



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Caracterização do potencial patogênico de *Salmonella*
enterica isoladas de frango

CAROLINE FAGANELLO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título
de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia
Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia de*
Parasitas e Micro-organismos.

Orientadora: Profa. Dra. Vera Lúcia Mores Rall

BOTUCATU – SP

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Faganello, Caroline.

Caracterização do potencial patogênico de *Salmonella* enterica isoladas de frango / Caroline Faganello. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Vera Lúcia Mores Rall
Capes: 21200009

1. Biofilmes. 2. Resistência microbiana a medicamentos. 3. Salmonelose em frango de corte. 4. Desinfetantes.

Palavras-chave: Biofilme; Genes de virulência; Resistência a antimicrobianos; Salmonelose; Sanitizantes.

Ao meu irmão Felipe e especialmente aos meus pais, Rosana e Vlamir, com imenso amor e gratidão, por tudo o que fizeram e continuam fazendo por mim, sem vocês eu não teria chego até aqui. Espero ser merecedora de todo o esforço, amor e cuidado que me dedicam.

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos...

A Deus, por sempre me mostrar o melhor caminho, por colocar tantas pessoas especiais na minha vida e por me proporcionar tantas alegrias.

À minha orientadora, Prof^ª Dr^ª Vera Lúcia Mores Rall por me receber em seu laboratório, por acreditar em mim e por todos os ensinamentos durante esses anos.

À Terue Sadatsune, por sempre se preocupar comigo, por estar sempre pronta a ajudar, pela alegria que transmite, pelo carinho e amizade preciosa que estabelecemos.

À República Tékinfim, amigas de coração e segunda família aqui de Botucatu. Agradeço imensamente pelos 7 anos de convivência, aprendizado, amizade e muita parceria, principalmente nos momentos mais difíceis, e também pelas histórias e momentos tão divertidos que compartilhamos em nosso dia-a-dia.

Às minhas amigas de laboratório Ivana, Stéfani, Erika, Fernanda pela amizade e companhia divertida do dia-a-dia, e principalmente à Bruna por me passar seus conhecimentos e pela grande ajuda durante esses anos.

Aos meus amigos de Rio Claro, em especial ao meu namorado Júlio pelo carinho, parceria, bom humor, paciência e suporte. Agradeço toda a força e incentivo que me deu nessa etapa e por tudo de bom que tem proporcionado na minha vida.

Aos professores Ary Fernandes Júnior e Adriano Okamoto que participaram da banca de qualificação e deram importantes contribuições para a melhoria deste trabalho.

Aos servidores do Departamento de Microbiologia e Imunologia.

*Á Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
(CAPES) pela bolsa de mestrado concedida.*

*E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização e
conclusão de mais essa etapa em minha vida.*

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Características gerais de <i>Salmonella</i> spp.....	13
2.2. Salmonelose.....	14
2.3. Fatores de virulência de <i>Salmonella</i> spp.....	16
2.4. Resistência à antimicrobianos.....	21
2.4.1. β -lactâmicos.....	22
2.4.1.1. β -lactamases de espectro estendido (ESBL).....	23
2.4.1.2. β -lactamases tipo AmpC.....	24
2.4.1.3. Carbapenemases.....	24
2.4.2. Colistina.....	25
2.5. Sanitização.....	26
3. OBJETIVO	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1. Obtenção das amostras.....	29
4.2. Detecção da presença de <i>Salmonella</i>	29
4.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	29
4.3.1. Extração de DNA das cepas de <i>Salmonella</i>	29
4.3.2. Pesquisa dos genes de virulência associados a <i>Salmonella</i>	30
4.3.3. Pesquisa dos genes de resistência associados à <i>Salmonella</i> β -lactamase AmpC, Carbapenemases e Colistina.....	32
4.3.4. Visualização dos genes amplificados.....	32
4.4. Sorotipagem das cepas de <i>Salmonella</i>	33
4.5. Produção de biofilme em microplaca de poliestireno.....	33
4.6. Produtoras de β -lactamase de Amplo Espectro (ESBL).....	33
4.7. Concentração bactericida mínima do ácido peracético e hipoclorito de sódio.....	34
4.8. Teste de susceptibilidade ao hipoclorito de sódio e ácido peracético na presença de biofilme.....	34
5. RESULTADOS	36

5.1. Identificação de <i>Salmonella</i> spp.....	36
5.2. Sorotipagem das cepas de <i>Salmonella</i>	36
5.3. Caracterização molecular dos isolados de <i>Salmonella</i> spp.....	37
5.4. Produção de biofilme em microplaca de poliestireno.....	42
5.5. Resistência bacteriana à antimicrobianos.....	43
5.6. Teste de susceptibilidade aos sanitizantes frente ao biofilme.....	45
6. DISCUSSÃO.....	46
7. CONCLUSÃO.....	51
8. BIBLIOGRAFIA.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do sistema de secreção tipo III (T3SS).....	17
Figura 2. Processo sequencial da formação de biofilme.....	20
Figura 3. Placas com colônias características de <i>Salmonella</i> spp. em diferentes meios de cultura.....	36
Figura 4. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene <i>invA</i> (284 pb).....	37
Figura 5. Distribuição dos genes de virulência, em cepas de <i>Salmonella</i> spp., isoladas de frango.....	37
Figura 6. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene <i>adrA</i> (92 pb).....	38
Figura 7. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene <i>csgD</i> (123 pb).	38
Figura 8. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene <i>sopB</i> (220 pb).....	38
Figura 9. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene <i>sipA</i> (550 pb).....	39
Figura 10. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene <i>sipB</i> (875 pb).....	39
Figura 11. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene <i>sipD</i> (1029 pb).....	39
Figura 12. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene <i>sifA</i> (449 pb).....	39
Figura 13. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene <i>sitC</i> (768 pb).....	40
Figura 14. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene <i>ssaR</i> (1628 pb).....	40
Figura 15. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene <i>iroN</i> (1205 pb).....	40
Figura 16. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene <i>tolC</i> (161 pb).....	40
Figura 17. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene <i>flgL</i> (951 pb).....	41
Figura 18. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene <i>flgK</i> (1656 pb).....	41
Figura 19. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene <i>fljB</i> (1515 pb).....	41
Figura 20. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene <i>sopD</i> (1291 pb).....	41
Figura 21. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene <i>spvB</i> (717 pb).....	42
Figura 22. Teste disco-difusão dos antibióticos ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima e aztreonam em <i>Salmonella</i> spp. isoladas de frango.....	44
Figura 23. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene <i>bla_{CMY-2}</i> (1143pb).....	44
Figura 24. Concentração bactericida mínima (CBM) em <i>Salmonella</i> spp. isolados de frango, para verificar a ação de sanitizantes em 15 minutos.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência dos <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR para detecção dos genes espécie-específico e de virulência das cepas <i>Salmonella</i> spp. isoladas de frango.....	31
Tabela 2. <i>Primers</i> e condições de PCR utilizadas para detecção de genes de resistência para <i>Salmonella</i> spp., isoladas de frango.....	32
Tabela 3. Classificação da produção de biofilme, pelos sorovares de <i>Salmonella</i> spp, isolados de carcaças de frango.....	42
Tabela 4. Perfil de susceptibilidade aos antibióticos usados na triagem fenotípica de produção de β -lactamase de espectro estendido (ESBL) em <i>Salmonella</i> spp. isoladas de frangos.....	43

RESUMO

A salmonelose é uma das doenças de origem alimentar mais frequentes no mundo, causando diferentes sintomas, de acordo com o hospedeiro. *Salmonella* spp. é um dos principais micro-organismos patogênicos que contaminam frangos e seus derivados, representando um grande risco à saúde pública, tanto pelos seus fatores de virulência como pela multirresistência aos antimicrobianos. Assim, o objetivo desse trabalho foi caracterizar o potencial patogênico de *Salmonella* spp. isoladas de frangos obtidos no varejo, através da análise do perfil de virulência e resistência bacteriana aos antimicrobianos e sanitizantes utilizados na indústria e comércio varejista. Foram analisadas 56 isolados de *Salmonella* spp., com a identificação de 13 sorovares diferentes, sendo *S. Enteritidis* (42,8%) o mais frequente. Todos os isolados apresentaram os genes de virulência *invA*, *sipB*, *sipD*, *sopB*, *ssaR*, *sifA*, *sitC*, *iroN*, *tolC*, *flgK*, *fljB* e *flgL*. Os genes *sopD* e *spvB* estavam ausentes em cinco (8,9%) e 21 (37,5%) isolados, respectivamente. Foi observada a produção de biofilme em 27 (48,2%) isolados, sendo 13 (48,1%) cepas classificadas como fraca produtoras, 12 (44,4%) como moderadas e 2 (7,4%) foram classificadas como fortes produtoras. Nenhum isolado apresentou a enzima β -lactamase de espectro estendido (ESBL), porém detectou-se a presença de dos genes *bla_{CMY-2}* e *bla_{NDM}* em 4 (7,1%) e 42 (75%) dos isolados, respectivamente. Em relação a ação dos sanitizantes, 90% dos isolados foram eliminados na concentração de 0,23% de ácido peracético e de 0,44% de hipoclorito de sódio, de acordo com a concentração bactericida mínima observada (CBM_{90%}), tanto antes quanto após o processo de sonicação. Os isolados de *Salmonella* Enteritidis e *S. Typhimurium* foram os mais prevalentes, sendo também os principais produtores de biofilme, o que pode auxiliar na persistência desses patógenos no ambiente de venda, contaminando carnes de boa procedência, se no processo de desinfecção não forem respeitados o tempo de exposição e a concentração adequada do produto. Essa contaminação se torna mais importante pela grande prevalência dos genes que codificam fatores de virulência e pela multirresistência a antimicrobianos.

Palavras-chave: biofilme, genes de virulência, resistência a antimicrobianos, salmonelose e sanitizantes.

ABSTRACT

Salmonellosis is one of the most common foodborne diseases in the world, causing different symptoms, according to the host. *Salmonella* spp. is one of the main pathogenic microorganisms that contaminate chickens and their derivatives, representing a great risk to public health, both for their virulence factors and for the multiresistance of antimicrobials. Thus, the objective of this work was to characterize the pathogenic potential of *Salmonella* spp. isolated from chickens, by analyzing the virulence profile and bacterial resistance to the antimicrobials and sanitizers used in the industry. We analyzed 56 strains of *Salmonella* spp., with *S. Enteritidis* (42.8%) being the most frequent. All isolates showed the virulence genes *invA*, *sipB*, *sipD*, *sopB*, *ssaR*, *sifA*, *sitC*, *iroN*, *tolC*, *flgK*, *fljB* and *flgL*. The *sopD* and *spvB* genes were absent in five (8.9%) and 21 (37.5%) isolates, respectively. Biofilm production was observed in 27 (48.2%) isolates, where 13 (48.1%) strains were classified as weak produced, 12 (44.4%) as moderate and 2 (7.4%) were classified as strong producers. No single isolate presented the extended-spectrum β -lactamase enzyme (ESBL), but detected a presence of the *bla_{CMY-2}* and *bla_{NDM}* genes in 4 (7.1%) and 42 (75%) isolates, respectively. Regarding the action of the sanitizers, 90% of the isolates were eliminated in the concentration of 0.23% of peracetic acid and 0.44% of sodium hypochlorite, both before and after the sonication process. The isolates of *Salmonella* Enteritidis and *S. Typhimurium* were the most prevalent, being also the main producers of biofilm, which may help in the persistence of these pathogens in the sales environment, contaminating meats of good origin, if the exposure time and the appropriate concentration of the product are not observed in the disinfection process. This contamination becomes more important because of the high prevalence of genes encoding virulence factors and multidrug resistance to antimicrobials.

Keywords: Antimicrobial resistance, biofilm, disinfectants, Salmonellosis e virulence genes.

1. INTRODUÇÃO

A sociedade está em constantes transformações e cada vez mais consciente da importância de uma dieta saudável para a manutenção de uma boa saúde, causando um impacto considerável no comportamento do consumidor, com preferências por alimentos de alta qualidade, fáceis de preparar, seguros, com menos aditivos e uma vida longa de prateleira.

Os riscos de contaminação dos alimentos aumentaram com o passar dos anos, podendo tornar-se um perigo à saúde pública, além de gerar prejuízos econômicos. Essa contaminação pode ser de origem química, física ou microbiológica, ocorrendo em qualquer fase da cadeia produtiva. Os contaminantes microbiológicos de natureza patogênica apresentam como principais reservatórios, os animais de produção, tais como aves, porcos, gados, entre outros (Heredia e Garcia, 2018).

A carne de frango é mundialmente consumida, pela quantidade de proteínas e baixo teor de gordura, apresentando importância gastronômica e nutricional. Além disso, o custo é relativamente baixo, o que a torna popular e eleva o seu consumo frente às outras fontes proteicas. O aumento do consumo de carnes na última década foi impulsionado, principalmente, pelo setor avícola, que representou dois terços de toda a carne consumida ao redor do mundo, com o consumo médio de 43,25 kg/hab (ABPA, 2015). A produção brasileira de carne de frango em 2016 foi de, aproximadamente, 13 milhões de toneladas, tornando o país o segundo maior produtor do mundo. Ademais, o Brasil ocupa a posição de maior exportador mundial, sendo os cortes de frango (54%) os principais produtos comercializados (ABPA, 2017). Portanto, é de extrema relevância a utilização de boas práticas de manejo e armazenamento, a fim de se evitar a contaminação e a proliferação de micro-organismos patogênicos, os quais podem desencadear uma infecção.

Salmonella spp. é um dos patógenos mais envolvidos na contaminação de carnes de aves e em surtos de doenças de origem alimentar, uma vez que a sua presença em carcaças de frango e produtos derivados representam um grande impacto no setor avícola e para os consumidores.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Características gerais de *Salmonella* spp.

As bactérias do gênero *Salmonella* são bacilos Gram negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, alguns sorovares produzem ácido sulfídrico a partir da redução do enxofre, pela ação da enzima cisteína desulfidrase, além de serem capazes de utilizar o citrato como única fonte carbono e produzir gás pela fermentação da glicose (exceto *Salmonella* Typhi). Essas bactérias são ubiqüitárias, ou seja, estão amplamente distribuídas na natureza e, em sua grande maioria, são móveis e apresentam flagelos peritríquios, com exceção dos biovars *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* (Trabulsi & Alterthum, 2015).

A temperatura ótima de crescimento varia de 35 a 43°C, com a máxima de 49,5°C. Portanto, é de extrema importância manter os alimentos quentes acima dessa temperatura, sendo 63°C a temperatura recomendada pelas principais agências reguladoras. Pode-se inibir o crescimento de *Salmonella* pela refrigeração, mantendo o alimento em temperaturas abaixo de 5°C, porém ressalta-se que esse processo não promove a eliminação do patógeno (ICMSF, 1996).

Há diversos fatores intrínsecos relacionados aos alimentos que influenciam o crescimento de *Salmonella*. A atividade de água (aw) ideal para o desenvolvimento de *Salmonella* é de 0,99, sendo seu valor mínimo igual a 0,94. Sua sobrevivência em alimentos com baixa aw pode chegar a mais de um ano em alimentos como chocolate, pimenta e gelatina. Em relação ao pH, o valor ótimo para o crescimento está entre 7 e 7,5, com valor mínimo de 3,8 e máximo de 9,5 (ICMSF, 1996).

Salmonella spp. pertence à família Enterobacteriaceae e são classificadas pela identificação de antígenos, segundo o Esquema de Kauffman e White, criado em 1930. Essa classificação ainda é amplamente empregada nos dias atuais, com divisão em sorogrupos e sorovares, segundo a presença dos antígenos O (somático), H (flagelar) e Vi (capsular) (De Jong et al., 2012; Kurtz et al., 2017).

