

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS CURITIBANOS
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
MEDICINA VETERINÁRIA

Ana Karolina Panneitz

**AVALIAÇÃO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME DE DIFERENTES SOROVARES DE
Salmonella sp. ISOLADOS DE FRANGO DE CORTE**

Curitibanos

2022

Ana Karolina Panneitz

**AVALIAÇÃO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME DE DIFERENTES SOROVARES DE
Salmonella sp. ISOLADOS DE FRANGO DE CORTE**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Medicina Veterinária do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Menin

Curitibanos

2022

Panneitz, Ana Karolina
AVALIAÇÃO DE FORMAÇÃO DE BIOFILME DE DIFERENTES
SOROVARES DE Salmonella sp. ISOLADOS DE FRANGO DE CORTE /
Ana Karolina Panneitz ; orientador, Álvaro Menin, 2022.
31 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Curitibanos, Graduação em Medicina Veterinária,
Curitibanos, 2022.

Inclui referências.

1. Medicina Veterinária. 2. avicultura. 3. frigorífico.
4. saúde única. I. Menin, Álvaro . II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Graduação em Medicina
Veterinária. III. Título.

Ana Karolina Panneitz

RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR OBRIGATÓRIO NA ÁREA DE DIAGNÓSTICO VETERINÁRIO

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Médica Veterinária e aprovado em sua forma final pelo Curso de Medicina Veterinária.

Local Curitiba, 16 de dezembro de 2022.

Pro. Dr. Malcon Andrei Martinez Pereira
Coordenador do Curso
Universidade Federal de Santa Catarina

Banca examinadora

Prof. Dr. Álvaro Menin
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Dra. Carolina Reck
Instituto de Pesquisa e Diagnóstico Veterinário (VERTÀ Laboratórios)

Prof. Dra. Francielli Cordeiro Zimmermann
Universidade Federal de Santa Catarina

Curitiba, 2022.

Dedico este trabalho aos meus pais, que
nunca mediram esforços para que eu
realizasse meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a meus pais, Rodolfo e Elenice, que sempre me incentivaram a estudar e possibilitaram que isso fosse uma realidade para mim.

A todos os amigos que fiz nessa caminhada. Especialmente a Paola, Stephanie, Leila, Dani e Mariela e Gabi perdi as contas de quantas vezes vocês impediram meus surtos. Independentemente se fosse pra ir pro laboratório as 6 da manhã na geada, ou ficar até as 2 da manhã organizando papelada ou ir comer pastel e tomar cervejinha ou simplesmente fazer mate e pipoca e fofocar. Vocês sempre estiveram lá. Obrigada por embarcarem nas minhas loucuras.

As minhas amigas de casa/ apartamento que foram tantas vezes minha rede de apoio, Kamila, Letícia, Gabi, Jeni, Maristela, Laura e Stephanie (sim de novo ela ahahah). E aos agregados do ap 11 Vinicius, Lu e Andressa.

A todos os professores maravilhosos que tive durante a graduação. Especialmente Guilherme, que despertou meu interesse pra área diagnóstica. Adriano e Francielli por se dedicarem tanto nas atividades de extensão, aprender com vocês foi minha base. A Caroline que me apresentou a microbiologia e mesmo com recursos limitados “fez algo parecido com uma limonada” (sim referência a This is us kkk) me ensinou tanto e com tanta paciência, sempre presente. A Aline por ensinar com tanta paixão as disciplinas de produção animal que plantou a sementinha da suinocultura em mim. A Sandra que fez milagre ao me fazer entender contas de diluição e perder o medo da virologia. E claro, ao meu orientador Álvaro, exemplo de profissional que ama o que faz sempre apoiando e viabilizando nossas ideias.

A todos os colegas dos projetos de extensão/laboratórios LABOPAVE, LABDIA, GESA, GEHisPa que tive a oportunidade de conviver e aprender.

A toda equipe do VERTÀ Laboratórios, pelo acolhimento durante o estágio. Agradeço especialmente a Dr^a Carolina, por me treinar tão bem e acreditar no meu trabalho quando as vezes nem eu acreditava. Também a Gabi, dupla dinâmica da micro, me ensinou tantos procedimentos, me deu tanto conselho e ainda deixando o clima leve, muitas músicas do Luan Santana cantadas kkkkk. A Jessica, mininaaaa foram tantos conselhos, news e caroninhas. A Alice, por sempre deixar o clima alegre nas coletas. A Mai, por fazer os melhores meios do mundo e animar tanto o trabalho. A Angélica e a Júlia, por toda a paciência ao me ensinarem KKKKK e por sempre me animarem e aconselharem.

Se você não insistir nos seus sonhos, vai insistir no quê?
(Autor desconhecido)

RESUMO

A avicultura de corte tem muita representatividade econômica no Brasil. O país se desponta como 3º maior produtor e 1º em exportações em todo mundo. Por ser uma proteína tão consumida, a carne de frango precisa ser um produto de qualidade e seguro. Um dos maiores desafios da indústria de alimentos é a contaminação dos produtos por *Salmonella* spp. Essa bactéria Gram negativa é apontada como a maior causa de doença veiculada por alimentos em humanos. Sendo que a maioria das contaminações do produto ocorre na planta frigorífica. Uma característica que favorece as contaminações neste ambiente é a formação de biofilme, uma matriz autoproduzida pelas bactérias nas superfícies de equipamentos. Com isso, o objetivo do presente estudo é avaliar a capacidade de formação de biofilme de diferentes sorovares de *Salmonella* sp. isolados de suabes de arrasto de camas de frango de corte. Dos 327 isolados, 301 formaram biofilme (92,05%), sendo a maioria (65,44%) classificado como fraca produtora de biofilme. Nossos resultados demonstram a importância de se adotar medidas de limpeza e desinfecção nas plantas frigoríficas, voltando os esforços também para a remoção de biofilmes.

Palavras-chave: avicultura; frigorífico; saúde única.

