Estudos complementares com abrangência nacional se fazem necessários, assim como, a atualização de dados epidemiológicos dos órgãos regulatórios.

Os perfis genéticos e a classificação de produção de biofilme requerem estudos mais aprofundados no sentido de identificar a correlação entre essas duas variáveis.

REFERÊNCIAS

- AMINI, K.; SALEHI, T. Z.; NIKBAKHT, G.; RANJBAR, R.; AMINI, J.; ASHRAFGANJOOEI, S. B. Molecular detection of *invA* and *spv* virulence genes in *Salmonella enteritidis* isolated from human and animals in Iran. **African Journal of Microbiology Research**. Tehran. v. 4(21), p. 2202 - 2210, 2010.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Relatório de pesquisa em vigilância sanitária**: monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil; Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango – PREBAF. 2012. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/73f1990042e128fdb2e4bf348b3626d1/Relat%C3%B3rioPrebaf-vers%C3%A3ofinal-mar2012.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 17 set. 2014.
- AGLE, M. E. Biofilms in the food industry, in biofilms in the food environment. In: H.P. BLASCHEK, H.P.; WANG, H.H.; AGLE, M.E. (Ed.). **Biofilms in the food environment**. Oxford: Blackwell, 2007. p. 3-15.
- ALVES, A. P.; BEHAR, P. R. P. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de KPC em um hospital terciário do sul do Brasil. **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre, v. 57, n. 3, p. 213-218, 2013.
- BACCI, C.; PARIS, A.; SALSI, A.; BRINDANI, F. Genotypic and phenotypic virulence features in *Salmonella enterica* strains isolated from meat. **Annali Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma**, Parma, v. 26, p. 165-174, 2006.
- BÄUMLER, A. J.; HEFFRON, F. Identification and sequence analysis of *ipfABCDE*, a putative fimbrial operon of *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, Portland, v. 177, n. 8, p. 2087-2097, 1995.
- BEN-BARAK, Z.; STRECKEL, W.; YARONA, S.; COHENC, S.; PRAGER, R.; TSCHAPPE, H. The expression of the virulence-associated effector protein gene *avrA* is dependent on a *Salmonella enterica*-specific regulatory function. **International Journal of Medical Microbiology**, Haifa, v. 296, p. 25-38, 2006.
- BERRANG, M. E.; DICKENS, J. A.; MUSGROVE, M. T. Effects of hot water application after defeathering on the levels of *Campylobacter*, coliform bacteria and *Escherichia coli* on broiler carcasses. **Poultry Science**, Athens, v. 79, p. 1689-1693, 2000.
- BOARI, C. A. **Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* sob diferentes condições de cultivo**. 80 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008. Disponível em: <<http://repositorio.ufla.br/handle/1/2802>>. Acesso em: 08 abr. 2014.

BORGES, K. A.; FURIAN, T. Q.; BORSOI, A.; MORAES, H. L. S.; SALLE, C. T. P.; NASCIMENTO, V.P. Detection of virulence-associated genes in *Salmonella enteritidis* isolates from chicken in South of Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 33, n. 12, p. 1416-1422, 2013.

BOXSTAEL, S. V.; DIERICK, K.; VAN HUFFEL, X.; UYTENDAELE, M.; BERKVEN, D.; HERMAN, L.; BERTRAND, S.; WILDEMAUWE, C.; CATRY, B.; BUTAYE, P.; IMBERECHTS, H. Comparison of antimicrobial resistance patterns and phage types of *Salmonella typhimurium* isolated from pigs, pork and human in Belgium between 2001 and 2006. **Food Research International**, Barking, v. 45, p. 913-918, 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa, SDA nº193, de 19 de setembro de 1994. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 182, seção 1, p. 14309, 22 set. 1994.

BRASIL. Instrução Normativa, SDA nº70, de 06 de outubro de 2003. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, n. 197, seção 1, p. 10 out. 2013.

BRASIL. **Relatório do monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em Enterococos e Salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil**. Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango - PREBAF. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), v. 1, p., 2008. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/alimentos/relatorios/relatorioprebaf.pdf>>. Acesso em: 06 abr. 2015.

CAIXETA, D. S. **Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável**. 2008. 75 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008. Disponível em: <http://repositorio.ufla.br/bitstream/1/2267/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O_Sanificantes%20qu%C3%ADmicos%20no%20controle%20de%20biofilmes%20formadas%20por%20duas%20esp%C3%A9cies%20de%20Pseudomonas%20em%20superf%C3%ADcie%20de%20a%C3%A7o%20inoxid%C3%A1vel.pdf>. Acesso em: 08 abr. 2014.