De acordo com a classificação de Guibourdenche et al. (2010), o gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies, *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, sendo esta última agrupada em seis subespécies: *S. enterica* subespécie *enterica*, *S. enterica* subespécie *salamae*, *S. enterica* subespécie *arizonae*, *S. enterica* subespécie *diarizonae*, *S. enterica* subespécie *houtenae* e *S. enterica* subespécie *indica*. Algumas subespécies apresentam sorovares específicos, nomeado segundo o local geográfico do seu primeiro isolamento, como os pertencentes à *S. enterica* subsp. *enterica* ou quanto aos seus antígenos, como em outras

subespécies e na espécie *S. bongori*. A nomenclatura dos sorovares é escrita em letras romanas normais (sem itálico), sendo a primeira letra em maiúsculo. Segundo esta categorização, são reconhecidos 2.659 sorovares de *Salmonella*, sendo *S. enterica* subespécie *enterica* considerada a mais importante, uma vez que mais de 99% dos sorovares isolados em humanos e animais pertencem a ela (Issenhuth-Jeanjean et al., 2014; Hassan et al., 2016).

Dentre os sorovares de *S. enterica* subs. *enterica*, *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* são comumente reconhecidos como os principais responsáveis por infecções em humanos, embora, do ponto de vista epidemiológico, os casos de salmoneloses possam ser provocados por outros sorovares (Fardsanei et al., 2017; Reyes et al., 2017; Trimoulinard et al., 2017). *S. Typhi* e *S. Paratyphi* são outros sorovares específicos dos seres humanos, os quais são os agentes causadores da febre tifoide e da febre entérica, respectivamente. A primeira promove uma infecção sistêmica caracterizada por febre alta, dor de cabeça, dor abdominal, náuseas e anorexia. Já a segunda, apresenta sinais clínicos mais brandos que podem evoluir para septicemia (De Jong et al., 2012; LaRock et al., 2015). Outro sorovar importante é *S. Gallinarum*, dividido em biovar *Gallinarum* e biovar *Pullorum*. Ambos são exclusivos de espécies aviárias, porém apresentam patogenicidade e epidemiologia diferentes. O biovar *Gallinarum*, conhecido como tifo aviário, muito comum em aves adultas, promove uma doença sistêmica, enquanto o biovar *Pullorum* causa um nível elevado de mortalidade em aves recém-nascida (Barrow e Freitas Neto, 2011; Batista et al., 2015).

2.2. Salmonelose

As doenças de origem alimentar (DOA) representam grande preocupação à saúde mundial, sendo consideradas doenças gastrintestinais resultantes do consumo de alimentos contaminados por agentes microbianos ou por suas toxinas. Além das diversas complicações à saúde, afetam diretamente toda a cadeia de produção, desde o produtor, estabelecimentos de vendas e indústrias, o que implica em uma perda massiva da produtividade e um subsequente declínio econômico (Bugarel et al., 2017; Hassan et al., 2017; Rahman e Othman, 2017).

Dentre as DOAs, a salmonelose é a mais frequente, com mais de 93 milhões de casos anualmente, em todo o mundo (Majowicz et al., 2010). *Salmonella* spp. pode ocasionar desde uma infecção gastrintestinal branda até septicemia ou morte, dependendo do estado imunológico do hospedeiro, do sorovar envolvido, da concentração do inóculo e dos genes de virulência expressos pelo agente (CDC, 2007; Verbrugge, 2016). A salmonelose apresenta alguns sintomas bem característicos, como náuseas, vômito, febre, calafrios, dor abdominal, desidratação, dores de cabeça, acompanhada de diarreia. O período de incubação varia com a

intensidade da doença, entre cinco e 72 horas, frequentemente ocorrendo após 12 horas. Após o aparecimento dos primeiros sintomas, inicia-se o processo de recuperação dentro de um a sete dias (Salem et al., 2017; Rahman et al., 2017). A dose mínima infectante para os humanos varia de 10^5 a 10^8 células, porém levando em consideração pacientes imunossuprimidos, observou-se doses menores que 10^3 , dependendo do sorovar envolvido (Kothary e Babu, 2001; BRASIL, 2011; Cosby et al., 2015).

O aumento da população e a urbanização de muitas cidades, além de mudanças nas tendências de consumo (dieta com mais proteínas), acarretou na expansão de consumo de produtos de origem animal. Os animais de produção, como frangos, suínos e bovinos, são considerados os principais reservatórios de patógenos veiculados por alimentos. A alta demanda de tais produtos promove a produção intensiva de animais e processamento inadequado das carcaças, aumentando o risco de contaminação por patógenos em qualquer etapa da cadeia produtiva (Trimoulinard et al., 2017; Henley et al., 2018; Heredia e García, 2018).

As aves são a principal via de disseminação de *Salmonella* spp., visto que os frangos de corte estão comumente contaminados por esse patógeno e não apresentam sintomatologia clínica. Sua presença no trato intestinal, na superfície da pele e entre as penas das aves pode causar a contaminação da carcaça durante o abate e o processamento (Duarte et al., 2009; Park et al., 2017). Outra questão importante é a contaminação cruzada da carne de frango com fezes, água, instrumentos e manipulação dos trabalhadores, em todo o processo de evisceração e especialmente em ambientes de varejo pouco higienizados (Saeed et al., 2013; Hassan et al., 2016; Henley et al., 2018; Rahman et al., 2018).

Salmonella enterica é frequentemente isolada de frangos de corte e alguns sorovares estão amplamente associados a surtos de origem alimentar dentro do cenário global, em especial, *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis* (Mohammed, 2017; Rahman et al., 2017; Egualé, 2018). Diversos relatos mostraram que *S. Typhimurium* é prevalentemente isolada de aves de corte, enquanto *S. Enteritidis* encontra-se com maior frequência em aves de postura, contaminando os ovos (Foley et al., 2008; Boore et al., 2015; Wajid et al., 2018). Deve ser ressaltado que nos últimos anos, devido à implementação de medidas de controle e vacinação (Foley et al., 2011; Campos et al., 2017) outros sorovares multirresistentes tem sido encontrados mais frequentemente como *S. Heidelberg*, *S. Kentucky*, *S. Montevideo*, *S. Infantis*, *S. Schwarzengrund*, *S. Hadar*, *S. Mbandaka*, *S. Thompson* e *S. Senftenberg* (Antunes et al., 2016; Paul et al., 2017).

De acordo com levantamentos realizados no Brasil, a contaminação por esse patógeno em aves e produtos derivados variaram de 13 a 87% (Cardoso et al., 2015), ressaltando-se que

não é exigida a ausência de *Salmonella* em 25 gramas desse tipo de alimento, pela RCD N°12 (BRASIL, 2001). Aparentemente, essa porcentagem vem aumentando com o passar dos anos, pois Silva e colaboradores (2004) observaram contaminação de carcaças entre 30 a 50%. Portanto, tendo em vista essa realidade preocupante, as propriedades avícolas e os estabelecimentos de venda estão tentando adotar melhores medidas de controle e manejo, a fim de evitar futuros transtornos (Eguale, 2018; Heredia et al., 2018).

2.3. Fatores de virulência de *Salmonella* spp.

Salmonella spp. é um dos principais patógenos causadores de infecções de origem alimentar pela presença de diversos fatores de virulência, os quais auxiliam o patógeno a aderir e invadir as células dos hospedeiros, desencadeando todo o processo infeccioso (Campioni et al., 2012; Fardsanei et al., 2017). A patogenicidade das salmonelas é extremamente complexa e multifatorial, abrangendo fímbrias, flagelos, proteínas efetoras, lipopolissacarídeos (LPS), antígenos de superfície, produção de endotoxinas, entre outros (De Jong et al., 2012; Fardsanei et al., 2018).

A maioria desses fatores estão localizados em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, *transposons* e bacteriófagos ou podem estar presentes em regiões específicas do cromossomo bacteriano, conhecidas como Ilhas de Patogenicidade de *Salmonella* (SPI). Essas SPIs são grandes clusters genéticos (10 a mais de 100 kb) que carregam um ou mais genes de virulência. Tal fato sustenta a ideia da aquisição dessas SPIs através da transferência horizontal de genes, o que acarreta no aumento da patogenicidade de *Salmonella* spp. ao longo da evolução (Fluit et al., 2005; Bessa et al., 2006; Nieto et al., 2016; Fardsanei et al., 2017).

Até o presente momento, foram descritas 17 SPIs, algumas conservadas no gênero e outras, específicas de determinados sorovares. As SPI-1 e SPI-2 são as mais comumente estudadas, pois todo o processo de invasão de *Salmonella* spp. ocorre especificamente nessas ilhas, além de ambas codificarem o Sistema de Secreção Tipo III (T3SS), que atua no sistema flagelar e funciona como um canal na membrana da célula hospedeira, translocando proteínas efetoras secretadas no citoplasma bacteriano para o interior destas, conforme a Figura 1 (Coburn et al., 2007; Haraga et al., 2008; Ilyas et al., 2018). Uma vez no interior da célula, essas proteínas promovem uma série de reações, por fosforilações ou transferências de resíduos, levando à modificações do citoesqueleto e da membrana celular, bem como à desconexão das junções das células epiteliais do hospedeiro, permitindo a invasão e proliferação de *Salmonella* spp. (Kurtz et al. 2017; Herrero-Fresno et al., 2018; Ridge et al., 2018).

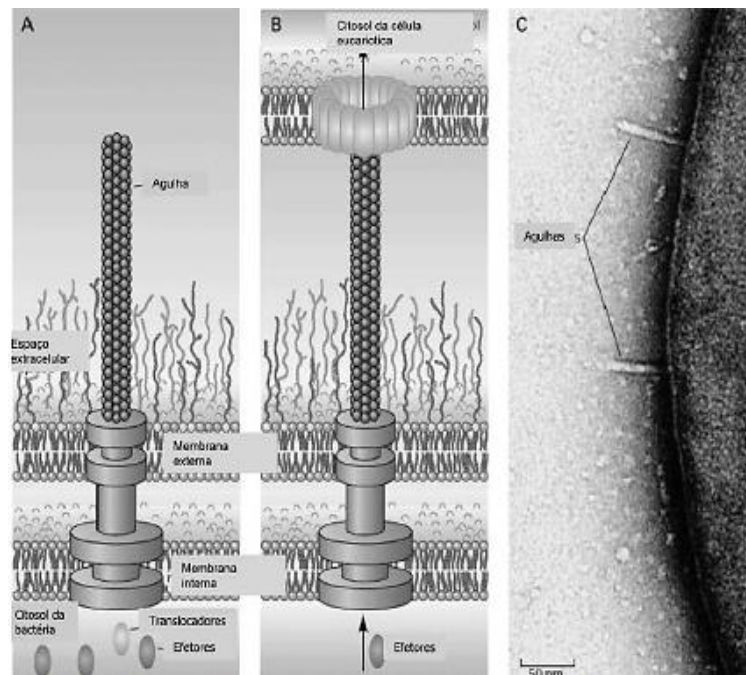


Figura 1. Esquema do sistema de secreção tipo III (T3SS). (A) T3SS apresenta dois anéis que atravessam a membrana e o canal (agulha) surgindo da superfície da bactéria. (B) Proteínas translocadoras formam um poro na membrana da célula alvo e as efetoras são transportadas para o citosol da célula alvo. (C) Microscopia eletrônica da superfície da bactéria com os canais (agulhas) do T3SS (TROISFONTAINES & CORNELIS, 2005).

A SPI-1 é a ilha melhor caracterizada e trata-se de um segmento de 35-40 kb que contém ao menos 31 genes especializados em duas principais funções: codificar produtos para T3SS e proteínas efetoras junto, com suas chaperonas. Tais genes são específicos para o processo de invasão celular, propriedade importante de *Salmonella enterica* (Dos Santos et al., 2018). Contudo, alguns genes aí localizados possuem funções adicionais relacionadas à ativação de vias imunes inatas, bem como na codificação de um sistema de captura de ferro, como o gene *sitC* (Coburn et al., 2007; Fortes et al., 2012). O operon *inv* é composto por sete genes *invABCDEFG*, porém o *invA* parece desempenhar função mais importante na invasão das células epiteliais (Turki et al., 2012). As bactérias fenotipicamente identificadas como *Salmonella* spp., mas que não possuem esse gene, não são consideradas como tal, pois o mesmo parece ser conservado em todos os sorovares de *Salmonella* spp., sendo utilizado como gene-alvo pelo método de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), para confirmação desse gênero (Whang et al., 2009; Moura et al., 2014). Há um subgrupo composto por uma série de proteínas efetoras, também codificadas pelo SPI-1, que modificam vias de transdução de sinais, resultando na reorganização do citoesqueleto de actina na célula do hospedeiro. Essas proteínas, SptP, SopE e SopE2, intervêm na função da família de proteínas celulares GTPases do hospedeiro (Cdc42, Rac-1 e Rho), as quais regulam a formação de filamentos de actina e controlam a dinâmica do citoesqueleto. Ademais, as proteínas Rho GTPases são capazes de ativar o fator nuclear kappa β (NF- κ B) e promover a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1b e IL-23 (LaRock et al., 2015; Ilyas et al., 2017).

Outras proteínas efetoras desse grupo, SopA, SopB e SopD, estão relacionadas aos sintomas de diarreias. A proteína SopB é uma fosfatase de inositolfosfato que promove a perda de eletrólitos e a secreção de fluídos das células epiteliais para o lúmen intestinal, exercendo também a função de estimular respostas inflamatórias, como a SopE (Hu et al., 2017; Ilyas et al., 2017; Zhang et al., 2018). Nesse mesmo cenário, assim como essas proteínas efetoras, a SipA e SipC também colaboram no processo inflamatório ao desestabilizarem as junções de oclusão e estimular a migração transepitelial de neutrófilos para o lúmen intestinal (LaRock et al., 2015).

A proteína SipA, pertencente ao grupo SipABCD, é uma das principais proteínas responsáveis pela indução do rearranjo do citoesqueleto das células epiteliais, através de modificações na actina, o que facilita a entrada de bactérias na célula hospedeira. Da mesma forma, o SipC promove essa reorganização e, juntamente com SipB, participa na translocação de moléculas efetoras do T3SS da SPI-1 (T3SS-1) para o hospedeiro. O papel de SipB ainda não está totalmente elucidado, mas já foi descrito sua capacidade em induzir a apoptose de macrófagos a partir da ativação de caspases-1. Além disso, SipA e SipC promovem a ativação de uma cascata de transdução de sinal que leva à migração de leucócitos polimorfonucleares (Schmidt & Hensel, 2004; Campioni et al., 2012; Dos Santos et al., 2018).

A SPI-2 está relacionada à capacidade de *Salmonella* em sobreviver no interior de células fagocíticas e se replicar dentro de compartimentos conhecido como “vacúolos contendo *Salmonella*” (SCV), que permitem a proliferação da bactéria no interior das células eucarióticas infectadas (Hur et al., 2011; Nieto et al., 2016; Kurtz et al., 2017). Essa ilha está presente apenas na espécie *S. enterica*, ao contrário da SPI-1 que ocorre em ambas as espécies, *S. enterica* e *S. bongori* (Hansen-Wester e Hensel, 2001; Fortes et al., 2012). A SPI-2 é dividida em dois segmentos, uma porção maior de 25,3 kb e outra, de 14,5 kb (Fortes et al., 2012; Dos Santos et al., 2018). O operon *ssa* sintetiza as proteínas que integram o T3SS na SPI-2 (T3SS-2) (Fortes et al., 2012), região onde está localizado um dos principais genes, o *ssaR* que juntamente com o *sifA*, são responsáveis pela replicação bacteriana intracelular e disseminação sistêmica em humanos, permitindo a sua sobrevivência dentro da célula (Hur et al., 2011). Além disso, a proteína efetora codificada pelo gene *sifA* (SifA) mantém a integridade da membrana fagocítica do SCV durante a proliferação intracelular (Almeida et al., 2013; Dos Santos et al., 2018).