ABSTRACT

Poultry farming has a lot of economic representation in Brazil. The country emerges as the 3rd largest producer and 1st in exports worldwide. Because is a protein more consumed, chicken meat needs to be a quality and safe product. One of the biggest challenges in the food industry is the contamination of products by *Salmonella* spp. This Gram-negative bacterium is pointed out as the major cause of disease transmitted by food in humans. Being most of the contamination of the product occurs in the slaughterhouse. A characteristic that favors contamination in this environment is the formation of biofilm, a matrix self-produced by bacteria on equipment surfaces. Thus, the objective of this study is to evaluate the ability of biofilm formation of different serovars of *Salmonella* sp. isolated from trawling swabs of poultry litter. Of the 327 isolates, 301 formed biofilm (92.05%), the majority (65.44%) classified as weak biofilm producer. Our results demonstrate the importance of adopting cleaning and disinfection measures in slaughterhouse plants, returning efforts also to the removal of biofilms.

Keywords: poultry; slaughterhouse; one health.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Diferenciação bioquímica preliminar das <i>Salmonella</i> spp.....	24
Tabela 2. Diferenciação bioquímica complementar de <i>Salmonella</i> spp.....	24
Tabela 3. Isolados de <i>Salmonella</i> e seu perfil de formação de biofilme.	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CGAL	Coordenação-Geral de Laboratórios Agropecuários
CQ	Controle de Qualidade
DIPOA	Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal
FDA	Food and Drug Administration
H ₂ S	Sulfeto de Hidrogênio
LIA	Ágar Lisina Ferro
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
OD	Densidade Ótica
PNCP	Programa de Redução de Patógenos
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola
RT	Responsável Técnico
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SIM	Meio Sulfato-Indol-Motilidade
TSI	Ágar Triplo açúcar ferro
VM	Vermelho de Metila
VP	Voges-Proskauer

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	10
INTRODUÇÃO	16
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
1.1 PRODUÇÃO DE FRANGO DE CORTE E SUA IMPORTÂNCIA ECONÔMICA.....	18
1.2 DOENÇAS VEICULADAS POR ALIMENTOS	18
1.3 SALMONELLA SP.	19
1.4 SALMONELLA SP. EM FRANGOS DE CORTE	21
1.5 BIOFILME	22
OBJETIVO	23
MATERIAL E MÉTODOS	23
1.6 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS	23
1.7 FORMAÇÃO E AVALIAÇÃO DE BIOFILME	25
RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS.....	31

INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca mundialmente como terceiro maior produtor de frango de corte do mundo (14.500 toneladas produzidas em 2.021) e maior exportador dessa proteína (4.225 toneladas exportadas em 2.021) (EMBRAPA, 2022). Os dados de produção se refletem no consumo. Em média, cada brasileiro consome 43 kg de carne frango por ano, *in natura* e nas mais variadas formas de processamento (inteiro, em pedaços, salsichas, alimentos prontos dentre outros) (EMBRAPA, 2022). Por ser um alimento tão consumido e com a produção dinâmica, sua segurança e qualidade são essenciais.

Segundo o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (2022), estima-se que a cada ano, 48 milhões de pessoas adoeçam por doenças veiculadas por alimentos. Sendo, muitas delas atreladas a infecção por *Salmonella*, totalizando cerca de 1,35 milhões de casos, ainda segundo ao CDC. No Brasil, *Salmonella* spp. é o agente etiológico mais prevalente em surtos alimentares oficialmente notificados em que há identificação do micro-organismo (BRASÃO, 2017). A salmonelose em humanos é uma doença que cursa com diarreia e febre e pode ser fatal para indivíduos imunocomprometidos (BRASIL, 2011).

A *Salmonella* spp. É um bacilo Gram-negativo que se encontra presente no trato gastrointestinal dos frangos, tornando assim um fator de risco de contaminação dos produtos cárneos na planta frigorífica (ANTUNES; MOURÃO; CAMPOS; PEIXE, 2016).

Uma importante característica que contribui para a contaminação no processo de abate é a produção de biofilme (OLIVEIRA et al 2010). Biofilme é uma matriz extracelular rica em polímeros autoproduzidos pelas células bacterianas que permanecem incorporadas neste meio. (DONLAN, 2002). Sendo um importante mecanismo de resistência no ambiente (LIU et al., 2020), dificultando a ação de sanitizantes e o risco de falhas nos processos de limpeza (MØRETRØ et al., 2017).

Diversos estudos apontaram a presença de *Salmonella* sp. em biofilmes nos frigoríficos de frangos e na indústria de alimentos. A importância epidemiológica da presença do agente nas granjas e no frigorífico são tópicos que precisam de atenção. (SILVA et al. 2018).

Portanto, garantir a inocuidade da carne de frango é essencial para garantir a segurança do produto para o consumidor e para isso se faz necessário entender os desafios ligados a essa cadeia produtiva.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 PRODUÇÃO DE FRANGO DE CORTE E SUA IMPORTÂNCIA ECONÔMICA

A produção de carne de frango é extremamente importante para a economia brasileira. Nos últimos 20 anos (2001-2021) houve um aumento de 94% no total de produção mundial de carne de frango (AVISITE, 2022).

O Brasil é o terceiro maior produtor de frango de corte do mundo (14.500 toneladas produzidas em 2.021) e maior exportador dessa proteína (4.225 toneladas exportadas em 2.021) (EMBRAPA, 2022). Exportando para mais de 150 países, gerando uma receita de US\$ 7,6 bilhões (BRASIL, 2022). Santa Catarina é o segundo maior produtor e exportador de carne de frango do Brasil, respondendo por 24,55% das receitas brasileiras com a proteína. Em 2021, a carne de frango catarinense foi exportada para 129 países, segundo dados da Secretaria do Estado da Fazenda (2022).

Para a atividade avícola brasileira se manter internacionalizada, é necessário o emprego de medidas rigorosas de controle e prevenção, contra agentes que causam enfermidades infecciosas em aves de produção, bem como surtos alimentares em humanos. (STELLA *et al.*, 2021). Para garantir a qualidade e segurança do produto, os procedimentos de criação e abate seguem normas rígidas visando evitar a contaminação das carcaças (BRASIL, 2003).