CAPELLETTI, R. V. **Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais**. 2006. 81 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?view=vtls000392545>>. Acesso em: 12 abr. 2014.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. **Michigan retail store recalls ground beef products due to possible *Salmonella* Contamination:** FSIS-RC-009-2013. 2013. Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/newsroom/!ut/p/a0/04_Sj9CPykssy0xPLMnMz0vMAfGjzOINAg3MDC2dDbwMDIHQ08842MTDy8_YwNtMvyDbUREAzbjixQ!!/?1dmy¤t=true&urile=wcm%3Apath%3A%2Ffsis-archives-content%2Finternet%2Fmain%2Ftopics%2Frecalls-and-public-health-alerts%2Frecall-case-archive%2Farchives%2Fct_index593>. Acesso em: 20 mai. 2013.

CHOI, J.; SHIN, D.; RYU, S. Implication of quorum sensing in *Salmonella enterica* serovar typhimurium virulence: the *luxs* gene is necessary for expression of genes in pathogenicity island 1. **Infection and Immunity**. Seoul, v. 75, n. 10, p. 4885-4890, 2007.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. Twenty-Second Informational Supplement. Wayne. M100 – S20; v. 30, n.1, p. 22-34, 2010.

DE MACÊDO, J.A.B. Biofilmes bacterianos, uma preocupação da indústria de farmacêutica. **Revista Fármacos & Medicamentos**, Juiz de Fora, v. 2, n. 7, p. 19-24, 2002.

DORAN, J. L.; COLLINSON, S. K.; BURIAN, J.; SARLOS, G.; TODD, E. C. D; MUNRO, C. K.; KAY, C. M.; BANSER, P. A.; PETERKIN, P. I.; KAY, W. W. DNA-based diagnostic tests for *Salmonella* species targeting *agfA*, the structural gene for thin aggregative fimbriae. **Journal of Clinical Microbiology**. British Columbia, v. 31, n. 9, p. 2263-2273, 1993.

DOWNES, F. P.; ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington: American Public Health Association, 2001. 676 p.

EDWARDS, R. A.; PUENTE, J. L. Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. **Trends in Microbiology**, Urbana, v. 6, n. 8, p. 282-287, 1998.

ESTADÃO. **Hospital da Unicamp investiga presença de superbactéria. 05 de abril de 2012**. 2013. Disponível em: <<http://www.estadao.com.br/noticias/geral,hospital-da-unicamp-investiga-presenca-de-superbacteria,1017366>>. Acesso em: 27 nov. 2014.

EUROPEAN COMMISSION. **The Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF): preliminary annual report 2014**. Berlin, 2014. 50 p.

FERREIRA, E. O, CAMPOS, L. C. *Salmonella*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 2008. cap. 43, p. 329-338.

FAO. **Pesquisa produção mundial de carne de frango**. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QL/S>>. Acesso em: 12 jun. 2013.

FISCHER, J.; RODRIGUEZ, I.; SCHMOGER, S.; FRIESE, A.; ROESLER, U.; HELMUTH, R.; GUERRA, B. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* producing VIM-1 carbapenemase isolated from livestock farms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. Berlin, v.68, n.2, p. 478-480, 2012. Disponível em: <<http://jac.oxfordjournals.org/content/68/2/478.full>>. Acesso em: 19 abr. 2013.

FONSECA, E. L.; MYKYTCZUK, O. L.; ASENSI, M. D.; REIS, E. M. F.; FERRAZ, L. R.; PAULA, F. L.; NG, L. K.; RODRIGUES, D. P. Clonality and antimicrobial resistance gene profiles of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar infantis from four public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**. Rio de Janeiro, v. 44, n. 8, p. 2767-2772, 2006.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424 p.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microrganismos indicadores. In: FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 1996. p. 50-55.

FREEMAN, D. J.; FALKINER, F. R.; KEANE, C. T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **Journal of Clinical Pathology**. Dublin, v. 42, p. 872-874, 1989.

FREITAS, V. R.; SAND, S. T. van der; SIMONETTI, A. B. Formação *in vitro* de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* na superfície de canetas odontológicas de alta rotação. **Revista de Odontologia da UNESP**, Araraquara, v. 39, n. 4, p. 193-200, jul./ago. 2010.