Existem poucas informações sobre as demais SPIs. A SPI-3 apresenta seis unidades de transcrição e as proteínas codificadas por seus genes desempenham papéis bem distintos. Por exemplo, a codificação de proteínas que auxiliam na sobrevivência do patógeno dentro de macrófagos, através do transporte de magnésio (Mg^{2+}). Por outro lado, há proteínas efetoras que contribuem na colonização intestinal, sendo necessárias para persistência bacteriana no

intestino durante uma infecção. A SPI-4 carrega um único operon, responsável praticamente pelas mesmas funções que a SPI-3, diferindo apenas na codificação de adesinas não fimbriais, importantes no processo de adesão do epitélio intestinal (Fortes et al., 2012; Dos Santos et al., 2018). A SPI-5 atua em diferentes etapas no processo de infecção por *Salmonella* e estão diretamente ligados à sua enteropatogenicidade, embora não participem do processo de invasão sistêmica. Tal ilha codifica proteínas efetoras como a SopB, para o T3SS, secretado pelas SPI-1 e 2, além de mediar a inflamação e secreção de cloro.

Já a SPI-7 é um *locus* específico para os sorovares *S. Typhi*, *S. Dublin* e *S. Paratyphi*, que codifica um importante fator de virulência, o antígeno Vi e também é onde se encontra o fago *sopE*, encarregado de codificar a proteína efectora SopE do T3SS-1 (Schmidt e Hensel, 2004; Ilyas et al., 2017; Dos Santos et al., 2018). As demais SPIs são responsáveis pela codificação de fímbrias, produção de toxinas, resistência à bacteriocinas e sobrevivência bacteriana no interior de macrófagos, fatores que auxiliam na infecção sistêmica (Ilyas et al., 2017).

Há outros genes de virulência presentes em outras regiões do genoma bacteriano, como os genes *flgL*, *flgK* e *fljB* que estão associados a síntese de flagelo (Almeida et al., 2013). Já os genes *sitC* e *iroN* estão envolvidos na obtenção de ferro e o *tolC*, no reconhecimento e invasão da célula hospedeira (Mezal et al., 2013). Os genes em regiões plasmidiais geralmente estão relacionados com a sobrevivência e crescimento das bactérias, habilitando-as a persistir nas células. O operon *spv* está associado à severidade das enterites e persistência em sítios extra-intestinais. A proteína SpvB, codificada pelo gene *spvB*, é capaz de aumentar a taxa de crescimento e sobrevivência dentro da célula do hospedeiro, bem como afetar o sistema imune ao promover a apoptose de macrófagos (Hur et al., 2011; Almeida et al., 2013; Dos Santos et al., 2018).

O biofilme é outro fator de virulência de extrema importância que permite a proliferação e persistência da bactéria no ambiente. A maioria das bactérias podem se apresentar como células planctônicas, importantes para proliferação e propagação do micro-organismo em novos locais ou se tornarem sésseis, quando imobilizadas em biofilmes, que promovem a persistência das bactérias no ambiente (García-Gonzalo e Pagán, 2015; Almeida et al., 2017; Merino et al., 2018; Lamas et al., 2018a).

Salmonella possui a capacidade de aderir à várias superfícies, bióticas ou não (Steenackers et al., 2012; Yin et al., 2018). A adesão em superfícies abióticas é muito comum, como no caso de equipamentos de processamento de alimentos, tubulações industriais, de água e ventilação, dispositivos médicos, bem como locais de armazenamento de produtos alimentícios. Já em relação às superfícies bióticas, *Salmonella* pode se aderir a tecidos vivos,

especificamente, às células epiteliais intestinais (Steenackers et al., 2012; Zhao et al., 2017). A formação de biofilme pode ser influenciada por diversos fatores ambientais como a temperatura, pH, dessecação, concentração de nutrientes (ferro, cálcio, oxigênio e manganês) e osmolaridade, uma vez que são elementos bem dinâmicos e que variam bastante no ambiente (Chuah et al., 2017; Lamas et al., 2018a; Yin et al., 2018).

O biofilme é uma estrutura complexa formada por um aglomerado de células bacterianas organizadas em comunidades, as quais se aderem umas às outras e a um substrato, sendo embebidas por uma matriz constituída por substâncias poliméricas extracelulares (EPS), compostas por uma ampla variedade de moléculas orgânicas, como polissacarídeos, proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos, entre outras. Acredita-se que essas EPS preservam a arquitetura e as funções do biofilme, mantendo as bactérias juntas e, conseqüentemente, protegendo-as de condições adversas do ambiente (García-Gonzalo e Pagán, 2015; Gonzale-Machado et al., 2018).

Há diversas teorias a respeito da formação do biofilme e a mais aceita atualmente é caracterizada por um processo dividido em cinco principais etapas. Inicialmente, ocorre a adesão bacteriana a um substrato, seguido da formação de micro-colônias e produção de substâncias formadoras da matriz, o que promove o desenvolvimento da arquitetura do biofilme e, conseqüentemente, sua maturação (Figura 2). Após se estabilizar, o biofilme inicia a fase de dispersão, em que algumas células bacterianas se desprendem das camadas mais externas, com o propósito de se aderirem ao ambiente circundante, permitindo a proliferação e persistência da bactéria ao longo da superfície (Cue et al., 2012; Joo e Otto, 2012; Zhao et al., 2017).

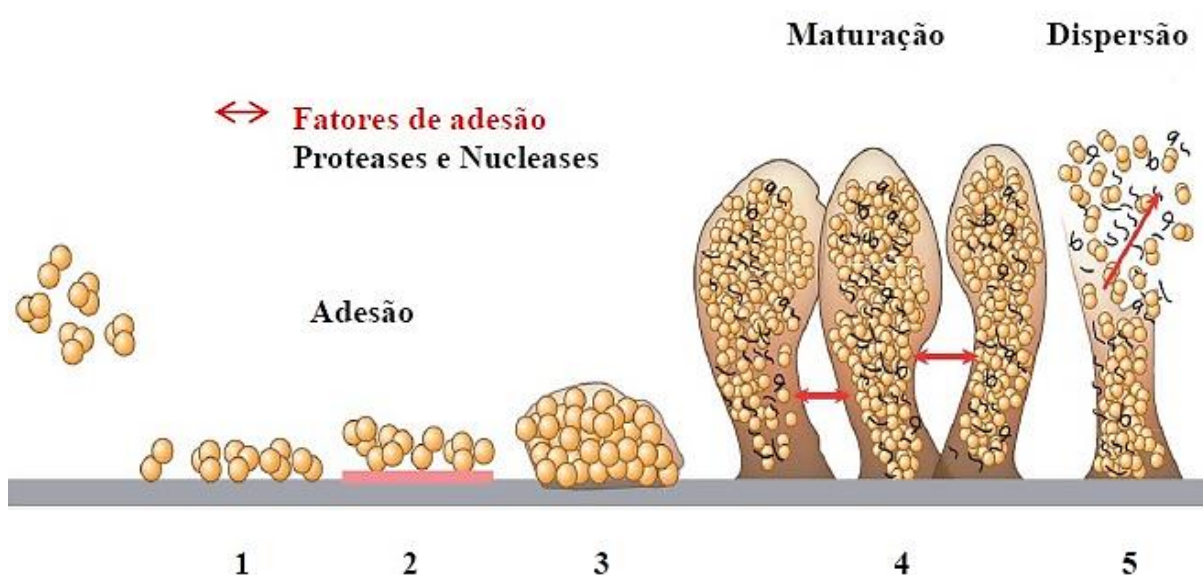


Figura 2. Processo sequencial da formação de biofilme. 1. Adesão inicial; 2. Formação de micro-colônias; 3. Produção de EPS; 4. Maturação; 5. Dispersão de células planctônicas (Zhao et al., 2017).

A capacidade de *Salmonella* spp. em sobreviver em ambientes desfavoráveis está intimamente relacionada com alguns componentes importantes da matriz extracelular do biofilme, as fímbrias agregativas, a celulose e os flagelos (Steenackers et al., 2012; Lamas et al., 2018a; Lamas et al., 2018b; Merino et al., 2018). As fímbrias desempenham um papel importante no processo inicial do biofilme, em que *Salmonella* spp. adere irreversivelmente à superfície alvo (Collighan e Woodward, 2001). Já a celulose e o flagelo possuem um papel mais estrutural, que facilita o processo de adesão ou confere proteção química e mecânica ao meio em que está inserido (Solano et al., 2002).

A formação de biofilme em *Salmonella* spp. é complexa, com genes envolvidos na fixação bacteriana, motilidade, detecção e resposta à disponibilidade de nutrientes, regulações gênicas e resposta ao estresse (Hamilton et al., 2009; Lamas et al., 2018a). O gene *csgD* é um grande regulador do biofilme, responsável pela produção de fímbrias e regulação da síntese de componentes da matriz extracelular, especificamente de celulose. A síntese de celulose é modulada pelo gene *adrA*, que por sua vez, estimula a produção de uma proteína que afeta positivamente a atividade enzimática na biossíntese de celulose (Zogaj et al., 2000; Wang et al., 2015; Lamas et al., 2018b).

2.4. Resistência a antimicrobianos

A manifestação de infecções de origem alimentar por *Salmonella*, na maioria dos casos é auto-limitada e não há necessidade de antibioticoterapia. Entretanto, em pacientes com alguma imunodeficiência, as infecções podem progredir para bacteremia, meningite e endocardite, etc., sendo necessário o uso de antimicrobianos (Fardsanei et al., 2016). Para o tratamento de infecções causadas por *Salmonella* spp., os antimicrobianos comumente utilizados são fluoroquinolonas, quinolonas, cefalosporinas, ampicilina, cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol, entre outros (Gupta et al., 2003; Bae et al., 2015; Antunes et al., 2016).

Atualmente, os isolados de *Salmonella* spp. apresentam resistência a diversos antibióticos, o que causa grande preocupação, pois esses medicamentos são cruciais para o sucesso do tratamento de infecções invasivas em humanos e em animais de produção. Essa resistência está associada, principalmente, com as classes mais antigas de antibióticos, como cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol e alguns β -lactâmicos (ampicilina e cefalosporinas de 1ª geração) (Hur et al., 2012; Antunes et al., 2016). Entretanto, a resistência bacteriana vem aumentando ao longo dos anos, incluindo novas classes de antimicrobianos, como as fluoroquinolonas e quinolonas, cefalosporinas de 3ª e 4ª geração (El-Tayeb et al., 2017; Qiao

et al., 2017). Esta adversidade pode estar vinculada à transferência horizontal de genes entre as bactérias (Bae et al., 2015; Barilli et al., 2018).

Em *S. enterica*, a resistência antimicrobiana é atribuída a vários mecanismos, como o bloqueio da capacidade de adesão do antibiótico à célula bacteriana, ativação de bombas de efluxo de antimicrobianos, devido às alterações na permeabilidade da membrana ou parede celular, além da degradação enzimática e alteração de sítios de ligação dos antibióticos na bactéria (Rossi e Andreazzi, 2005; El-Tayeb et al., 2017).

Além da prescrição rotineira de antibióticos para o tratamento de infecções humanas, no setor de produção animal, há também o uso recorrente desses agentes. O uso inadequado de antimicrobianos pode selecionar bactérias resistentes, uma vez que são administrados de maneira incorreta durante o tratamento de infecções ou como promotores de crescimento, prática ainda em uso em alguns países, como Canadá, China, Austrália, Ucrânia e Brasil (Mir et al., 2015; Antunes et al., 2016; El-Tayeb et al., 2017; Hamid et al., 2019). As aves, em especial frangos de corte, podem abrigar linhagens resistentes, sendo um veículo de disseminação desses patógenos para os seres humanos. Desta forma, a implementação de medidas adequadas de controle quanto ao consumo de antimicrobianos, encontra-se em grande destaque (Abakpa et al., 2015).

2.4.1. β -lactâmicos

Os fármacos antibacterianos β -lactâmicos são prescritos em larga escala em todo o mundo e com base na sua estrutura química, composta por um anel β -lactâmico, são classificados em seis grupos principais: penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, carbapenêmicos, monobactâmicos e inibidores de β -lactamases, como o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. A resistência a essa classe de antibióticos se deve à produção de enzimas β -lactamases, que hidrolisam e inativam a ação do anel β -lactâmico (Cizman et al., 2003; Finch et al., 2012). Até o momento, mais de 500 β -lactamases já foram descritas e uma ampla variedade delas são encontradas entre os sorovares de *Salmonella* (Hasman et al., 2005; Rahman et al., 2018). A classificação das β -lactamases mais aceita é de Bush e Jacoby (2010), que dividiram essas enzimas em três grupos: grupo 1 (classe C): cefalosporinases; grupo 2 (classes A e D): serina- β -lactamases (amplo espectro e resistentes ao inibidor) e grupo 3 (classe B): metalo- β -lactamases.

2.4.1.1. β -lactamases de espectro estendido (ESBL)

Bactérias conhecidas como produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) apresentam amplo espectro de resistência aos β -lactâmicos, sendo capazes de hidrolisar oximino-cefalosporina (cefalosporinas de 3^a e 4^a geração) e monobactams (Rahman et al. 2018). Algumas salmonelas possuem esse perfil de resistência, pois sobrevivem à ação de cefalosporinas e até mesmo de carbapenêmicos (Qiao et al., 2018; Tippelskirch et al., 2018).

No setor avícola, as bactérias produtoras de ESBL apresentam-se em destaque, visto que aves de corte são consideradas um importante reservatório desse grupo. A presença de bactérias produtoras de ESBL aparece em diferentes níveis na pirâmide de produção de aves de corte, como na superfície das carcaças e em ambientes de varejo, facilitando a transferência desse grupo para os humanos, ao longo da cadeia alimentar (Casella et al., 2017; Schill et al., 2017).

As bactérias produtoras de ESBL além de carregarem um grande número de genes de virulência, codificam genes importantes relacionados a sua alta capacidade de resistir aos β -lactâmicos, como *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} (Ali et al., 2017; Barilli et al., 2018). Tais genes, são plasmidiais, podendo ser transferidos horizontalmente por conjugação, transformação, transposição ou transdução, dependendo das condições do meio circundante (Ali et al., 2017; Sanchez-Maldonado et al., 2017; Tippelskirch et al., 2018). As enzimas frequentemente codificadas por esses genes pertencem às grandes famílias de proteínas, como CTX-M, TEM e SHV, já bastante disseminadas em diversos nichos epidemiológicos (Rahman et al., 2018).

Estudos filogenéticos definiram as enzimas CTX-M em cinco grandes grupos, baseando-se na identidade da sequência de aminoácidos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25 e conferem níveis mais elevados de resistência à cefotaxima do que à ceftazidima (Bonnet et al., 2004). Foram frequentemente relatadas em bastonetes Gram-negativos e até agora foram encontradas 172 variantes de CTX-M (Rahman et al., 2018). Apesar da CTX-M-14 e CTX-M-15 serem as variantes mais detectadas dentre os principais micro-organismos (Levy, 2002) vários relatos identificaram CTX-M-1 em cortes de frango (Clemente et al., 2013; Casella et al., 2017). A enzima TEM causa a resistência contra ampicilina em 90% dos casos e atualmente possui 223 variantes (Rahman et al., 2018). Os tipos de enzimas SHV são mais comuns em espécies de *Klebsiella* sp e já foram descritas 193 variantes (Zhao e Hu, 2013; Rahman et al., 2018).