1.2 DOENÇAS VEICULADAS POR ALIMENTOS

As toxinfecções de origem alimentar são um sério problema de saúde pública. Já foram descritas mais de 250 doenças veiculadas por alimentos, sendo essas causadas por bactérias, vírus, parasitas, fungos, produtos químicos e toxinas (CDC, 2022). A estimativa do *Food and Drug Administration* (FDA) (2022), é que 1 a cada 6 americanos fica doente anualmente por consumir alimentos contaminados, equivalendo a 128000 hospitalizações e 3000 mortes.

Os casos de doenças veiculadas por alimento são caracterizadas quando uma ou mais pessoas apresentam sintomas similares, após a ingestão de alimentos contaminados com micro-organismos patogênicos, suas toxinas, substâncias químicas tóxicas ou objetos lesivos sendo detectado uma fonte comum (CDC, 2022).

Segundo o CDC (2022) os principais agentes veiculados por alimentos nos Estados Unidos da América atualmente são: Norovírus, *Salmonella* sp; *Clostridium perfringens*, *Campylobacter* sp. e *Staphylococcus aureus*.

1.3 SALMONELLA SP.

As bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família *Enterobacteriaceae*. O gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*. A *S. enterica* é dividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Sendo dessas, a entérica a mais importante no âmbito da saúde pública, e possui de acordo com o perfil antigênico mais de 2400 sorovares. Desses, menos de 100 estão envolvidos em casos de salmonelose em humanos (BRASÃO, 2017).

Morfologicamente, são bacilos Gram-negativos, não são esporogênicos, móveis (exceto os sorovares *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*). São consideradas anaeróbias facultativas, catalase positivas, oxidase negativas. Utilizam citrato como fonte exclusiva de carbono e descarboxilam lisina e ornitina. Produzem ácido sulfídrico (H₂S), são ureia, indol e teste de Voges-Proskauer negativas. Normalmente fermentam açúcares como maltose, manitol, manose, sorbitol e trealose, entretanto não fermentam lactose. Crescem em temperatura de 7° a 45°C, sobrevivem ao congelamento na presença de matéria orgânica por longos períodos e toleram o pH de 4,5 a 9. Entretanto as condições mais favoráveis para crescimento são aerobiose com temperatura entre 35-37°C e pH 6,5 a 7,5 (QUINN 2002).

A classificação tradicional do gênero *Salmonella* é realizada pelo Esquema Kauffmann-White, que se baseia na caracterização dos antígenos somático (O), correspondendo pelos lipopolissacarídeos da parede celular e flagelares de teor proteico (H). Existe ainda o antígeno capsular único (Vi), presente nos sorovares *S. Thyphi*, *S. Paratyphi* e *S. Dublin*. Os sorovares com maior potencial zoonótico são da subespécie *enterica* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

A sua fisiopatogenia está associada com a invasão das células epiteliais através do sistema de secreção tipo III (T3SS-1), ele permite que a *Salmonella* spp. induza rearranjos na actina celular, formando projeções na membrana citoplasmática que englobam a bactéria e a alocam internamente em fagossomos (TEMME et al. 2008).

Já a invasão das células M está associada a outro tipo de sistema de secreção do tipo III (T3SS-2), que permite a sobrevivência no interior de macrófagos, permitindo sua multiplicação e posterior infecção de células adjacentes. Os dois sistemas de secreção do tipo III são cruciais para a chegada da bactéria à lâmina própria do intestino, resultando nas alterações morfológicas associadas aos sinais clínicos, inflamação e enterocolite. Sendo a diarreia provocada pelo aumento de permeabilidade vascular, edema e perda de proteínas plasmáticas entéricas, também micro-erosões na mucosa intestinal, facilitando a passagem de fluído intersticial para o lúmen intestinal (DARWIN; MILLER 1999).

Em muitos casos da doença, a dose infectante pode ser mais baixa, variando de acordo com a virulência da cepa em questão. Entretanto, estima-se que a dose infectante do gênero *Salmonella* seja 10^6 a 10^8 unidades formadoras de colônias (UFC) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Os sinais clínicos da salmonelose em humanos iniciam entre 8 e 18 horas após a ingestão de alimento contaminado. E sua apresentação varia com sinais de calafrios, dor de cabeça, vômito, diarreia e febre alta. Geralmente a infecção é auto-limitante, com curso de 2 a 5 dias. Entretanto, mesmo após a recuperação, os pacientes podem excretar *Salmonella* sp. via fecal por várias semanas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

A doença pode ocorrer tanto em surtos quanto em casos esporádicos. Sua prevalência é de difícil avaliação, devido à subnotificação de casos e também à falta de diagnósticos confirmatórios. Estima-se que para cada notificação de Salmonelose, até 38 pessoas adoeceram (FDA, 2022).

Os sorovares de *Salmonella* Typhimurium e Enteritidis são os principais associados a salmonelose veiculada por alimentos, sendo a segunda associada principalmente ao consumo de produtos avícolas. Mas ambas podem ser veiculadas por produtos de origem animal. Devido à natureza multifatorial da transmissão de *Salmonella* sp. na cadeia de alimentos, muitas vezes não é possível estabelecer uma correlação entre os sorotipos mais prevalentes em aves e os mais comuns implicados na salmonelose humana oficialmente reportada (VOSS-RECH et al. 2015).

Com isso, o controle de *Salmonella* sp. é fundamental por sua relação com a saúde única e representa um grande desafio ao setor avícola, principalmente pela emergência e diversidade de novos sorovares (CARDOSO E TESSARI, 2013).

1.4 *Salmonella* sp. EM FRANGOS DE CORTE

A salmonelose aviária é um termo usado para se referir aos três tipos diferentes de doenças bacterianas causadas pelo gênero *Salmonella* sp. em aves (pulorose, tifo aviário e paratifo aviário). Os dois sorovares imóveis são patógenos específicos de aves, *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*. Causando respectivamente pulorose, doença sistêmica aguda geralmente em aves jovens e tifo aviário, uma doença septicêmica aguda ou crônica mais frequente em aves adultas. Ambas são responsáveis por graves perdas econômicas e continuam amplamente prevalentes em algumas regiões do mundo. Já o paratifo aviário, é causada pelos demais sorotipos de *Salmonella* sp., afetando as mais diversas espécies animais, incluindo humanos (REVOLLEDO; FERREIRA 2008).