GALES, A. C.; MENDES, R. E.; RODRIGUES, J.; SADER, H. S. Comparação das atividades antimicrobianas de meropenem e imipenem/cilastina: o laboratório necessita testar rotineiramente os dois antimicrobianos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, v. 38, n. 1, p. 13-20, 2002.

GIBSON, D. L.; WHITE, A. P.; RAJOTTE, C. M.; KAY, W. W. AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella enteritidis*. **Microbiology**, British Columbia, v. 153, p. 1131-1140, 2007.

GOKSOY, E. O.; KIRKAN, S.; KOK, F. Microbiological quality of broiler carcasses during processing in two slaughterhouses in Turkey. **Poultry Science**, Isikli Koyu Aydin, v. 83, p. 1427-1432, 2004.

HANSEN-WESTER, I.; HENSEL, M. *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. **Microbes and Infection**, Munique, v. 3, p. 549-559, 2001.

HSUA, M.; TANG, C. Y.; LINA, H.; CHENA, Y. H., CHENA, Y. L.; SUA, Y. H.; CHENB, D. S.; LINC, J. H., CHANG, C. C. Comparative study of class 1 integron, ampicillin, chloramphenicol, streptomycin, sulfamethoxazole, tetracycline (ACSSuT) and fluoroquinolone resistance in various *Salmonella* serovars from humans and animals, **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**. Taichung, v. 36, p. 9-16, 2013.

JAY, J. K. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 712 p.

KIM, C.; HUNG, Y. C.; RUSSELL, S. M. Efficacy of electrolyzed water in the prevention and removal of fecal material attachment and its microbicidal effectiveness during simulated industrial poultry processing. **Poultry Science**, Griffin, v. 84, p.1778-1784, 2005.

LIVERMORE, D. M., WOODFORD, N. The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **Trends Microbiology**. London, v.14, n.9, p.413-420, 2006.

LELIEVELD, H. L. M.; MOSTERT, M. A.; HOLAH, J. **Handbook of hygiene control in the food industry**. Abington: Woodhead Publ., 2005. 720 p.

LEYER, G. J.; JOHNSON, E. A. Acid adaptation promotes survival of *Salmonella* spp. in cheese. **Applied and Environmental Microbiology**. Madison, v. 587, n. 6, p. 2075-2080, 1992.

MACEDO, J. A. B. **Biofilmes Bacterianos: uma preocupação para a indústria de alimentos**. 2006. Disponível em: <http://www.milknet.com.br/?pg=artigos_tecnicos&id=7&local=1>. Acesso em: 17 ago. 2013.

MACHADO, J.; BERNARDO, F. Prevalence of *Salmonella* in chicken carcasses in Portugal. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 69, n. 4, p. 477-480, 1990.

MARTINS, W. M. B. S.; ALMEIDA, A. C. S.; SILVA, B. O.; VILELA, M. A.; MORAIS, M. M. C. Prevalência do gene *blaKPC* em isolados clínicos de Enterobacteriaceae e não fermentadores encontrados em amostras clínicas em um hospital universitário do Recife. In: JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 10. 2010, Recife. **Anais...** Disponível em: <<http://www.sigeventos.com.br/jepex/inscricao/resumos/0001/R1934-1.PDF>>. Acesso em: 02 mai. 2013.

MILLER, S. T.; XAVIER, K. B.; CAMPAGNA, S. R.; TAGA, M. E.; SEMMELHACK, M. F.; BASSLER, B. L.; HUGHSON, F. M. *Salmonella* typhimurium recognizes a chemically distinct form of the bacterial quorum-sensing signal AI-2. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 15, p. 677-687, 2004.

MITSUGUI, C. S.; TOGNIM, M. C. B.; CARRARA-MARRONE, F. E., GARCIA, L. B. Efeito antimicrobiano in vitro da associação de polimixina B e ceftazidima em amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*. **Ciência, Cuidado e Saúde**, Maringá, v. 7, p. 76-81, 2009.