2.4.1.2. β -lactamases tipo AmpC

A enzima AmpC compõe um grupo de cefalosporinases capazes de hidrolisar cefalosporinas e cefamicinas, mas ao contrário das ESBLs, não sofrem qualquer interferência dos inibidores de β -lactamases, como ácido clavulânico e nem de carbapenemases (Peterson, 2006; Powers, 2016; Santiago et al., 2016). Essa enzima é geralmente codificada em cromossomos de várias enterobactérias, mas também podem ser encontradas em plasmídeos, como no caso de *Salmonella*. As AmpCs são classificadas em seis clusters baseados em sua resistência aos β -lactâmicos: CMY, FOX, MOX e LAT. A proteína CMY apresenta afinidade às cefamicinas e algumas cefalosporinas e possui seis variantes, a CMY-1, CMY-8, CMY-9, CMY-10, CMY-11 e CMY-19, que são expressas de forma constitutiva, ou seja, são codificadas independentemente da presença do antibiótico (Jacoby, 2009; Santiago et al., 2016). Em linhagens de *Salmonella* não tifoide e na grande maioria das enterobactérias, a enzima CMY-2 tem ampla distribuição, com impacto considerável frente à resistência aos β -lactâmicos (Miriagou et al., 2004; Santiago et al., 2016).

2.4.1.3. Carbapenemases

Os carbapenêmicos também pertencem à classe dos β -lactâmicos e a resistência bacteriana ocorre pela produção de enzimas carbapenemases, β -lactamases e pela perda de porinas específicas da membrana externa da bactéria, modificando sua permeabilidade. As carbapenemases são divididas nas classes A, B e D, que hidrolisam o anel β -lactâmico de diferentes formas (Nordmann e Poirel, 2014) e, como as AmpCs, também não são influenciadas pelos antibióticos inibidores de β -lactamases (Fernández e Rodicio, 2018).

Geralmente, as carbapenemases estão associadas às bactérias comumente causadoras de infecções hospitalares, entretanto o número de relatos de bactérias produtoras destas enzimas, isoladas de animais de produção, aumentou nos últimos anos. Além de suínos e bovinos, as aves também podem ser consideradas reservatórios dessas linhagens bacterianas, principalmente em frangos de corte. A primeira *S. enterica* produtora de carbapenemases foi reportada em 1998 nos Estados Unidos e a partir desse episódio, outros sorovares foram encontrados em escala global, ao longo do tempo, apesar da resistência aos carbapenêmicos não ser comum em *Salmonella* não tifoide (Madec et al., 2017; Dolejska e Papagiannitsis, 2018; Fernández e Rodicio, 2018; Roschanski et al., 2018).

Entre os mecanismos de resistência mais prevalentes está a produção de carbapenemase, relatada inicialmente em *K. pneumoniae* (KPC). As KPCs são β -lactamases inseridas na classe A serina- β -lactamase, codificada pelo gene *bla_{KPC}* e hidrolisa uma ampla variedade de antimicrobianos β -lactâmicos, como carbapenêmicos, cefalosporinas, cefamicinas e penicilinas (Munoz-Price et al., 2013; Fernández e Rodicio, 2018). Os genes que codificam a KPC, já foram encontrados em *Salmonella* spp. isoladas de frangos (Dolejska e Papagiannitsis, 2018).

2.4.2. Colistina

As polimixinas são antibióticos polipeptídicos que compreendem cinco compostos quimicamente diferentes, os quais são divididos em cinco polimixinas (A-E). A polimixina B foi a primeira a ser descoberta, produzida originalmente por *Paenibacillus polymyxa* (Sun et al., 2018a). A colistina (polimixina E) possui atividade detergente e a interação entre o polipeptídeo catiônico do antibiótico e os lipopolissacarídeos (LPS) da membrana externa da bactéria promove modificações que afetam a integridade da membrana e, conseqüentemente, o aumento de sua permeabilidade (Rossi e Andreazzi, 2005; Sun et al., 2009). A colistina é utilizada como agente antimicrobiano de última escolha para o tratamento de infecções em humanos e animais de produção, causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes, uma vez que ainda é incomum a resistência bacteriana a esta droga (Kempf et al., 2013; Quesada et al., 2018).

Recentemente, a descoberta de bactérias resistentes à colistina levantou preocupações a nível global, mas essa resistência estaria ligada a mutações cromossômicas dentro da família Enterobacteriaceae (Poirel et al., 2017; Lescat et al., 2018). Entretanto, um novo mecanismo de resistência mediado por um plasmídeo, denominado MCR-1, foi reportado em *E. coli* e *K. pneumoniae*, isoladas de suínos na China (Liu et al., 2016). Desde então, o gene *mcr-1* foi observado em *Enterobacter*, *Salmonella* e *Shigella*, a partir de reservatórios humanos, ambiental e animal. A proteína MCR-1, codificada pelo gene *mcr-1*, é uma fosfoetanolamina transferase que adiciona um grupo fosfoetanolamina ao lipídeo A, porção do LPS, alterando a carga da membrana externa do micro-organismo e, conseqüentemente, promovendo resistência às polimixinas (Doumith et al., 2016; Lescat et al., 2018). Em paralelo, outras variantes de MCR-1 foram descobertas (MCR-2, 3, 4 e 5) a partir de um único isolado (Xavier et al., 2016; Borowiak et al., 2017; Carattoli et al., 2017; Yin et al., 2017). Identificou-se pela primeira vez MCR-2 isolada de suínos e bovinos, na Bélgica e análises filogenéticas foram realizadas, indicando que essa proteína é uma nova variante de MCR-1, apresentando, aproximadamente, 80% de similaridade (Poirel et al., 2017; Sun et al., 2018a).

2.5. Sanitização

A sanitização de equipamentos para o processamento de produtos de origem animal, bem como dos locais de armazenamento em ambientes de varejo, representa um papel importante no controle de micro-organismos patogênicos. A aplicação de sanitizantes em concentrações efetivas e por tempos adequados, evita a proliferação e persistência bacteriana, pois eliminam ou reduzem o número de micro-organismos sem prejudicar a qualidade e segurança do produto (Rossoni e Gaylarde, 2000; Steininger et al., 2017). Contudo, alguns aspectos devem ser analisados para a aplicação do produto, como o grau de toxicidade, efeito residual sobre os alimentos, poder corrosivo, efeito prejudicial ao meio ambiente, além do uso autorizado pela legislação e os custos (Rossoni e Gaylarde, 2000; Machado et al., 2010).

Os sanitizantes geralmente são eficientes quando testados em micro-organismos presentes em sua forma planctônica. Em contrapartida, em ambientes aonde há formação de biofilme, a resposta bacteriana a esses agentes sanitizantes é diferenciada, pois o biofilme cria uma camada protetora (Puga et al., 2016; Henriques e Fraqueza, 2017). A resistência do biofilme está relacionada a fatores distintos, como a inibição da difusão do agente sanitizante pelas substâncias poliméricas extracelulares e a heterogeneidade fisiológica causada pelos gradientes nutricionais e de oxigênio produzidos dentro do biofilme (Mah e O'Toole, 2011; Iñigues-Moreno, 2018).

A desinfecção dentro das indústrias alimentícias e ambientes de varejo, principalmente nos locais de estocagem de carnes, é realizada por agentes sanitizantes de amplo uso, como o hipoclorito de sódio (NaOCl) e o ácido peracético (PAA) (Waghmare e Annapure, 2015; Visvalingam e Holley, 2018). Ambos são usados rotineiramente, pois apresentam propriedades antimicrobianas universais aptas em reduzir uma quantidade considerável de micro-organismos e desnaturar suas toxinas, garantindo a segurança ao alimento e evitando a contaminação cruzada (Frais, 2001; Singh, 2018; Walsh et al, 2018).

O ácido peracético está comercialmente disponível na forma de uma solução homogênea de ácido acético, peróxido de hidrogênio e água e possui múltiplas vantagens como a não formação de produtos tóxicos ou compostos carcinogênicos ao reagir com proteínas, além de possuir um alto potencial oxidante e promover baixo impacto ambiental (Luukkonen et al., 2015; Henao et al., 2018; Sun et al., 2018b). Suas propriedades antimicrobianas baseiam-se na oxidação da membrana externa da célula bacteriana devido à liberação de oxigênio ativo, que oxida proteínas e enzimas, que quando reagem com outros metabólitos oxidados, levam ao rompimento funcional quimiosmótico da membrana citoplasmática lipoproteica, comprometendo todo o transporte de compostos essenciais entre a bactéria e o meio circundante

(Kitis, 2004; Machado et al., 2010; Eramo et al., 2017). Ademais, o PAA intracelular pode oxidar vias bioquímicas bacterianas vitais, prejudicar o transporte ativo das membranas e inativar a enzima catalase (Kitis, 2004; Yeh et al., 2018).

Os desinfetantes a base de cloro, como o NaOCl, são extensivamente usados nas indústrias de alimentos, em especial nas de processamento de aves e outros serviços do ramo alimentício, devido ao seu baixo custo e por apresentar um amplo espectro bactericida (Sarjit e Dykes., 2015; Yang et al., 2016; Henriques e Fraqueza, 2017; Köhler et al., 2018). Há muitas vantagens no uso de NaOCl, pois possui rápida ação bactericida, baixa toxicidade quando administrado nas concentrações corretas, além da ação desodorizante e branqueadora (Fukuzaki, 2006). Acredita-se que a ação bactericida do NaOCl ocorra pela inibição da atividade de enzimas essenciais, causando danos à membrana e ao DNA e talvez gerando interferências no transporte de membrana, embora não esteja totalmente elucidado. Além disso, sugere-se que o estresse ocasionado pelo NaOCl gere moléculas oxidativas nocivas que danificam os componentes celulares bacteriano e causem alterações funcionais nas células ao reagir com proteínas vitais (Fukuzaki, 2006; Machado et al., 2010; Sarjit e Dykes, 2017).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) coordena, supervisiona e controla as atividades relacionadas à inspeção e controle de riscos, além de estabelecer as normas que garantem a segurança dos alimentos e bebidas no país, visando o controle sanitário e a elaboração de requisitos higiênico-sanitário aos serviços de alimentação. Em 2004, a ANVISA aprovou o Regulamento Técnico de Boas Práticas em Serviços de Alimentação (RDC n°. 216, 15 de setembro de 2004) (BRASIL, 2004), com normas sobre boas práticas na produção de alimentos, considerando a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle e inspeção sanitária em serviços de alimentação.

Em relação à desinfecção de equipamentos e locais de armazenamento de produtos alimentícios, a legislação permite o uso de desinfetantes a base de cloro, como o NaOCl (RDC n°. 14, 28 de fevereiro de 2007) para superfícies que estão em contato com alimentos, obedecendo as respectivas restrições e atualizações (BRASIL, 2007), assim como o uso de PAA como agente de controle de micro-organismos em indústrias alimentícias (Port. n°. 122, 29 de novembro de 1993) (BRASIL, 1993). Somente em 2004 foi permitido o uso de PAA como coadjuvante, para o controle de micro-organismos na lavagem de alguns alimentos (RDC n°. 2, 8 de janeiro de 2004) (BRASIL, 2004). Todavia, ainda existem falhas na legislação, uma vez que a concentração e tempo de exposição aos sanitizantes, permanecem sem padronização. Portanto, é necessário estabelecer estratégias para tal impasse, para a obtenção dos resultados desejados, sem causar qualquer efeito adverso à saúde humana ou ao ambiente.

3. OBJETIVO

O objetivo do estudo foi caracterizar o potencial patogênico de isolados de *Salmonella* spp. a partir de amostras de frango, pela análise molecular do perfil de virulência e de resistência à antimicrobianos e sanitizantes, além da pesquisa de produção de biofilmes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção das amostras

Foram estudadas 42 cepas de *Salmonella* spp isoladas no ano de 2003, a partir de carcaças de frango, que pertenciam à coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia de alimentos, do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) – UNESP/Botucatu-SP.

Além disso, 84 peitos de frango foram analisados, obtidos em açougues e supermercados, da cidade de Botucatu, SP.

4.2. Detecção da presença de *Salmonella* (Andrews et al, 2001)

Todos os meios de culturas utilizados foram da marca Oxoid, exceto quando especificados.

Para o isolamento de *Salmonella*, 25 gramas das amostras de frango foram homogeneizados com 225 ml de água peptonada tamponada, incubada a 35°C por 24 horas. A seguir, uma alíquota de 100 µl foi transferida para 10 ml de caldo Rappaport Vassiliadis e outra alíquota de um ml, para 10 ml do caldo Tetrionato, incubados a 42°C/24 horas e 35°C/24 horas, respectivamente. A seguir, cada caldo foi semeado em placas de Petri contendo o ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD), o ágar *Salmonella-Shigella* (SS) e CHROMagar *Salmonella*. Após incubação de 24 horas a 35°C, as colônias características de *Salmonella* foram isoladas e repicadas em ágar tripticase de soja (TSA) inclinado, sendo consideradas as cepas estoque. Os tubos foram incubados a 35°C por 24 horas e a partir desse crescimento foram realizados testes de triagem, com o ágar tríplice açúcar ferro inclinado (TSI) e ágar fenilalanina inclinado, incubados a 35°C por 18-24 horas. Após os resultados esperados nestes 2 testes, os isolados foram submetidos frente aos soros polivalentes somático e flagelar (Probac do Brasil).

4.3. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

4.3.1. Extração do lisado bacteriano das cepas de *Salmonella*

Cada cepa foi semeada em ágar XLD, incubada a 35°C/24 horas e uma colônia foi transferida para um tubo de polipropileno contendo 200 µL de água Milli-Q estéril, sendo submetida à uma temperatura de ±90°C por 10 min. Após resfriamento em gelo, o tubo foi

centrifugado a 10.000 rpm/1 minuto e o sobrenadante que contém o DNA das amostras foi coletado para as futuras reações de PCR.

4.3.2. Pesquisa dos genes de virulência e confirmação do gênero *Salmonella* spp.

A identificação dos isolados como *Salmonella* sp foi confirmada pela presença do gene *invA*, seguido da pesquisa de outros genes relacionados à virulência, conforme a Tabela 1.

Para as reações de PCR, foram utilizados tubos de microcentrífuga de 0,2 mL em um volume total de 15µL, composto por 7,5µL de GoTaq® Green Master Mix (Promega), 5,5µL de água nuclease-free (Promega), 0,5µL de cada *primer* e 1µL da amostra de DNA. A incubação foi realizada em termociclador Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystem) empregando-se os parâmetros de um ciclo inicial a 94°C durante 1 minuto para desnaturação inicial, seguidos por 35 ciclos a 94°C/1 minuto, com temperaturas de anelamento específicas, relacionadas no Quadro 1, por 30 segundos, 72°C/1 minuto e a temperatura de extensão final foi de 72°C por 7 minutos.

O controle positivo usado foi *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, enquanto no controle negativo, o ácido nucléico foi substituído por água nuclease-free.

Tabela 1. Sequência dos primers e suas temperaturas de anelamento utilizados para a detecção dos genes de virulência, em cepas de *Salmonella* spp., isoladas de carcaça de frangos.