Prezando pela sanidade das criações de aves, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) implantou diversas legislações, compreendendo o monitoramento e fiscalização em todos os elos da cadeia de produção da carne de frango de corte visando a redução de contaminação dos produtos. No ano de 1994, foi instituído o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), através da Portaria Nº 193, objetivando o controle e erradicação das principais doenças que acometem as aves de produção, dentre elas a salmonelose, os sorovares contemplados no programa são *Salmonella Pullorum*, *Salmonella Gallinarum*, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella* monofásica (1,4[5],12:-:1,2) e *Salmonella* monofásica (1,4[5],12:i:-) (BRASIL, 1994).

Já o Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA), instituiu o Programa de Redução de Patógenos (PNCP), que por meio da Instrução Normativa Nº 70 de 2003 (BRASIL, 2003) dita que os estabelecimentos com registro no Serviço de Inspeção Federal (SIF) devem realizar monitoramento da presença de *Salmonella* spp. Por meio do sorteio para análise laboratorial de carcaças de frango e perus *in natura*. Ampliando as determinações da IN-70, o MAPA, por meio da Instrução Normativa Nº 20 de 21 de outubro de 2016 (BRASIL, 2016), instituiu o Programa de Controle e Monitoramento de *Salmonella* spp. nos estabelecimentos avícolas de frangos e perus de corte e nos estabelecimentos de abate de frangos, galinhas, perus de corte e reprodução, registrados no SIF, com o objetivo de reduzir a prevalência desse agente e estabelecer um nível adequado de proteção ao consumidor. Esta instituiu a obrigatoriedade de colheita e análise de amostras de cama dos galpões aviários, por meio da realização do suabe de cama (suabe de arrasto ou propés) ou

fezes de aves, para presença ou ausência da *Salmonella* spp., sendo a coleta realizada pela equipe técnica e Responsável Técnico (RT), com subsequente envio aos laboratórios oficiais ou credenciados junto ao MAPA, devendo o resultado do ensaio, ser determinados em tempo hábil, antes do lote de aves ir para o abate.

A IN-20/2016 estabeleceu um programa oficial de colheita de carcaças, realizada por sorteio e efetuada por servidores federais do MAPA lotados nos frigoríficos, com envio aos laboratórios oficiais para análise da presença de *Salmonella* spp., de acordo com as determinações da Coordenação-Geral de Laboratórios Agropecuários (CGAL/MAPA). Além do controle oficial, a IN-20/2016 também instituiu a obrigatoriedade de as empresas integradoras incluírem um programa de autocontrole e monitoramento da *Salmonella* spp. nos seus programas de Controle de Qualidade (CQ), com colheita de carcaças em maior número e em intervalo de tempo menor, além do controle e monitoramento da *Salmonella* spp., desde a obtenção da matéria prima até o produto final da produção de carne de frango e perus.

1.5 BIOFILME

Os biofilmes possuem grande importância principalmente nas áreas médica e de indústria de alimentos. A formação de biofilme é um dos maiores mecanismos de proteção e sobrevivência dos microrganismos em condições de estresse (FAZELI-NASAB et al. 2022).

O biofilme é definido como um agregado de diversos microrganismos que se aderem irreversivelmente a uma superfície e são protegidas por uma matriz de materiais poliméricos, proteínas e DNA. Com habilidade de responder às mudanças ambientais, algumas enzimas são secretadas por bactérias presas nos biofilmes. Essas enzimas afetam os compostos da matriz extracelular adequando a melhor forma de proteção (RUMBAUGH; SAUER, 2020).

Na fase de biofilme, as células bacterianas podem se comunicar e realizar transferência de genes por exemplo. Além disso essa matriz extracelular também protege as bactérias contra os produtos químicos antibacterianos, os compostos oxidantes e os efeitos nocivos da radiação (DAVEY; OTOOLE, 2000).

Diversos estudos sugerem que a maioria dos surtos, cujos agentes etiológicos são veiculados por alimentos, parecem estar associados à existência de biofilmes. Pelo fato dos surtos serem esporádicos e não contínuos, assim como somente

algumas porções dos produtos estarem contaminadas, consequência do desprendimento intermitente dos microrganismos dos biofilmes, que é dependente, dentre outros fatores, do período entre higienizações (KASNOWSKI, 2010).

Stepanovic *et al.* (2004) demonstraram em seu trabalho que bactérias causadoras de doenças veículas por alimentos, ligadas a produtos de origem animal, *Listeria* spp. E *Salmonella* sp. possuem habilidade de formar biofilme. Portanto, entender a capacidade de formação de biofilme de isolados de *Salmonella* sp. é essencial para controlar a contaminação de carne de frango (OBE et al., 2021).

OBJETIVO

Avaliar e classificar a formação de biofilme de diferentes sorovares de *Salmonella* spp. isolados de frangos de corte.

MATERIAL E MÉTODOS

1.6 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS ISOLADOS

Os isolados de *Salmonella* spp. são provenientes dos isolados de campo do VERTÀ Laboratórios. O cultivo bacteriano seguiu as normativas do Plano Nacional de Sanidade Avícola (BRASIL, 1994).

As amostras de suabe de arrasto foram acrescidas com caldo BHI (Infusão de cérebro e coração), para fornecer condições de pré enriquecimento. As amostras foram então incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse período foi realizada a etapa de enriquecimento seletivo, que consiste na retirada de alíquotas do pré-enriquecimento para o meio Rappaport-vassiliadis, e Tetrionato e incubadas a 42°C e a 37°C por 24 horas, respectivamente.

Da cultura em enriquecimento seletivo foi realizado, com alça descartável, o plaqueamento em meios seletivos e diferenciais (como por exemplo ágar MacConkey e Ágar Verde Brilhante), as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. A identificação das colônias suspeitas era realizada através da observação fenotípicas das colônias obtidas do procedimento anterior, sendo sugestivas de *Salmonella* sp. colônias translúcidas/incolores (lactose negativas) em ágar MacConkey, e rosadas/avermelhadas no ágar verde brilhante.