- MONTEIRO, J.; SANTOS, A. F. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, São Paulo, v. 53, n. 1, p. 333-334, 2009.
- MORENO, B. **Higiene e inspección de carnes - I**. León: Ediciones Díaz de Santos, 2006. 620 p.
- NAAS, T.; NORDMANN, P.; VEDEL, G.; POYART, C. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase kPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, Paris, v. 49, p. 4423-4424, 2005.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **GenBank**. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>>. Acesso em: 22 mai. 2014.
- OKAMOTO, A. S.; ANDREATTI FILHO, R. L.; ROCHA, T. S.; MENCONI, A.; MARIETTO-GONÇALVES, G. A. Relation between the *spvC* and *invA* genes and resistance of *Salmonella enteritidis* isolated from avian material. **International Journal of Poultry Science**, Botucatu, v. 8, n. 6, p. 279-582, 2009.
- OLIVEIRA, S. D.; SANTOS, L. R.; SCHUCHA, D. M. T.; SILVA, A. B.; SALLE, C. T. P.; CANAL, C. W. Detection and identification of salmonellas from poultry-related samples by PCR. **Veterinary Microbiology**, Porto Alegre, v. 87, p. 25-35, 2002.
- OLIVEIRA, S. D.; RODENBUSCH, C. R.; MICHAEL, G. B.; CARDOSO, M. I. R.; CANAL, C. W.; BRANDELLI, A. Detection of virulence genes in *Salmonella enteritidis* isolates from different sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.34, n. 1, p. 123-124, 2003.
- PIRES, A. C. S.; SOARES, N. F. F.; CAMILLOTO, G. P.; BERNARDES, P. C.; ANDRADE, N. J.; GONCALVES, M. P. J. Desenvolvimento de embalagens ativas (sachê e filme antimicrobianos) para conservação de queijo mussarela fatiado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**. Juiz de Fora, v. 61, p. 135-138, 2006.
- PEIRANO, G.; SEKI, L. M.; PASSOS, V. L. V.; PINTO, M. C. F. G.; GUERRA, L. R.; ASENSI, M.D. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Rio de Janeiro, v. 63, n. 2, p. 265-268, 2009.
- PRAGER, R.; MIROLD, S.; TIETZE, E.; STRUTZ, U.; KNÜPPEL, B.; RABSCH, W.; HARDT, W. D.; TSCHÄPE, H. Prevalence and polymorphism of genes encoding translocated effector proteins among clinical isolates of *Salmonella enterica*. **International Journal of Medical Microbiology**. Wernigerode. v. 290, p. 605-617, 2000.
- ROBLEDO, I. E.; AQUINO, E. E.; SANTÉ, M. I.; SANTANA, J. L.; OTERO, D. M.; LEÓN, C. F.; VÁSQUEZ, G. J. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Puerto Rico, v. 54, p. 1354-1357, Mar. 2010. Disponível em: <<http://aac.asm.org/content/54/3/1354.short>>. Acesso em: 02 mai. 2013.

ROCHA, D. **Ambiente em foco: consumo de carne de frango já supera o de carne bovina**. 2006. Disponível em: <<http://www.ambienteemfoco.com.br>>. Acesso em: 18 ago. 2013.

RODRIGUES, L. R.; BANAT, M. I.; VAN DER MEI, H. C.; TEIXEIRA, J. A.; OLIVEIRA, R. Interference in adhesion of bacteria and yeasts isolated from explanted voice prostheses to silicone rubber by rhamnolipid biosurfactants. **Journal of Applied Microbiology**, Braga, v. 100, n. 3, p. 470-480, 2006.

ROSTAGNO, M. H.; WESLEY, I. V.; TRAMPEL, D. W.; HURD, H. S. *Salmonella* prevalence in market-age turkey's on-farm and at slaughter. **Poultry Science**, West Lafayette, v. 85, p. 1838-1842, 2006.

SALEHI, T. Z.; MAHZOUNIEH, M.; SAEEDZADEH, A. Detection of *invA* gene in isolated *Salmonella* from broilers by PCR Method. **Internacional Journal of Poultry Science**, Tehran, v. 4, n. 8, p. 557-559, 2005.

SARCINELLI, M. F., VENTURINI, K. S., SILVA, L. C., **Abate de aves**. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, Programa Institucional de Extensão, 2007. 7 p. (Boletim Técnico PIE-UFES, 00607).

SHAH, P. M. Parenteral carbapenemas. **Clinical Microbiology and Infection**. Frankfurt, v. 14, n. 11, p. 175–180, 2008.