<i>Primer</i>	<i>Sequência</i>	<i>Pb</i>	<i>Temperatura de anelamento</i>	<i>Referência</i>
<i>invA</i>	F: TCATCGCACCGTCAAAGGAAC R: CACGATATTGATATTAGCCCG	284	60°C	Arnold et al., 2004
<i>sopB</i>	F: CGGACCGGCCAGCAACAAAACAAGAAGAAG R: TAGTGATGCCCGTTATGCGTGAGTGTATT	220	66,5°C	Skyberg et al., 2006
<i>sopD</i>	F: ACGACCATT TGCGGCG R: GAGACACGCTTCTTCG	1291	56,5°C	Hur et al., 2011
<i>sipA</i>	F: CCAGGGGTCGTTAGTGTATTGCGTGAGATG R: CGCGTAACAAAGAACCCGTAGTGATGGATT	550	66,5°C	Skyberg et al., 2006
<i>sipB</i>	F: CGCGTAACAAAGAACCCGTAGTGATGGATT R: ACACTCCCGTCGCCGCTTCACAA	875	66,5°C	Skyberg et al., 2006
<i>sipD</i>	F: ATGCTCCTTGCAGGAAGCTTTTG R: TTAATATTCAAAATTATTCCG	1029	53°C	Shah et al., 2011
<i>ssaR</i>	F: GTTCGGATTTCATTGCTTCGG R: TCTCCAGTGACTAACCCTAACCAA	1628	50°C	Hur et al., 2011
<i>sifA</i>	F: TTTGCCGAACGCGCCCCACACG R: GTTGCCTTTTCTTGCCTTTCCACCCATCT	449	66,5°C	Skyberg et al., 2006
<i>spvB</i>	F: CTATCAGCCCCGCACGGAGAGCAGTTTTTA R: GGAGGAGGCGGTGGCGGTGGCATCATA	717	66,5°C	Skyberg et al., 2006
<i>sitC</i>	F: CAGTATATGCTCAACGCGATGTGGGTCTCC R: CGGGGCGAAAATAAAGGCTGTGATGAAC	768	66,5°C	Skyberg et al., 2006
<i>tolC</i>	F: TACCCAGGCGCAAAAAGAGGCTATC R: CCGCGTTATCCAGTTGTTGC	161	66,5/C	Skyberg et al., 2006
<i>iroN</i>	F: ACTGGCACGGCTCGCTGTGCTCTAT R: CGCTTTACCGCCGTTCTGCCACTGC	1205	66,5°C	Skyberg et al., 2006
<i>flgK</i>	F: ATGTCCAGCTTGATTAATCAC R: GCGAATATTCAATAACGCATC	1659	53°C	Shah et al., 2011
<i>flgL</i>	F: ATGCGTATCAGTACCCAGATG R: CCGGTTCAACTGGAAAAGC	951	53°C	Shah et al., 2011
<i>fljB</i>	F: ATGGCACAAGTCATTAATACAAAC R: ACGCAGTAAAGAGAGGAC	1515	53°C	Shah et al., 2011
<i>adrA</i>	F: GGGCGGCGAAAGCCCTTGAT R: GCCCATCAGCGCGATCCACA	92	60°C	Primer Blast
<i>csgD</i>	F: TGC GGACTCGGTGCTGTTGT R: CAGGAACACGTGGTCAGCGG	123	60°C	Primer Blast

Pb: pares de base.

4.3.3. Pesquisa dos genes de resistência aos antimicrobianos

Para confirmação da resistência dos isolados de *Salmonella* spp. às β -lactamases tipo AmpC, carbapenemases e colistina, foi investigada a presença dos genes *bla*_{CMY-2}, *bla*_{KPC} (serina- β -lactamase), além de *mcr-1* e *mcr-2*, respectivamente (Tabela 2).

Os genes referentes a resistência às carbapenemases (*bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}) foram pesquisados através da técnica de PCR Multiplex, utilizando o volume total de 15 μ L, diferindo apenas nas quantidades de cada reagente, sendo 7,5 μ L de GoTaq[®] Green Master Mix (Promega), 4,1 μ L de água nuclease-free (Promega), 0,6 μ L de cada *primer* e 1 μ L da amostra de DNA. A amplificação foi realizada com o mesmo termociclador seguindo os requisitos específicos da corrida dos genes em questão.

Tabela 2. Primers e condições das reações de PCR utilizadas para detecção de genes de resistência aos antimicrobianos, em cepas de *Salmonella* spp., isoladas de frango.

Gene	Sequência (5'-3')	Pb	Temperatura anelamento	Referências
<i>CMY-2</i>	F: ATGATGAAAAAATCGTTATGC R: TTGCAGCTTTTCAAGAATGCGC	1143	58°C	Koeck et al. (1997)
<i>KPC</i>	F: CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG R: CTTGTCATCCTTGTTAGGCG	798	54°C	Poirel et al. (2011)
<i>mcr-1</i>	F: GGTCAGTCCGTTTGTTC R: CTTGGTCGGTCTGTA	309	60°C	Liu et al. (2016)
<i>mcr-2</i>	F: ATGACATCACATCACTCTTGG R: TTACTIONGATAAATGCCGCGC	715	52°C	Liassine et al. (2016)

Pb: pares de bases

4.3.4. Visualização dos genes amplificados

Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão de ácido Bórico-Tris-EDTA (TBE) e revelados com Sybr Safe (Invitrogen). Os produtos foram analisados comparativamente com marcadores de DNA de 100bp e 1kp e fotografados em analisador de imagens (*Alphaimager – Alpha esasy FC Software – AlphaInotech Corporation*).

4.4. Sorotipagem das cepas de *Salmonella*

As cepas de *Salmonella* spp que apresentaram o gene *invA* foram sorotipadas pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL), em São Paulo.

4.5. Produção de biofilme em microplaca de poliestireno

A verificação e quantificação de biofilme em microplaca de poliestireno foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Stepanovic et al. (2003). As cepas de *Salmonella* foram incubadas em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) a 35°C/24 horas. A seguir, a cultura foi diluída, aproximadamente, a 10⁸ UFC/ml (0,5 na escala de MacFarland), utilizando-se BHI + 0,5% de glicose. Alíquotas de 200 µL dessa diluição foram distribuídas, em quadruplicata, em placas de poliestireno de 96 poços e incubadas a 35°C/96 horas. Após essa etapa, os poços foram lavados três vezes com solução tampão (PBS, pH 7,4), para remoção das células não fixadas, a placa foi seca à temperatura ambiente e coradas com cristal violeta a 1%, por 15 minutos. Após três lavagens com água destilada, para a remoção do corante, a placa foi seca a temperatura ambiente e o biofilme formado foi ressuspensionado em 200µL de ácido acético glacial a 33% por 10 minutos. A quantificação foi realizada em um leitor de ELISA (Babsystems, MultiSkan EX), em um comprimento de onda de 570nm.

O BHI não inoculado foi utilizado como branco, para corrigir o valor de absorbância. A partir da média das quatro repetições (DO) e de acordo com a relação entre DO e DOc (controle negativo), os isolados foram classificados em não produtores de biofilme ou produtor fraco, moderado ou forte, de acordo com Stepanovic et al. (2003):

$$\begin{aligned} DO \leq DOc &= \text{não produtor de biofilme} \\ DOc < DO \leq (2 \times DOc) &= \text{fraco produtor de biofilme} \\ (2 \times DOc) < DO \leq (4 \times DOc) &= \text{moderado produtor de biofilme} \\ (4 \times DOc) \leq DO &= \text{forte produtor de biofilme} \end{aligned}$$

4.6. Produtoras de β -lactamase de Amplo Espectro (ESBL)

Para a pesquisa de *Salmonella* spp. produtora de ESBL, foi utilizada a técnica de disco-difusão (Jarlier et al., 1988) conforme critérios recomendados pelo *Clinical and Laboratory Stanards Institute* (CLSI, 2015). Na triagem, os isolados de *Salmonella* spp. foram cultivados em ágar BHI a 35°C/6 horas, diluídas em solução fisiológica (0,9% NaCl) para a escala de 0,5

de MacFarland (10^8 UFC/ml) e semeadas em ágar Mueller-Hinton (MH, Oxoid) com auxílio de swab esterilizado. Os antibióticos (Cefar) ceftriaxona (CRO, 30 μ g), cefotaxima (CTX, 30 μ g), ceftazidima (CAZ, 30 μ g) e aztreonam (ATM, 30 μ g) foram adicionados à placa de MH semeada e incubados a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 horas para a determinação dos diâmetros do halo de inibição. As cepas com halo menor ou igual ao preconizado (CRO $\leq 25\text{mm}$, CTX $\leq 27\text{mm}$, CAZ $\leq 22\text{mm}$ e ATM $\leq 27\text{mm}$) foram selecionadas para o teste confirmatório que consiste na mesma técnica descrita acima com a adição do disco de amoxicilina-ácido clavulânico (AMC, 30 μ g) a uma distância de 20mm dos discos de antibióticos, como inibidor de beta-lactamases. A presença de halos distorcidos ou uma “zona fantasma” caracterizam a cepa como positiva para produção de ESBL.

4.7. Concentração bactericida mínima do ácido peracético e hipoclorito de sódio

Foi determinada a concentração bactericida mínima (CBM) dos sanitizantes hipoclorito de sódio e ácido peracético para os isolados em estudo, sendo 13 isolados, escolhidos de forma aleatória, foram incubados em BHI a $35^\circ\text{C}/18$ horas e, em seguida, diluídos até 10^5 UFC/ml, padronizados inicialmente, pela escala 0,5 de MacFarland. A metodologia adotada foi a microdiluição em microplacas de 96 poços com meio de cultura BHI e a obtenção das respectivas concentrações bactericida mínima de cada linhagem testada. As concentrações utilizadas nos ensaios foram preparadas a partir de uma solução inicial a 20.000 ppm (parte por milhão) (2%) de cada sanitizante. Todas as concentrações subsequentes foram diluídas em BHI na proporção 1:1. Após o período de ação de 15 minutos dos sanitizantes em temperatura ambiente, todas as diluições foram plaqueadas em ágar TSA e após incubação a $35^\circ\text{C}/24$ horas, realizou a leitura das placas a fim de verificar se houve ou não o crescimento de colônias nas respectivas diluições, sendo considerada a CBM aquela em que não havia mais crescimento. Os ensaios foram realizados em triplicata, bem como os controles positivos e negativos.

A leitura do CBM foi feita através da observação de presença ou ausência de crescimento bacteriano para cada linhagem e foi estabelecido um valor final que abrangesse 90% dos isolados avaliados.

4.8. Teste de susceptibilidade ao hipoclorito de sódio e ácido peracético na presença de biofilme

As cepas produtoras de biofilme foram submetidas ao teste de susceptibilidade aos sanitizantes hipoclorito de sódio e ácido peracético. Para a realização do teste, as concentrações

de hipoclorito de sódio e ácido peracético utilizados foram baseadas na CBM determinada no item 4.7.

A produção de biofilme ocorreu como descrito no item 4.5., pelas cepas consideradas positivas em teste prévio, por 96 horas. Após esse período, os poços foram lavados quatro vezes com PBS estéril e cada um foi inoculado com 200 μ L de cada sanitizante por 15 minutos, sendo uma placa referente ao NaOCl e outra ao ácido peracético. Posteriormente, por meio da técnica de gotejamento (10 μ l), parte do conteúdo de cada poço foi plaqueado em placas de TSA, para confirmar a eficiência dos sanitizantes, pela ausência de crescimento. Os poços foram lavados, para a retirada dos sanitizantes e depois, preenchidos com PBS estéril e a microplaca foi levada ao sonicador (Hielscher; UP100H), sendo realizados cinco ciclos de cinco segundos, na amplitude de 30%, para a quebra do biofilme e o conteúdo dos poços foi plaqueado em TSA. A proteção ocasionada pelo biofilme seria considerada eficiente se não houvesse o crescimento de colônias nas placas antes da sonicação (demonstrando a eficiência do desinfetante em células planctônicas) com a presença de colônias após esse processo. Como controle, dois poços foram inoculados com PBS no lugar dos sanitizantes. Os testes serão realizados em triplicata.

5. RESULTADOS

5.1. Isolados de *Salmonella* sp.

Os 42 isolados de *Salmonella* spp. que estavam estocados foram ressemeados para verificação da pureza e reconfirmação da identificação. Para isso, foram utilizados os meios de cultura XLD, SS e CHROMagar *Salmonella*, como observado na Figura 3.

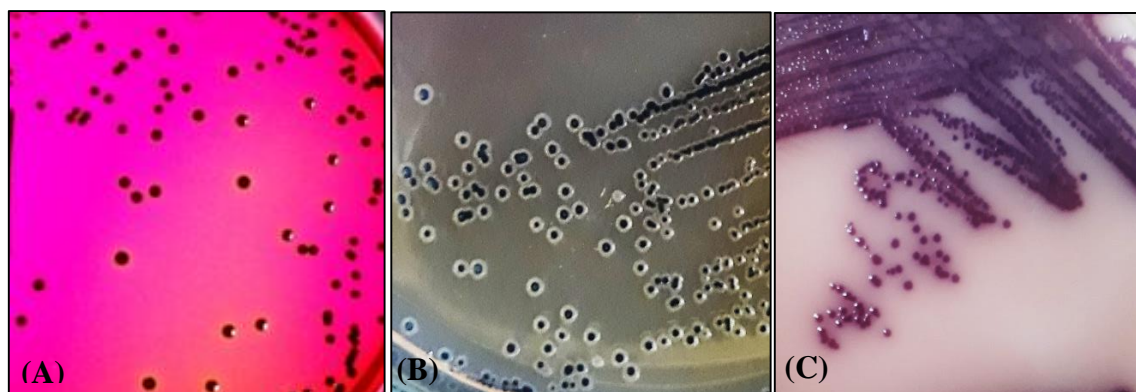


Figura 3. Placas com colônias características de *Salmonella* spp. em diferentes meios de cultura. (A) ágar xilose-lisina-desoxicolato (XLD); (B) ágar *Salmonella-Shigella* (SS); (C) CHROMagar *Salmonella* (CR).

Além disso, foram analisadas 84 amostras de carcaças de frango e 14 (16,7%) foram positivas para *Salmonella* spp, totalizando 56 cepas de *Salmonella* spp. no presente estudo.

5.2. Sorotipagem das cepas de *Salmonella*

De acordo com a sorotipagem realizada pelo Instituto Adolfo Lutz (São Paulo) observou-se 13 sorovares diferentes, entre as 56 cepas estudadas, sendo cinco sorovares referentes aos isolados deste ano e oito sorovares pertencentes à coleção de culturas.

Das 42 *Salmonella* spp isoladas em 2003, 24 cepas pertenciam ao sorovar Enteritidis (57,1%), cinco *S. Ohio* (11,9%), quatro *S. enterica* subs. *enterica* 6,7:K:- (9,5%), duas *S. Agona* (4,8%), duas *S. Infantis* (4,8%) e uma de cada de *S. Tennessee*, *S. Bredeney*, *S. Orion* e *S. Brandenburg* (2,4%). Além de uma (2,4%) *S. enterica* subs. *enterica* (rugosa) não tipável. Já referente às 14 cepas isoladas no ano de 2018, oito eram sorovar Typhimurium (57,1%), duas *S. Infantis* (14,3%), uma de cada de *S. Schwarzengrund*, *S. Heidelberg* e *S. I.4,5,12:i:-* (7,1%), bem como uma (7,1%) *S. enterica* subs. *enterica* (rugosa) não tipável.

5.3. Caracterização molecular dos isolados de *Salmonella* spp.

O gênero *Salmonella* foi confirmado pela reação de PCR, pela pesquisa do gene *invA* (Figura 4). Dentre as 56 cepas de *Salmonella* isoladas, todas (100%) apresentaram positividade para esse gene.

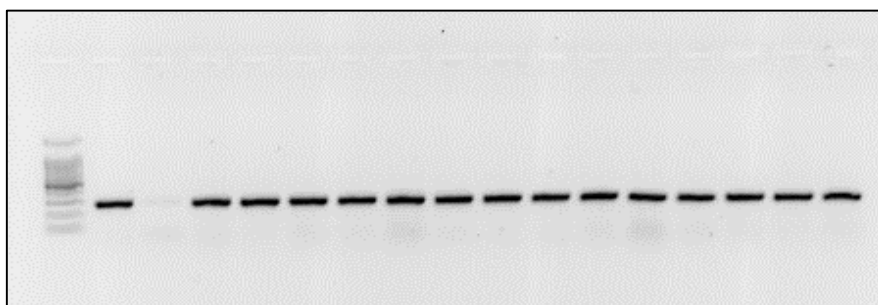


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene *invA* (284 pb); poço 1: DNA ladder 100 pb; poço 2: controle positivo; poço 3: controle negativo; poços 4-20: amostras.