Das placas suspeitas eram colhidas, com auxílio de uma agulha de platina previamente flambada, entre duas e três colônias sugestivas para *Salmonella* sp. e

transferidas para provas bioquímicas preliminares: Ágar Triplo açúcar ferro (TSI), Ágar Lisina Ferro (LIA), meio Sulfato-Indol-Motilidade (SIM) e Caldo Ureia. Os resultados esperados para isolados de *Salmonella* sp. são descritos na Tabela 1. Esses foram incubados a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas. As colônias que apresentaram reações características de *Salmonella* spp. passaram por provas bioquímicas complementares que estão descritas na Tabela 2.

Tabela 1. Diferenciação bioquímica preliminar das *Salmonella* spp.

Comportamento bioquímico		<i>Salmonella Pullorum</i>	<i>Salmonella Gallinarum</i>	<i>Salmonella</i> sp.
TSI 24 horas	Base	A gás +/-	A gás -	A gás +
	Bisel	V	V	V ou A
	H ₂ S	+/-	+	+
LIA 24 horas	Base	P	P	P
	H ₂ S	+/-	+	+
Urease		-	-	-
Motilidade		-	-	+

Fonte: Adaptado de Brasil (1995).

Tabela 2. Diferenciação bioquímica complementar de *Salmonella* spp.

Comportamento bioquímico	<i>Salmonella Pullorum</i>	<i>Salmonella Gallinarum</i>	<i>Salmonella</i> spp.
Indol	-	-	-
VM	+	+	+
VP	-	-	-
Citrato	-	-	+
H ₂ S (TSI)	D	+	+
Urease	-	-	-
Fenilalanina	-	-	-
Lisina descarboxilase	+	+	+
Arginina desidrolase	D	-	-
Ornitina descarboxilase	+	-	+
Motilidade	-	-	+
Malonato	-	-	V
D-Glicose prod. de ácido	+	+	+
D-Glicose prod. de gás	D	-	+
Lactose	-	-	-
Sacarose	-	-	-
D - Manitol	+	+	+
Dulcitol	-	+	V
Maltose	-	+	+

Fonte: Adaptado de Brasil (1995).

De acordo com o resultado as cepas sugestivas nas provas bioquímicas foram caracterizadas antígenicamente pela técnica de soro aglutinação rápida.

Para a técnica de soro aglutinação rápida, as colônias suspeitas eram repicadas em ágar nutriente inclinado e incubados a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas. No tubo com crescimento bacteriano era adicionado 1,0 mL de solução salina 0,85% estéril e homogeneizados.

Sobre a superfície de uma lâmina, se adicionava uma gota da solução salina 2% e outra de soro anti-somático "O" polivalente de *Salmonella* spp. Acrescentava-se uma gota da amostra sobre cada uma delas e homogeneizava-se. A leitura era feita em 30 a 60 segundos, com iluminação sobre fundo escuro. A reação era classificada como positiva quando havia presença de aglutinação.

As cepas móveis não rugosas, que apresentarem resultado positivo frente ao soro anti-somático "O" polivalente de *Salmonella* spp. eram caracterizadas antígenicamente com os soros anti-somáticos "B" (04) e "D" (09) de *Salmonella* sp..

Com o soro anti-somático "B" (04), caso houvesse aglutinação na mistura, o ensaio prossegue na caracterização antigênica frente aos soros anti-flagelares H1 e H2 de *Salmonella* no sentido de se identificar a *Salmonella* Typhimurium (1, 4, [5], 12:i:1, 2). Sendo que a aglutinação 4:i:2 confirma o sorovar Typhimurium.

As cepas móveis que não apresentavam resultado positivo frente ao soro anti-somático "B" (04) eram submetidas ao teste de aglutinação frente ao soro antisomático "D" (09). Caso se obtivesse a aglutinação da mistura cultura + soro antisomático "D" (09) prosseguia-se na caracterização antigênica frente aos soros anti-flagelares: Hg, m; Hg, p; Hm, Hp e Hq, no sentido de identificar a *Salmonella* Enteritidis (1,9,12:g,m:).

1.7 FORMAÇÃO E AVALIAÇÃO DE BIOFILME

A formação e quantificação de biofilme foi realizada conforme (STEPANOVIĆ *et al.*, 2004). Os cultivos puros de *Salmonella* spp. foram repicados para ágar nutriente e incubados por 24 horas a $37^{\circ}\text{C} \pm 1$. Posteriormente a isso, uma colônia isolada foi transferida para caldo BHI (Infusão de cérebro e coração), que foi incubado nas mesmas condições descritas anteriormente, visando formar o inóculo para produção *in vitro* de biofilme.

Para a formação *in vitro* de biofilme, foram adicionados 20 μl do inóculo bacteriano em 230 μl de meio BHI em cada poço de microplacas de polietileno. As