SILVA, K. C.; FONTES, L. C.; MORENO, A. M.; ASTOLFI-FERREIRA, C. S.; FERREIRA, A.J.P.; LINCOPAN, N. Emergence of extended-spectrum- β -lactamase CTX-M-2-producing *Salmonella enterica* serovars Schwarzengrund and Agona in poultry farms. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, São Paulo, v. 57, p. 3458-3459, 2011.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. E. A.; TANIWAKI, M. H.; SANTOS, R. F. S.; GOMES, R. A. R. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007. 552 p.

SMITH, D. P.; NORTHCUTT, J. K.; CASON, J. A.; HINTON, A. Jr.; BUHR, R. J.; INGRAM, K.D. Effect of external or internal fecal contamination on numbers of bacteria on pre-chilled broiler carcasses. **Poultry Science**, Athens, v. 86, p. 1241-1244, 2007.

STEPANOVIC, S.; IRKOVIC, I. C.; RANIN, L.; SVABIC-VLAHOVIC, M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**, Belgrado, v. 38, p. 428-432, 2004.

STRECKEL, W.; WOLFF, A. C.; PRAGER, R.; TIETZE, E.; TSCHÄPE, H. Expression profiles of effector proteins *SopB*, *SopD1*, *SopE1*, and *AvrA* differ with systemic, enteric, and epidemic strains of *Salmonella enterica*. **Molecular Nutrition & Food Research**, Wernigerode, v. 48, p. 496-503, 2004.

TRAVAGIN, B. N. F. S. **Estudo da formação de biofilmes de *Listeria monocytogenes* frente a diferentes condições encontradas em laticínios**. 2010. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

TSAKRIS, A.; POULOU, A.; THEMELI-DIGALAKI, K.; VOUGARI, E.; PITTARAS, T.; SOFIANOU, D.; POUMARAS, S.; PETROPOULOU, D. Use of boronic acid disk tests to detect extended- spectrum -lactamases in clinical isolates of kpc carbapenemase-possessing enterobacteriaceae. **Journal of Clinical Microbiology**, Jerusalem, v. 47, p. 3420-3426, 2009.

UNIÃO BRASILEIRA DE AVICULTURA. **Relatório anual 2011/2012, 2013**.

Disponível em:

<<http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/732e67e684103de4a2117dda9ddd280a.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2014.

UZUNOVA-DONEVA, T.; DONEV, T. Anabiosis and conservation of microorganisms. **Journal of Culture Collections**, Bulgaria, v. 4, p. 17-28, 2005.

VAN ASTEN, A. J. A. M.; VAN DIJK, J. E. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Utrecht, v. 44, n. 3, p. 251-259, 2005.

VIEIRA, M. A. M. Ilhas de patogenicidade. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 406-414, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Drug-resistance *Salmonella***. 2005. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>>. Acesso em: 03 mai 2013.

ZERAIK, A. N. **Biosurfactantes como agentes inibidores da adesão de patógenos em superfície de poliestireno**. 2009. 135 p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

ZHANEL, G. G.; WIEBER, R.; DILAY, L.; THOMSON, K.; RUBINSTEIN, E.; HOBAN, D. J.; NOREDDIN, A. M.; KARLOWSKY, J. A. Comparative review of the carbapenems. **Drugs**, Winnipeg, v. 67, p. 1027-1052, 2007.

ZHAO, S.; BLICHENSTAFF, K.; GLENN, A.; AYERS, S.L.; FRIEDMAN, S.L.; ABBOTTAND, J.W.; MACDERMOTT, P.F. β -lactam resistance in *Salmonella* strains isolated from retail meats in the United States by the National Antimicrobial Resistance Monitoring System between 2002 and 2006. **Applied and Environmental Microbiology**, Laurel, v. 75, n. 25, p. 247624-7630, 2009. Disponível em: <<http://aem.asm.org/content/75/24/7624.full>>. Acesso em: 04 mar. 2015.

ANEXO

Tabelas de dados sobre os valores médios de absorbância das amostras de *Salmonella* spp. para os testes de biofilme in vitro

Tabela 1 - Valores médios de absorbância das estirpes 1 a 9 de *Salmonella* spp. e dos controles positivo e negativo, obtidos após leitura das placas de microtitulação pelo método do Cristal Violeta