Após a confirmação do gênero, os genes de virulência *adrA*, *csgD*, *sopB*, *sopD*, *sipA*, *sipB*, *sipD*, *ssaR*, *sifA*, *spvB*, *sitC*, *iroN*, *tolC*, *flgK*, *flgL* e *fljB* foram pesquisados, estando todos presentes na maioria dos isolados. Excepcionalmente, não foram observados os genes *sopD* em 8,1% e *spvB* em 37,5% dos isolados, tais genes são responsáveis por promover os sintomas de diarreia e aumentar a taxa de crescimento e sobrevivência bacteriana, respectivamente (Figura 5).

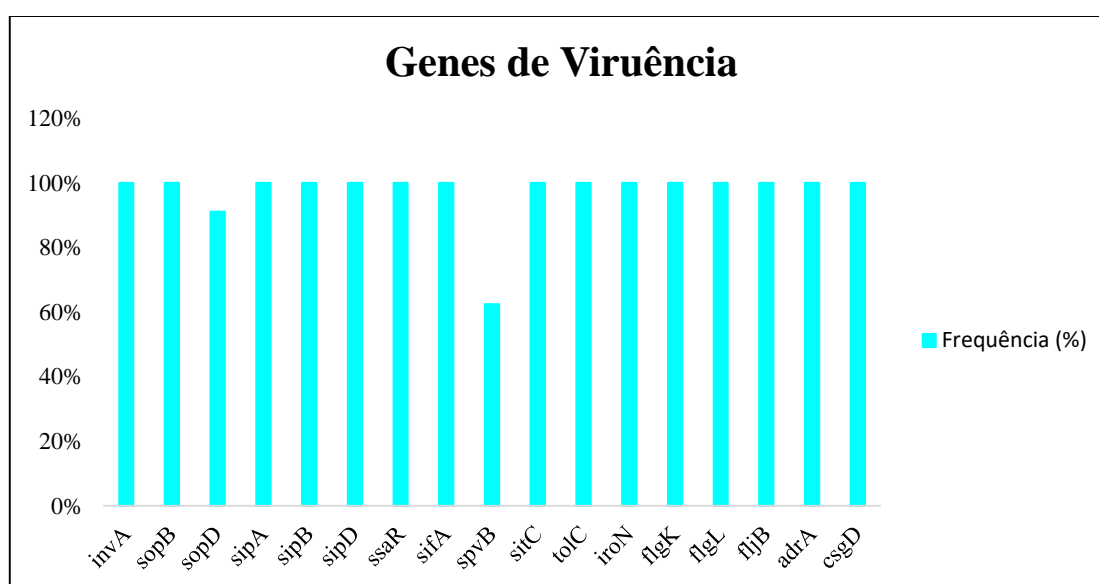


Figura 5. Distribuição dos genes de virulência, em cepas de *Salmonella* spp., isoladas de frango.

Pelas Figuras 6 a 21, pode-se observar os resultados da PCR, em relação à presença dos genes relacionados à virulência.

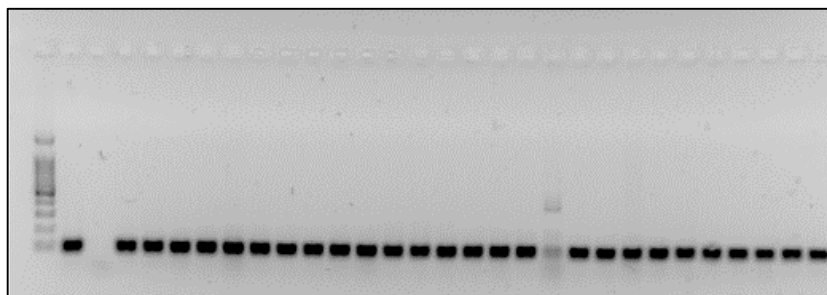


Figura 6. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene *adrA* (92 pb); poço 1: DNA ladder 100 pb; poço 2: controle positivo; poço 3: controle negativo; poços 4-30: amostras.

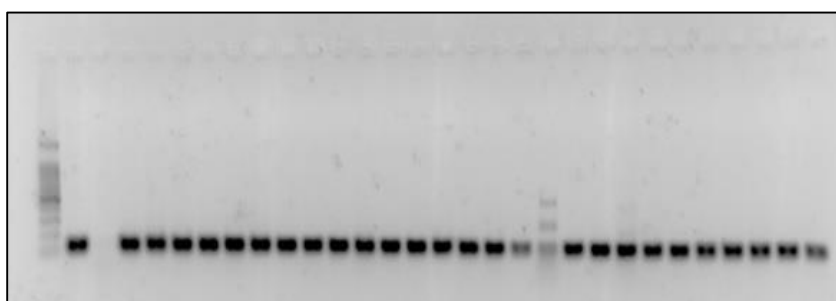


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene *csgD* (123 pb); poço 1: DNA ladder 100 pb; poço 2: controle positivo; poço 3: controle negativo; poços 4-30: amostras.

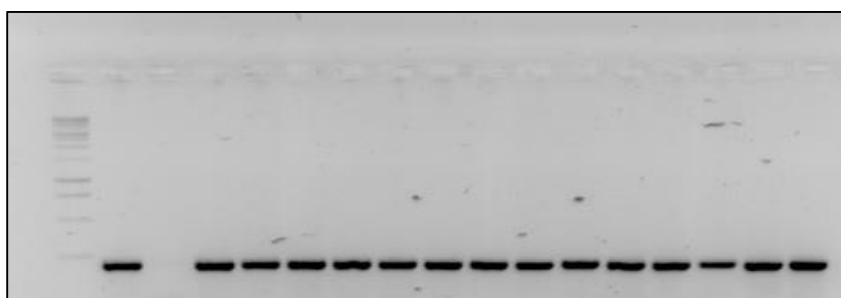


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene *sopB* (220 pb); poço 1: DNA ladder 1 kb; poço 2: controle positivo; poço 3: controle negativo; poços 4-17: amostras.

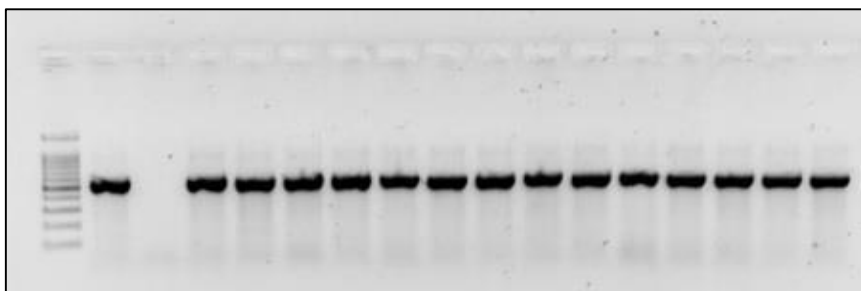


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene *sipA* (550 pb); poço 1: DNA ladder 100 pb; poço 2: controle positivo; poço 3: controle negativo; poços 4-17: amostras.

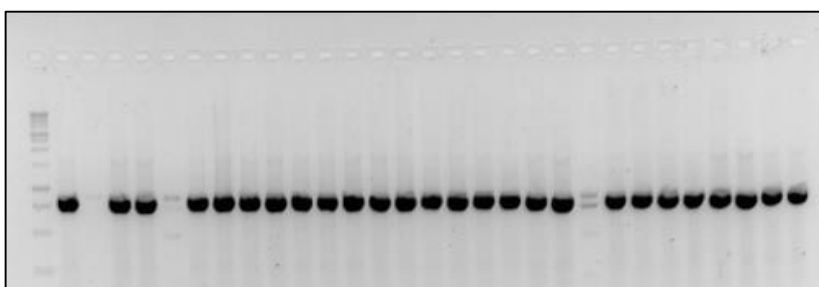


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene *sipB* (875 pb); poço 1: DNA ladder 1 kb; poço 2: controle positivo; poço 3: controle negativo; poços 4-30: amostras.

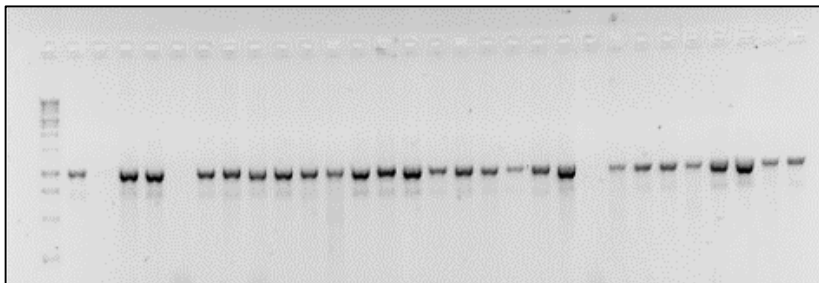


Figura 11. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene *sipD* (1029 pb); poço 1: DNA ladder 1 kb; poço 2: controle positivo; poço 3: controle negativo; poços 4-30: amostras.

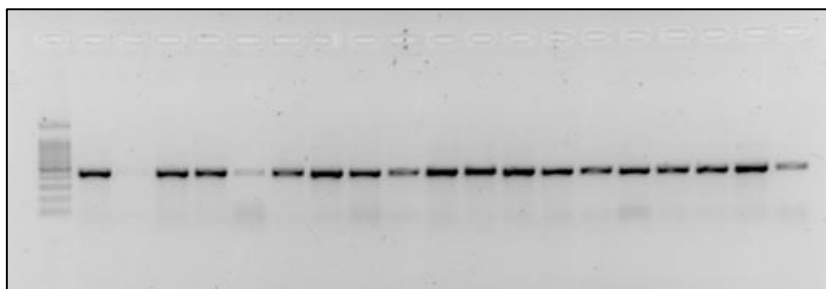


Figura 12. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene *sipA* (449 pb); poço 1: DNA ladder 100 pb; poço 2: controle positivo; poço 3: controle negativo; poços 4-20: amostras.

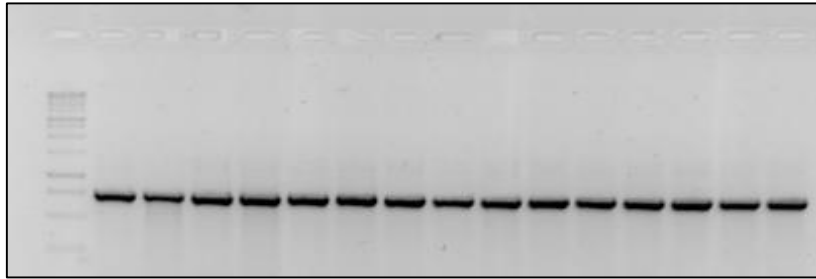


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene *sitC* (768 pb); poço 1: DNA ladder 1 kb; poço 2-16: amostras.

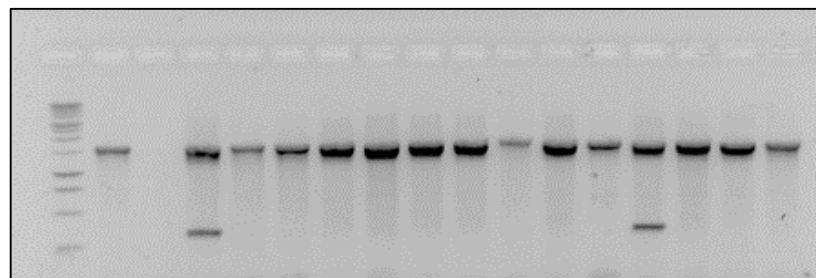


Figura 14. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene *ssaR* (1628 pb); poço 1: DNA ladder 1 kb; poço 2: controle positivo; poço 3: controle negativo; poços 4-17: amostras.

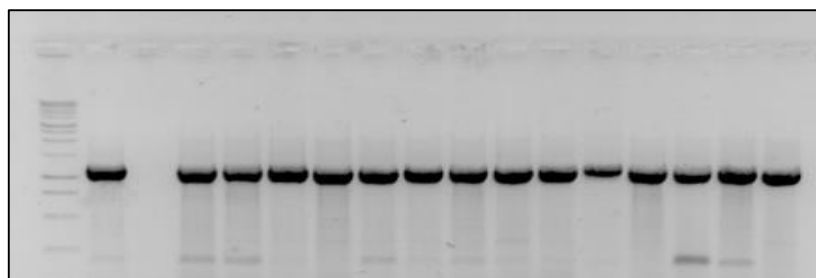


Figura 15. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene *iroN* (1205 pb); poço 1: DNA ladder 1 kb; poço 2: controle positivo; poço 3: controle negativo; poços 4-17: amostras.

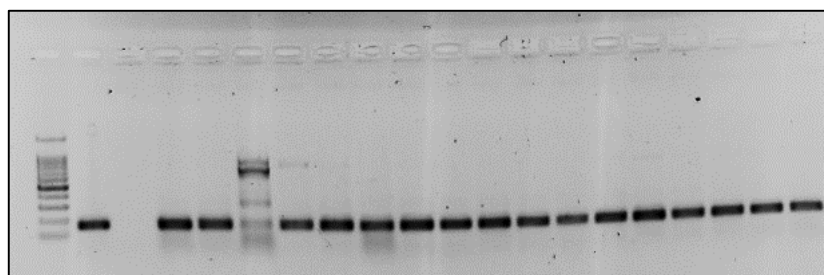


Figura 16. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene *tolC* (161 pb); poço 1: DNA ladder 100 pb; poço 2: controle positivo; poço 3: controle negativo; poços 4-17: amostras.

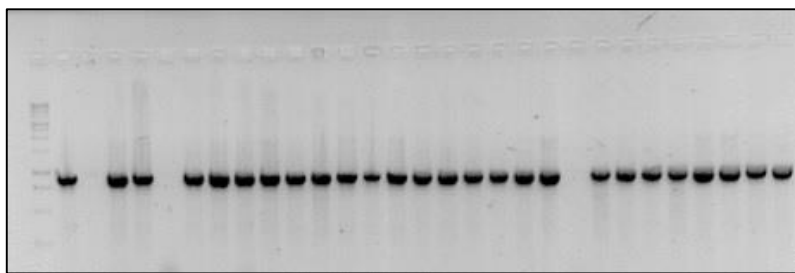


Figura 17. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene *flgL* (951 pb); poço 1: DNA ladder 1 kb; poço 2: controle positivo; poço 3: controle negativo; poços 4-30: amostras.

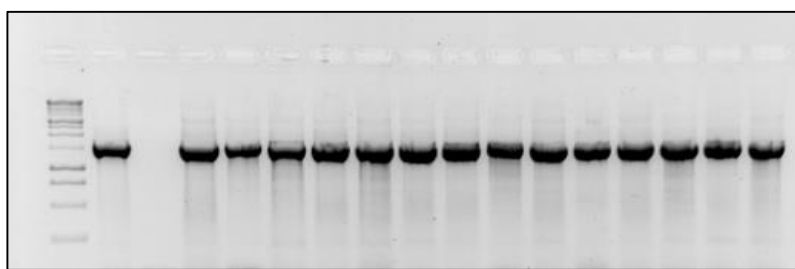


Figura 18. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene *flgK* (1656 pb); poço 1: DNA ladder 1 kb; poço 2: controle positivo; poço 3: controle negativo; poços 4-17: amostras.

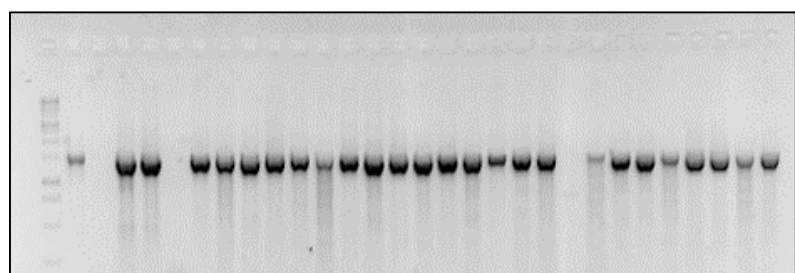


Figura 19. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene *fljB* (1515 pb); poço 1: DNA ladder 1 kb; poço 2: controle positivo; poço 3: controle negativo; poços 4-30: amostras.