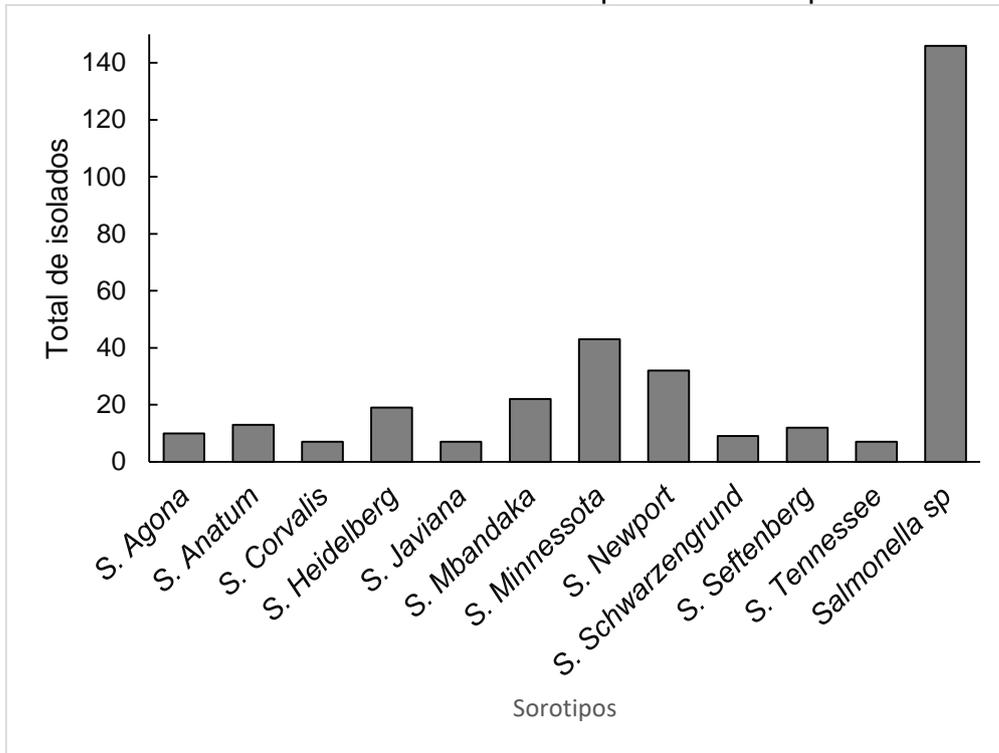
placas foram incubadas em aerofilia durante 24 horas a 35°C. Em seguida foram lavadas três vezes com 300 uL de água destilada estéril por poço, o biofilme fixado com 250 uL de metanol por poço, por 15 minutos e depois as placas foram secas. O biofilme foi corado com cristal-violeta por 5 minutos e o excesso de corante foi lavado. Para quantificação do biofilme, foram adicionados 250µl de ácido acético glacial a 33% por poço e medida a densidade ótica (OD) por espectrofotometria em tamanho de onda de 570 nm. O isolado foi classificado conforme o valor da OD, sempre em relação ao controle negativo. Sendo não produtor de biofilme, quando a OD foi igual ou inferior ao OD do controle, fraco produtor de biofilme quando o OD foi igual ou até duas vezes maior do que o do controle negativo. Moderado produtor quando o OD da amostra obteve valor entre 2 a 4 vezes maior que o do controle negativo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O total de isolados por sorovar e sua classificação quanto à formação de biofilme estão descritos na Tabela 3.

Das 327 cepas isoladas neste trabalho 146 foram identificadas apenas como pertencentes ao gênero *Salmonella* sp. (44,64%). Dentre os sorovares, o mais prevalente foi *S. Minnesota* (43/327) com 13,15%, seguida pelo sorovar *S. Newport* (32/327) com 9,78% e *S. Mbandaka* (22/327) com 6,73%. O Gráfico 1. Demonstra os sorovares isolados neste estudo.

Diferentes fatores contribuem para a prevalência de determinados sorovares de *Salmonella* sp., por exemplo sabe-se que as salmonelas paratíficas não causam doença primária nas aves, o que favorece sua manutenção no microbioma intestinal e consequente disseminação no ambiente (PICKLER et al. 2014). Entretanto nos últimos anos, tanto no Brasil quanto no mundo, há aumento de isolamentos de *S. Minnesota* na cadeia avícola (SCHERRER & MARCON, 2016). Em um trabalho realizado por VOSS-RECH et al. (2015), este foi o sorovar mais prevalente, representando 40,24% dos isolamentos. A distribuição epidemiológica da *Salmonella* sp. é bastante complexa. Muitos sorotipos que também são capazes de colonizar o trato intestinal de frangos de corte, e consequentemente contaminar carcaças durante o abate podem circular na cadeia produtiva, representando um desafio para minimizar os riscos ao consumidor final.

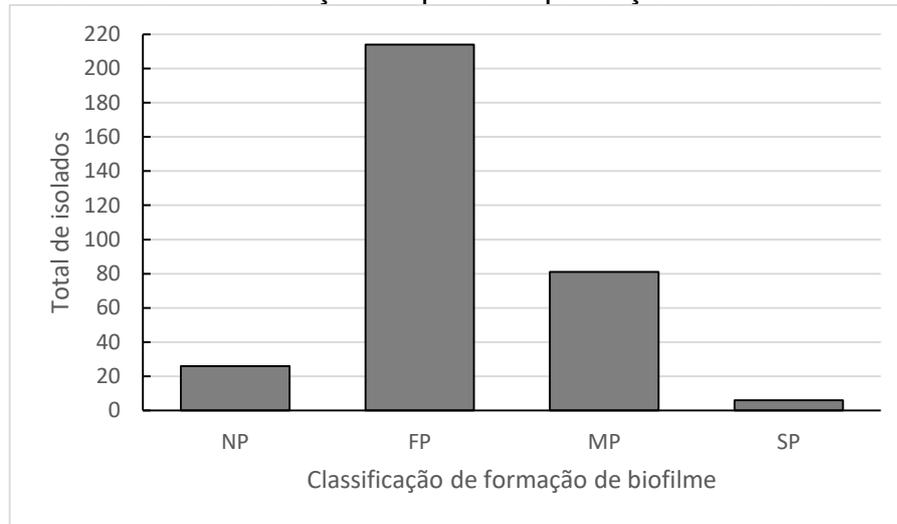
Gráfico 1 Sorovares de *Salmonella* sp. isolados no período do estudo.

Fonte: a autora.

Dos 327 isolados, 301 formaram biofilme (92,05%), sendo a maioria, 65,44%, classificada como fraca produtora de biofilme (214/327), 24,77% dos isolados foram classificados como médios produtores (81/327) e 1,83% (6/327) dos isolados se mostraram forte produtores. Os dados são expostos no Gráfico 2. Em trabalho realizado por Borges et al. (2018) 92,2% das cepas foram capazes de formar biofilme, mostrando dados semelhantes aos apresentados no presente trabalho.

A influência do sorotipo de *Salmonella* spp. na capacidade de formar biofilme ainda não está completamente elucidada. A comparação de resultados entre os trabalhos publicados é dificultada devida a grande variação de prevalência de sorotipos isolados em cada região.

Gráfico 2. Classificação de perfil de produção de biofilme.