Estirpe	Experimento 1*	Experimento 2*	Experimento 3*
1	0,65	0,61	0,64
2	0,54	0,52	0,51
3	0,65	0,67	0,63
4	0,80	0,81	0,75
5	0,39	0,42	0,50
6	0,21	0,15	0,17
7	0,66	0,63	0,66
8	0,95	0,99	0,99
9	0,36	0,29	0,30
(C+)	1,22	1,25	1,24
(C-)	0,11	0,11	0,11
Desvio Padrão (C-)	0,01	0,01	0,01
Nota de corte	0,15	0,14	0,14
Fraco Produtor	>0,15 e <0,30	>0,14 e <0,28	>0,14 e <0,28
Moderado Produtor	≥0,30 e <0,60	≥0,28 e <0,56	≥0,28 e <0,56
Forte Produtor	≥0,60	≥0,56	≥0,56

* Média de 8 replicatas; (C+) Controle positivo (*S. aureus* ATCC12600; (C-) Controle negativo (meio de cultura); DP Desvio padrão

Tabela 2 - Valores médios de absorbância das estirpes 10 a 18 de *Salmonella* spp. e dos controles positivo e negativo, obtidos após leitura das placas de microtitulação pelo método do Cristal Violeta

Estirpe	Experimento 1*	Experimento 2*	Experimento 3*
10	0,35	0,34	0,34
11	0,68	0,70	0,76
12	0,55	0,50	0,48
13	0,99	0,98	0,99
14	1,00	0,96	1,01
15	0,61	0,56	0,51
16	0,54	0,55	0,55
17	0,77	0,79	0,83
18	0,65	0,66	0,65
(C+)	1,26	1,21	1,32
(C-)	0,12	0,11	0,11
Desvio Padrão (C-)	0,01	0,02	0,02
Nota de corte	0,16	0,17	0,16
Fraco Produtor	>0,16 e <0,32	>0,17 e <0,34	>0,16 e <0,32
Moderado Produtor	≥0,32 e <0,64	≥0,34 e <0,68	≥0,32 e <0,64
Forte Produtor	≥0,64	≥0,68	≥0,64

* Média de 8 replicatas; (C+) Controle positivo (*S. aureus* ATCC12600; (C-) Controle negativo (meio de cultura); DP Desvio padrão

Tabela 3 - Valores médios de absorvância das estirpes 19 a 27 de *Salmonella* spp. e dos controles positivo e negativo, obtidos após leitura das placas de microtitulação pelo método do Cristal Violeta

Estirpe	Experimento 1*	Experimento 2*	Experimento 3*
19	1,02	1,01	1,00
20	1,00	0,98	1,02
21	0,98	0,99	1,00
22	0,70	0,74	0,75
23	0,76	0,74	0,70
24	0,97	1,01	0,95
25	0,53	0,50	0,63
26	0,54	0,56	0,56
27	0,80	0,79	0,83
(C+)	1,25	1,25	1,27
(C-)	0,12	0,09	0,12
Desvio Padrão (C-)	0,02	0,02	0,02
Nota de corte	0,17	0,14	0,17
Fraco Produtor	>0,17 e <0,34	>0,14 e <0,28	>0,17 e <0,34
Moderado Produtor	≥0,34 e <0,68	≥0,28 e <0,56	≥0,34 e <0,68
Forte Produtor	≥0,68	≥0,56	≥0,68

* Média de 8 replicatas; (C+) Controle positivo (*S. aureus* ATCC12600; (C-) Controle negativo (meio de cultura); DP Desvio padrão

Tabela 4 - Valores médios de absorvância das estirpes 28 a 36 de *Salmonella* spp. e dos controles positivo e negativo, obtidos após leitura das placas de microtitulação pelo método do Cristal Violeta

Estirpe	Experimento 1*	Experimento 2*	Experimento 3*
28	0,17	0,15	0,15
29	0,63	0,69	0,71
30	1,01	0,99	1,01
31	0,67	0,67	0,70
32	0,69	0,76	0,73
33	0,77	0,73	0,70
34	0,85	0,81	0,82
35	0,99	0,95	0,92
36	1,06	1,00	1,04
(C+)	1,28	1,30	1,32
(C-)	0,10	0,12	0,13
Desvio Padrão (C-)	0,01	0,02	0,02
Nota de corte	0,14	0,19	0,19
Fraco Produtor	>0,14 e <0,28	>0,15 e <0,30	>0,15 e <0,30
Moderado Produtor	≥0,28 e <0,56	≥0,30 e <0,60	≥0,30 e <0,60
Forte Produtor	≥0,56	≥0,60	≥0,60

* Média de 8 replicatas; (C+) Controle positivo (*S. aureus* ATCC12600; (C-) Controle negativo (meio de cultura); DP Desvio padrão