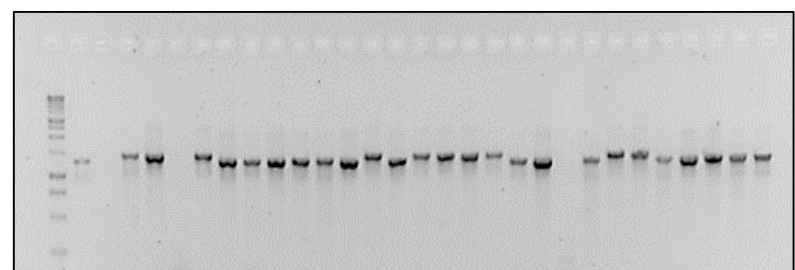


Figura 20. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene *sopD* (1291 pb); poço 1: DNA ladder 1 kb; poço 2: controle positivo; poço 3: controle negativo; poços 4-30: amostras.

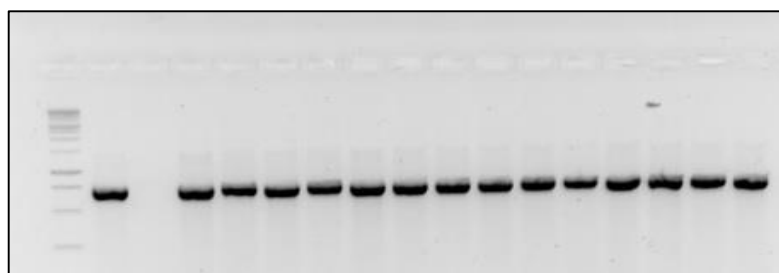


Figura 21. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene *spvB* (717 pb); poço 1: DNA ladder 1 kb; poço 2: controle positivo; poço 3: controle negativo; poços 4-14: amostras.

5.4. Produção de biofilme em microplaca de poliestireno

A capacidade dos isolados de *Salmonella* spp. de formar biofilme em microplaca de poliestireno foi observada em apenas 27 (48,2%) isolados. Em relação à intensidade de produção de biofilme, seguindo os padrões de Stepanovic et al. (2003), 13 (48,1%) cepas foram classificadas como fraca produtoras, 12 (44,4%) como moderadas e 2 (7,4%) foram classificadas como fortes produtoras (Tabela 3).

Tabela 3. Classificação da intensidade de produção de biofilme, pelos sorovares de *Salmonella* spp., isolados de carcaças de frango.

Sorovar	N	Biofilme		
		Fraco N (%)	Moderado N (%)	Forte N (%)
<i>S. Enteritidis</i>	10	6 (60)	4 (40)	-
<i>S. Typhimurium</i>	4	2 (50)	2 (50)	-
<i>S. enterica</i> sub <i>enterica</i> 6,7:K:-	3	-	2 (66,7)	1 (33,3)
<i>S. Ohio</i>	3	-	2 (66,7)	1 (33,3)
<i>S. Agona</i>	2	-	2 (100)	-
<i>S. Infantis</i>	1	1 (100)	-	-
<i>S. Tennessee</i>	1	1 (100)	-	-
<i>S. Bredeney</i>	1	1 (100)	-	-
<i>S. I,4,5,12:i:-</i>	1	1 (100)	-	-
<i>S. enterica</i> sub <i>enterica</i> (rugosa)	1	1 (100)	-	-

N: número de isolados.

5.5. Resistência bacteriana à antimicrobianos

No teste de triagem para a produção de ESBL (Figura 22A e 22B), 17 (30,4%) apresentaram resistência à pelo menos um antibiótico, sendo que seis (10,7%) mostraram resistência à ceftazidima, 14 (25%) à cefotaxima, cinco (8,9%) à ceftriaxona e 13 (23,2%) ao aztreonam (Tabela 4). No teste confirmatório com a adição do disco de amoxicilina-ácido clavulânico, nenhuma *Salmonella* spp. apresentou a “zona fantasma” ou distorção do halo, constatando-se a não produção de ESBL dos isolados.

Tabela 4. Perfil de susceptibilidade aos antibióticos usados na triagem fenotípica de produção de β -lactamase de espectro estendido (ESBL) em *Salmonella* spp. isoladas de frangos.

Antibiótico	Resistência N° (%)	Sensibilidade N° (%)
Ceftriaxona (CRO)	5 (8,9%)	51 (91,1%)
Ceftazidima (CAZ)	6 (10,7%)	50 (89,3%)
Aztreonam (ATM)	13 (23,2%)	43 (76,8%)
Cefotaxima (CTX)	14 (25%)	42 (75%)

Entretanto, foi possível observar multirresistência, isto é resistência a pelo menos 3 antibióticos (Mateva et al., 2017) em seis (10,7%) isolados. Quatro (7,1%) deles (três *S* Typhimurium e uma *S*. Heidelberg) apresentaram resistência aos quatro antibióticos de triagem testados, além da amoxicilina-ácido clavulânico (Figura 22C).

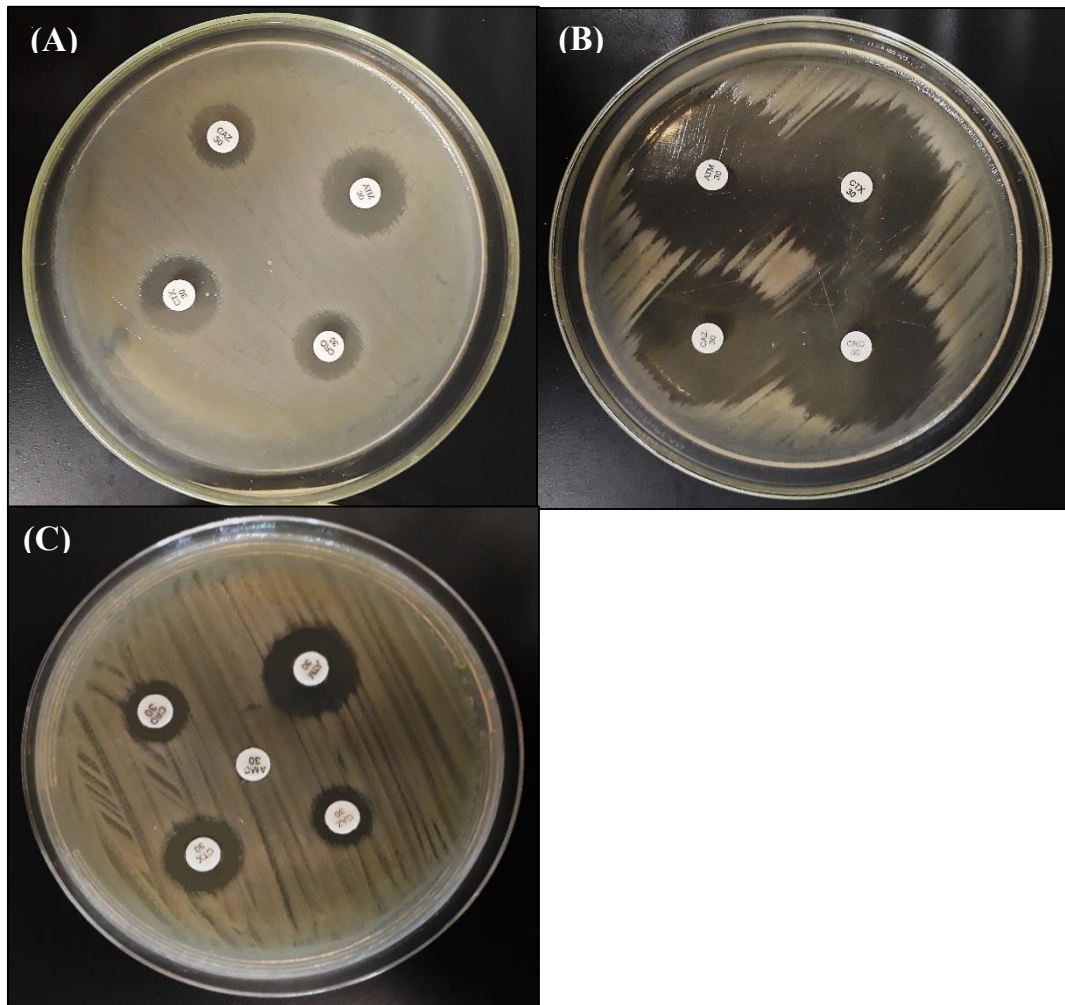


Figura 22. Teste disco-difusão dos antibióticos ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima e aztreonam em *Salmonella* spp. isoladas de frango. (A) Halos menores do que os preconizados para cada antibiótico, sugerindo resistência aos antibióticos testados. (B) Halos maiores do que o preconizado para cada antibiótico, sugerindo susceptibilidade aos antibióticos. (C) Halo demonstrando resistência também à amoxicilina-ácido clavulânico, mas sem a formação do halo fantasma (ou distorcido).

Na pesquisa de genes que conferem resistência aos antimicrobianos, para os isolados de *Salmonella* spp. que possuem β -lactamases tipo AmpC, observou-se a presença do gene *bla_{CMY-2}* em quatro (7,14%) cepas (Figura 23).

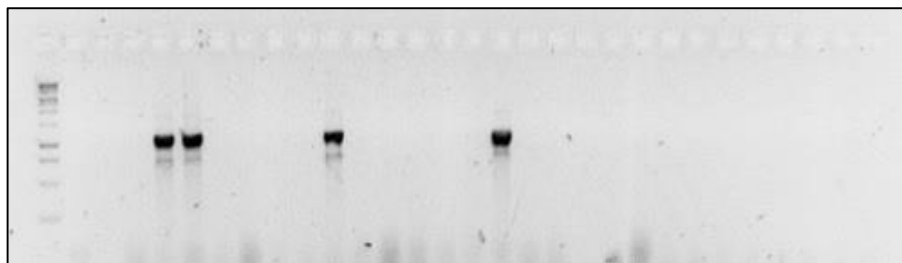


Figura 23. Eletroforese em gel de agarose para detecção do gene *cmY-2* (1143pb); poço 1: DNA ladder 1 kb; poço 2-30: amostras.

Os genes pesquisados referentes a resistência às colistinas (*mcr-1* e *mcr-2*) e a carbapenemase (*bla_{KPC}*), não foram encontrados em nenhum dos isolados.

5.6. Teste de susceptibilidade aos sanitizantes frente ao biofilme

Através da técnica de microdiluição (NCCLS, 1997), foi possível determinar a CBM para os dois tipos de sanitizantes. A fim de abranger todos os sorovares, um valor bactericida mínimo foi estabelecido para atingir 90% dos isolados, baseando-se no método da concentração inibitória mínima 90% (CIM₉₀). Para o ácido peracético, a CBM₉₀ foi de 2297 ppm (0,23%), enquanto para o NaOCl foi de 4458 ppm (0,44%), conforme mostrado na Figura 24.

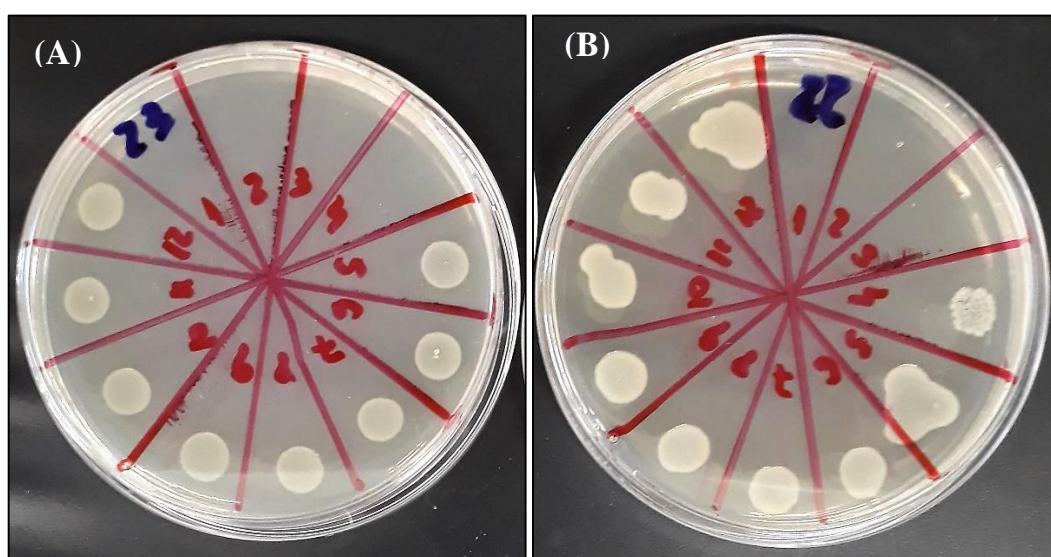


Figura 24. Concentração bactericida mínima (CBM) em *Salmonella* spp. isolados de frango, para verificar a ação de sanitizantes em 15 minutos. (A) CBM para o ácido peracético; (B) CBM para o NaOCl.

No teste de susceptibilidade frente ao biofilme, todas as cepas apresentaram o mesmo resultado, não havendo crescimento bacteriano, tanto antes quanto após a sonicação.

6. DISCUSSÃO

Salmonella spp. continua sendo um dos principais patógenos envolvidos em DOA em todo o mundo, devido à colonização de frangos sem sinais clínicos detectáveis, seguida da contaminação aos produtos e subsequente acesso aos humanos (Cosby et al., 2015). Neste estudo, observou-se a presença de oito sorovares diferentes isolados de frango na década passada e cinco sorovares isolados atualmente, de um total de 42 e 14 linhagens, respectivamente. Os sorovares *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* isolados nos respectivos anos de 2003 e 2018 foram os mais prevalentes, ambos aparecendo em 57,1% da amostragem. Deve ser ressaltado que nos isolados mais recentes, o sorovar *S. Enteritidis* não foi observado. Diversos estudos demonstraram a alta ocorrência destes sorovares, como no Paquistão, onde isolaram apenas *S. Typhimurium* (59,4%) e *S. Enteritidis* (40,6%) de carnes de aves (Khan et al., 2019). Salem et al. (2017), no Egito, encontraram em grande parte de seus isolados *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*, correspondendo a 24,3% e 17,9%, respectivamente. Na China, Ni et al. (2018) também observaram esses dois sorovares como os mais prevalentes em isolados de frangos de corte, onde 38,9% dos isolados eram *S. Enteritidis* e 24,4% *S. Typhimurium*. A alta frequência desses sorovares também foi encontrada no Brasil, pois Garcia e colaboradores (2017) observaram a presença de *S. Enteritidis* em 51,2% dos isolados e *S. Typhimurium* em 8,1%.

S. Enteritidis e *S. Typhimurium* são um dos principais sorovares causadores de gastroenterites humana (Kawasaki, 2012; LaRock et al., 2015). Em 2013, o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) notificou a presença de *Salmonella* spp. em 26% dos surtos de doenças causadas por alimentos contaminados por bactérias, sendo *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg*, *S. Newport* e *S. Javiana*, os principais sorovares envolvidos. Ademais, *S. Enteritidis* predominou em carcaças de aves em outros países, principalmente no Brasil nos anos 2000, onde relatou-se a prevalência desse sorovar em mais de 80% dos isolados (Kanashiro et al., 2005). Entretanto em outras localidades, como em países europeus, ainda é observada, predominantemente, a contaminação por este sorovar, como na Bélgica (31%), Reino Unido (24%) e Espanha (12%) (Duarte et al., 2009), sendo tal micro-organismo relatado em diversos surtos de doença veiculadas por carnes de frango nos últimos anos (EFSA e ECDC, 2018).