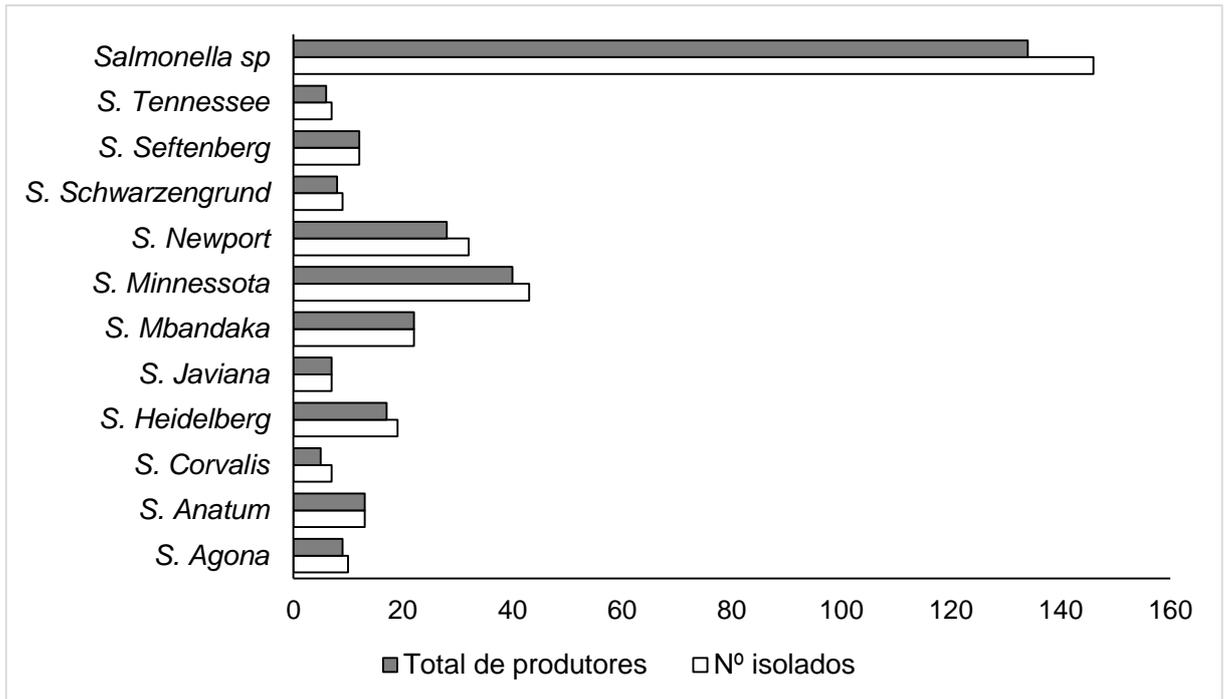
NP: não produtora; FP: fraca produtora; MP: média produtora; SP: forte produtora.

Fonte: a autora.

Todos os sorovares isolados nesse estudo produziram biofilme. Destacam-se as cepas de *S. Anatum*, *S. Javiana*, *S. Mbandaka* e *S. Seftenberg*, onde todos os isolados formaram biofilme. O Gráfico 3. Compara o total de isolados e o total de produtores por sorovar.

Em trabalho realizado por Brasão (2017), que avaliou a formação de biofilme de *S. Minnessota* 66% dos isolados foram capazes de formar biofilme. A formação de biofilmes da *Salmonella* em placas de poliestireno constitui uma preocupação, pois os materiais plásticos são frequentemente utilizados na cadeia de produção e beneficiamento da carne de frango (DÍEZ-GARCÍA et al. 2012).

Gráfico 3. Total de isolados e capacidade de formar biofilme por sorovar.



Fonte: a autora.

Tabela 3. Isolados de Salmonella e seu perfil de formação de biofilme.

Sorotipo	Nº isolados	NP	FP	MP	SP	Total de produtores
<i>S. Agona</i>	10	1	8	1	0	9
<i>S. Anatum</i>	13	0	7	4	2	13
<i>S. Corvalis</i>	7	2	4	1	0	5
<i>S. Heidelberg</i>	19	2	15	2	0	17
<i>S. Javiana</i>	7	0	4	3	0	7
<i>S. Mbandaka</i>	22	0	16	5	1	22
<i>S. Minnesota</i>	43	3	20	19	1	40
<i>S. Newport</i>	32	4	15	13	0	28
<i>S. Schwarzengrund</i>	9	1	6	2	0	8
<i>S. Seftenberg</i>	12	0	10	2	0	12
<i>S. Tennessee</i>	7	1	5	1	0	6
<i>Outros isolados de Salmonella spp.</i>	146	12	104	28	2	134
Total	327	26	214	81	6	301

CONCLUSÃO

Salmonella spp. é um dos agentes mais preocupantes no âmbito das doenças transmitidas por alimentos, em especial na indústria da avicultura de corte. Neste trabalho, diversos sorovares foram isolados durante o período do estudo e todos foram capazes de produzir biofilme. Mesmo a maioria dos isolados sendo classificados como baixo produtores, esse resultado demonstra a importância de se avaliar e direcionar os protocolos de controle e biossegurança nas granjas e limpeza e desinfecção nas plantas frigoríficas visando a inocuidade do produto e segurança ao consumidor.

REFERÊNCIAS

ANTUNES, P.; MOURÃO, J.; CAMPOS, J.; PEIXE, L.. Salmonellosis: the role of poultry meat. **Clinical Microbiology And Infection**, [S.L.], v. 22, n. 2, p. 110-121, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2015.12.004>.

AVISITE: **Carne de frango: em duas décadas, produção mundial aumenta 94%; a brasileira, 120%**. Disponível em: <https://www.avisite.com.br/carne-de-frango-em-duas-decadas-producao-mundial-aumenta-94-a-brasileira-120/#:~:text=Estimativas%20do%20Departamento%20de%20Agricultura,dos%20100%20milh%C3%B5es%20de%20toneladas..> Acesso em: 29 out. 2022.

BRASÃO, S.C. **Biofilmes de Salmonella Minnesota**: formação, influência da superfície, inibição por agentes químicos e importância do período entre tratamentos. 2017. 82p. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Uberlândia, MG, 2017.

BORGES K.A., Furian T.Q., Souza S.N., Menezes R., Tondo E.C., Salle C.T.P., Moraes H.L.S. & Nascimento V.P. 2018. Biofilm formation capacity of Salmonella serotypes at different temperature conditions. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 38 (1):71-76.

BRASIL lidera ranking mundial de exportação de carne de frango. Disponível em: <https://www.gov.br/pt-br/noticias/financas-impostos-e-gestao-publica/2022/09/brasil-lidera-ranking-mundial-de-exportacao-de-carne-de-frango>. Acesso em: 30 out. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. 2011. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial da Salmonella spp**. 1.ed. Brasília.

CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, ELN.C. Salmonella enteritidis em aves e na saúde pública: Revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 21, 2013.

Centers for Disease Control and Prevention, - CDC - **Surveillance for Foodborne-Disease Outbreaks - United States, 1998-2002. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR) November, 2006**. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss5510a1.htm#top> > Acesso em: 29 out. 2022.

DARWIN, K.H.; MILLER, V.L. Molecular Basis of the Interaction of Salmonella with the Intestinal Mucosa. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.3, p.405-428, 1999.

DÍEZ-GARCÍA, Miryam; CAPITA, Rosa; ALONSO-CALLEJA, Carlos. Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of Salmonella isolates from poultry. **Food Microbiology**, [S.L.], v. 31, n. 2, p. 173-180, set. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2012.03.012>.

DONLAN, R. M. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. **Emerging Infectious**

Diseases •, [s. l.], v. 8, n. 9, 2002. Available at: <http://www.microbelibrary.org/>. Acesso em: 9 maio 2022.

EMBRAPA - **Qualidade da carne de aves**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/qualidade-da-carne/carne-de-aves>. Acesso em: 24 out. 2022.

EMBRAPA Suínos e Aves - **Estatísticas frango de corte**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas/frangos/mundo>. Acesso em: 24 out. 2022.

FAZELI-NASAB, Bahman; SAYYED, R.Z.; MOJAHED, Laleh Shahraki; RAHMANI, Ahmad Farid; GHAFARI, Mehrangiz; ANTONIUS, Sarjiya; SUKAMTO. Biofilm production: a strategic mechanism for survival of microbes under stress conditions. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, [S.L.], v. 42, p. 102, jul. 2022. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102337>.

FOOD and Drug Administration: Foodborne Pathogens. Foodborne Pathogens. Disponível em: <https://www.fda.gov/food/outbreaks-foodborne-illness/foodborne-pathogens>. Acesso em: 25 nov. 2022.

FOODBORNE Germs and Illnesses. Disponível em: <https://www.cdc.gov/foodsafety/foodborne-germs.html>. Acesso em: 26 out. 2022.

Ministério da Saúde. **Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da Salmonella spp**. Brasília, 2011. 64 p. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_tecnico_diagnostico_laboratorial_salmonella_spp.pdf. Acesso em: 23 out. 2022.

KASNOWSKI, M.C. et al. Formação de biofilmes na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.8, n.15, julho 2010.

LIU, C. *et al.* **The Regulation of Bacterial Biofilm Formation by cAMP-CRP: A Mini-Review**. [S. l.]: Frontiers Media S.A., 2020. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00802>

MØRETRØ, T. *et al.* Tolerance to quaternary ammonium compound disinfectants may enhance growth of *Listeria monocytogenes* in the food industry. **International Journal of Food Microbiology**, [s. l.], v. 241, p. 215–224, 2017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.025>

OBE, T.; NANNAPANENI, R.; SCHILLING, W.; ZHANG, L.; KIESS, A.. Antimicrobial tolerance, biofilm formation, and molecular characterization of *Salmonella* isolates from poultry processing equipment. **Journal Of Applied Poultry Research**, [S.L.], v. 30, n. 4, p. 100195, dez. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.japr.2021.100195>.

OLIVEIRA, M. M. M. et al. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**. vol.69 nº.3 São Paulo 2010.

QUINN, P.J. MARKEY, B.K. CARTER, M.E. DONNELLY, W. J. LEONARDO, F. C. Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Porto Alegre, RGS: ArtMed Editora, 2002. 512p.

REVOLLEDO, L.; FERREIRA, J. P. **Patologia Aviária**. São Paulo: Manole, 2008.

RUMBAUGH, Kendra P.; SAUER, Karin. Biofilm dispersion. **Nature Reviews Microbiology**, [S.L.], v. 18, n. 10, p. 571-586, 12 jun. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-020-0385-0>.

Secretaria do Estado da Fazenda. **Com rodovias bloqueadas, prejuízo diário no setor de suínos e aves de SC**. Disponível em: <https://www.sef.sc.gov.br/midia/noticia/3232#:~:text=Segundo%20maior%20produtor%20e%20exportador,milh%C3%B5es%20de%20aves%20por%20dia..> Acesso em: 27 nov. 2022

SILVA, Paula L. A. P. A.; GOULART, Luiz Ricardo; REIS, Thais F. M.; MENDONÇA, Eliane P.; MELO, Roberta T.; PENHA, Victor A. S.; PERES, Phelipe A. B. M.; HOEPERS, Patrícia G.; BELETTI, Marcelo E.; FONSECA, Belchiolina B.. Biofilm Formation in Different Salmonella Serotypes Isolated from Poultry. **Current Microbiology**, [S.L.], v. 76, n. 1, p. 124-129, 17 dez. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-018-1599-5>.

STELLA, Ariel Eurides *et al.* Salmonelose Aviária. **Research, Society And Development**, [S.L.], v. 10, n. 4, p. 1-13, 28 mar. 2021. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i4.13835>.

STEPANOVIĆ, S. *et al.* Biofilm formation by Salmonella spp. and Listeria monocytogenes on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**, [s. l.], v. 38, n. 5, p. 428–432, 2004. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01513.x>

TEMME, K; SALIS, H.; TULLMAN-ERCEK, D.; LEVSKAYA, A.; SOON-HO, H.; VOIGT, C. A.; Induction and Relaxation Dynamics of the Regulatory Network Controlling the Type III Secretion System Encoded with in Salmonella Pathogenicity Island 1. **Journal of Molecular Biology**, n. 377, 47–61, 2008.

VOSS-RECH, Daiane; VAZ, Clarissa S.L.; ALVES, Luana; COLDEBELLA, Arlei; LEÃO, Joice A.; RODRIGUES, Dália P.; BACK, Alberto. A temporal study of Salmonella enterica serotypes from broiler farms in Brazil. **Poultry Science**, [S.L.], v. 94, n. 3, p. 433-441, mar. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/peu>