Contudo, apesar do foco estar voltado a estes sorovares por anos, atualmente, outros sorovares estão envolvidos em infecções humanas e animais, como *S. Infantis*, *S. Ohio*, *S. Agona*, *S. Heidelberg*, além da variante de *S. Typhimurium* I.4,[5],12:i:-, como verificado também neste estudo (Hassan et al., 2015; Antunes et al., 2016; Shippy et al., 2018; Wajid et

al., 2018). No Brasil, uma pesquisa realizada em 2015 mostrou essa heterogeneidade de sorovares, onde foi isolado de amostras de frangos, *S. Minnesota*, *S. Infantis*, *S. Heidelberg*, *S. Senftenberg* e *S. Mbandak*, principalmente (Voss-Rech et al., 2015). Essa variedade de sorovares pode estar relacionado a implementação de medidas de controle e vacinação contra os sorovares mais predominantes em países como o Brasil (Foley et al., 2011).

. Nas últimas décadas, relatos a respeito da incidência de resistência antimicrobiana em isolados transmitidos por alimento aumentaram significativamente. A multirresistência de diversas bactérias despertou um alerta mundial, pois limita as opções de tratamento para as infecções, além de facilitar a transferência de fatores de resistência entre os outros microorganismos patogênicos (Iglesias et al., 2017; Fardsanei et al., 2018). Embora os casos de salmonelose comum não necessitem do uso de antibióticos, a terapia com antibacterianos deve ser aplicada em casos mais graves (Procura et al., 2017). Neste contexto, o uso irregular de antibióticos tanto em humanos como em aves, selecionou isolados de *Salmonella* resistentes a diversos antimicrobianos usados constantemente nas práticas hospitalares e veterinárias. A maior preocupação se deve ao aumento da resistência aos β -lactâmicos em geral, visto que diversos patógenos codificam β -lactamases que hidrolisam a maioria desses antimicrobianos, principalmente, os de espectro estendido (ESBL), como cefalosporinas de 3ª e 4ª geração (Bush e Jacoby, 2010; Kao et al., 2017).

No atual estudo observou-se que os isolados de *Salmonella* não foram produtores de ESBL, porém 17 (30,3%) isolados apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano. Outros autores também encontraram baixas taxas, como Clemente e colaboradores (2013), que investigaram a susceptibilidade aos antimicrobianos em 275 isolados de *S. enterica* multirresistentes e apenas duas (0,73%) foram produtoras de ESBL. Também observaram baixa resistência a cefotaxima (0,7%), resultados inferiores aos encontrados no presente estudo. Uma investigação realizada em indústrias de frango de corte na Itália, revelou que das 324 *S. Infantis* isoladas, apenas 2 (0,62%) foram capazes de produzir ESBL (Carfora et al., 2018). Em contrapartida, um trabalho realizado no nordeste da Argélia a partir de amostras de aves, mostrou que 26,6% dos isolados de *Salmonella* produziram ESBL, (Djeffal et al., 2017). As altas taxas de suscetibilidade presente em alguns países podem ser atribuídas à regulamentações, programas de controle, além de vigilância e monitoramento do uso de medicamentos veterinários em produtos de origem animal (Cunha-Neto et al., 2018).

O gene *bla_{CMY-2}* que codifica a resistência à β -lactamase AmpC, foi detectado em quatro (7,14%) linhagens de *Salmonella* spp., sendo estas multirresistentes e isoladas no ano de 2018. Campos e colaboradores (2017), em uma pesquisa realizada com 31 cepas de *Salmonella* spp. isoladas de carnes de frango importadas do Brasil para o Japão, encontraram o gene *bla_{CMY-2}*

em seis (19,3%) isolados. A CMY-2 é frequentemente reportada em salmonelas isoladas de países americanos (Fitch et al., 2016) e diversas pesquisas executadas no Brasil, demonstraram a presença desse gene em taxas mais elevadas que o presente estudo, como Giuriatti et al. (2017), que observaram a presença do gene *bla_{CMY-2}*, a partir de amostras de frangos, em 38,9% dos isolados de *Salmonella* spp. No ano seguinte, outro estudo realizado no Brasil com carnes de frango observou perfil similar, onde 20% das salmonelas isoladas apresentaram tal gene (Moura et al., 2018).

Esses resultados corroboram com o fato de que a produção de ESBL, bem como das demais enzimas β -lactâmicas, podem variar com a região de isolamento e o tamanho da amostragem (Chaudhary e Aggarwal, 2004; Pathak et al., 2017), além de serem comumente relatadas em casos de cepas multirresistentes (Huang et al., 2013; Fernández et al., 2018). Apesar da baixa taxa de multirresistência no estudo em questão, destaca-se o fato de tal cepas serem isoladas recentemente, o que sugere um aumento na seleção de linhagens resistentes ao longo dos anos.

Os genes de virulência *invA*, *sipA*, *sipB*, *sipD*, *sopB*, *sopD*, *spvB*, *ssaR*, *sifA*, *sitC*, *iroN*, *tolC*, *flgK*, *fljB* e *flgL* codificam proteínas associadas ao processo de adesão, invasão e sobrevivência da bactéria dentro das células do hospedeiro. Dos 15 genes testados, 13 foram encontrados em todas as linhagens analisadas, demonstrando o alto potencial patogênico dessas cepas. Entretanto, o gene *spvB* estava presente em 35 (62,5%) isolados e o *sopD* em 51 (91,1%).

Hur et al. (2011) analisaram 46 *S. Enteritidis* isolados de frangos de corte na Coreia e verificaram que mais de 93% deles abrigavam os genes de virulência *invA*, *hilA*, *sipA*, *sopD*, *sopE2*, *ssrA*, *ssaR*, *sopB*, *sopA* e *spvC*. Resultados similares foram obtidos por Campioni et al. (2012) em coletas feitas na cidade de São Paulo, que ao estudarem 128 isolados de *S. Enteritidis*, quando observaram que 97,6% deles apresentaram todos os genes de virulência investigados (*invA*, *sipA*, *sipD*, *sopB*, *sopD*, *sopE2*, *ssaR*, *sifA*, *spvB*, *prot6E*, *flgK*, *fljB* e *flgL*), sendo que somente um isolado foi negativo para o gene *sipA*. Em São Paulo, Almeida et al. (2013) estudaram 35 *S. Infantis* isoladas de fezes humanas e alimentos variados e constataram que todas as cepas carregavam os genes *flgK*, *fljB*, *flgL*, *invA*, *sopB* e *sifA*. Nenhuma das cepas em questão apresentaram o gene *spvB* e apenas uma não possuía o gene *sopD*. Além destes estudos, Aravena et al. (2019) analisaram a presença de seis genes de virulência (*invA*, *sifA*, *pefA*, *agfA*, *lpfA* and, *stkD*) em isolados de *S. Heidelberg*, a partir de amostras clínicas e ambientais e 100% carregavam todos os genes pesquisados, com exceção do *pefA*, que não detectado em nenhum dos isolados.

Esses resultados sugerem não haver nenhuma diferença na presença dos genes de virulência de *Salmonella* spp., isoladas de materiais clínicos, ambientais ou de origem

alimentar. Além disso, a elevada presença desses genes de virulência, deve-se à facilidade da transmissão horizontal (Chu et al., 2018), demonstrando o grande potencial patogênico desses isolados em causar infecções humanas independentemente da época de isolamento.

Outro fator de virulência de extrema importância é a formação de biofilme, conhecido por permitir o crescimento e sobrevivência dos micro-organismos nele envolvidos. Devido à sua matriz extracelular polimérica, o biofilme protege a bactéria contra ação de agentes bactericidas, utilizados frequentemente para a limpeza de equipamentos de processamento. A intensidade de formação de biofilme das bactérias pode variar significativamente entre os diferentes sorovares e isolados, devido à disponibilidade de nutrientes, propriedades das superfícies e as tensões ambientais geradas em testes laboratoriais, proporcionando comportamentos distintos e apresentando-se como forte, moderado, fraco ou não produtores de biofilme (Srey et al., 2013; Chylkova et al., 2017; Kumar et al., 2018). Assim, somente a presença dos genes *csgD* e *adrA*, reguladores estruturais do biofilme, pode não refletir a sua real expressão (Borges et al., 2018).

A capacidade dos isolados de *Salmonella* em formar biofilme em microplaca de poliestireno foi observada em 48,2% dos isolados, apesar dos genes *csgD* e *adrA* estarem presentes em todas as linhagens. O estudo de Oliveira et al. (2014) mostrou-se que todas as 174 *Salmonella* isolados de frango apresentavam os genes *csgD* e *adrA*, mas 98,3% produziram biofilme a 35°C e nenhuma das cepas foi classificada como forte produtora. Ziech et al. (2016) apresentaram valores similares, onde os 98 isolados de *Salmonella* codificavam os genes *csgD* e *adrA*, mas somente um (1%) isolado foi classificado como forte produtor, enquanto 69 (70,4%) cepas foram consideradas fracas produtoras e 28 (28,6%), moderadas. Borges et al. (2018) observaram que 66% dos seus isolados de *Salmonella*, sorovares *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, foram capazes de formar biofilme em superfície de poliestireno, sendo a maioria (40,9%) fracas produtoras. Shi et al. (2018) isolaram 40 cepas de *Salmonella* a partir de aves doentes e 27 (67,5%) foram produtores de biofilme.

Com o passar dos anos, a produção de alimentos se expandiu, aumentando a complexidade de sua produção, devido a volumes maiores, operações frequentemente mecanizadas, alimentos mais elaborados, além do tempo e distância entre a produção e o consumidor (Langsrud et al., 2003), onde a segurança desses produtos causa constantes preocupações aos consumidores, à indústria de alimentos e aos órgãos reguladores. Assim, diferentes diretrizes estão sendo propostas para limitar e controlar a ocorrência de patógenos em alimentos. O uso de sanitizantes como sistema de controle nos processos de limpeza e desinfecção em ambientes de produção e venda é uma das alternativas para manter a qualidade dos alimentos. Esse processo deve remover os contaminantes microbianos que se acumulam

nas superfícies durante a produção, evitando a transferência de micro-organismos por toda a cadeia produtiva (Falcó et al., 2019; Moretro e Langsrud, 2018).

Atualmente, os sanitizantes mais comumente utilizados no cenário alimentício são a base de cloro, como o NaOCl, e ácidos, como o PAA (Singh et al., 2018). Nesses ambientes, a eficácia do processo de sanitização depende de inúmeras variantes, como a temperatura do ambiente, tempo de exposição e concentração dos sanitizantes, além do tipo de material na qual ocorrerá o processo de desinfecção. No presente estudo, detectou-se a CBM necessária para os isolados de *Salmonella* spp., que correspondeu a 0,44% para NaOCl e 0,23% ao PAA. Consequente, mediante o teste de susceptibilidade a tais sanitizantes, frente ao biofilme, foi possível observar a ausência de crescimento de todos os isolados antes e após o processo de sonicação. Esses resultados demonstraram que os desinfetantes foram efetivos nas concentrações testadas (CBM_{90%}) e que os biofilmes não protegeram as células bacterianas, possivelmente porque a maioria delas foram classificadas como fracas ou moderadas produtoras de biofilme. E, embora dois isolados tenham sido classificados como fortes produtores, aparentemente, a espessura do biofilme produzido não foi suficiente para proteger as células do desinfetante.

Ziech et al. (2016) testaram o PAA a 0,2% por 15 minutos, concentração muito próxima à usada no presente trabalho e mesmo tempo, em biofilmes de *Salmonella* spp., isoladas de uma planta de processamento de aves e também detectaram um significativo decréscimo da população (5,71 log UFC/cm²). Utilizando concentrações bem menores de NaOCl (0,004%; 0,005% e 0,006%), por 10 minutos, Sarjit et al. (2017) observaram uma redução das células bacterianas de 2.93, 2.96 e 4.1 log UFC/cm² respectivamente, de *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, mesmo na presença de biofilme. Em 2108, Iñiguez-Moreno et al. também analisaram o comportamento do biofilme de *Salmonella* spp. isoladas de indústrias de carnes, frente ao NaOCl (0,02%) e ao PAA (0,35%) por 15 minutos e observaram a ausência de crescimento bacteriano perante a ambos sanitizantes.

7. CONCLUSÃO

A heterogeneidade de sorovares de *Salmonella* spp. presentes em carcaças de frango isolados ao longo dos anos demonstrou a grande facilidade de disseminação desta bactéria, a qual carrega genes codificadores de importantes fatores de virulência. A associação de tais fatores à multirresistência aos antimicrobianos de última geração observada ao decorrer do tempo, como demonstrado no presente estudo, é extremamente preocupante à saúde pública, principalmente para os consumidores imunodeprimidos.

Os isolados produtores de biofilme apresentaram-se, em sua grande maioria, como fracos ou moderados produtores, o que auxiliou na total efetividade da ação dos desinfetantes, frente às bactérias. Portanto, respeitando-se o tempo de exposição e a concentração adequada desses produtos, ocorrerá a eliminação dos patógenos, evitando a sua persistência no ambiente e a contaminação de carnes de boa procedência.

8. BIBLIOGRAFIA

ABAKPA, G.O.; UMOH, V.J.; AMEH, J.B.; YAKUBU, S.E.; KWAGA, J.K.P.; KAMARUZAMAN, S. Diversity and antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* isolated from fresh produce and environmental samples. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, 2015, v.3, p.38–46.

ALI, T.; RAHMAN, S.U.; ZHANG, L.; SHAHID, M.; HAN, D.; GAO, J.; ZHANG, S.; RUEGG, P.L.; SADDIQUE, U.; HAN, B. Characteristics and genetic diversity of multi-drug resistant extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis. **Oncotarget**, 2017, v.8, n.52, p.90144-63.

ALMEIDA, F.; SILVA, A.P.; OLIVEIRA, M.A.; FALCÃO, J.P. Molecular epidemiology and virulence markers of *Salmonella* Infantis isolated over 25 years in São Paulo State, Brazil. **Infection, Genetics and Evolution**, 2013, v.19, p.145–151.

ALMEIDA, R.N.; COSTA, P.R.; DE OLIVEIRA, J.A.S.; FERREIRA, M.B.; MARTINS, O.A.; RAGHIANTE, F. Natural alternatives for reducing bacterial biofilms in food industry. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, 2017, v.11, n.2, p.144–150.

ANDREWS, W.H.; FLOWERS, J.S.; BAILEY, J.S. *Salmonella*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. **American Public Health Association**. Washington, 4th edition, 2001, p.357-380.

ANTUNES, P.; MOURÃO, J.; CAMPOS, J.; PEIXE, L. Salmonellosis: the role of poultry meat. **Clinical Microbiology and Infection**, 2016, v.22, p.110–121.

ARAVENA, C.; VALENCIA, B.; VILLEGAS, A.; ORTEGA, M.; FERNÁNDEZ, A.R.; ARAYA, P.R.; SAAVEDRA, A.; DEL, R.C. Characterization of *Salmonella* Heidelberg strains isolated in Chile. **Revista medica de Chile**, 2019, v.147, n.1, p.24-33.

ARNOLD, T.; SCHOLZ, H.C.; MARG, H.; RÖSLER, U.; HENSEL, A. Impact of *invA*-PCR and Culture Detection Methods on Occurrence and Survival of *Salmonella* in the Flesh, Internal Organs and Lymphoid Tissues of Experimentally Infected Pigs. **Journal of Veterinary Medicine**, 2004, v.51, p.459–463.

ASIF, M.; RAHMAN, H.; QASIM, M.; KHAN, T.A.; ULLAH, W.; JIE, Y. Molecular detection and antimicrobial resistance profile of zoonotic *Salmonella* Enteritidis isolated from broiler chickens in Kohat, Pakistan. **Journal of the Chinese Medical Association**, 2017, v.80, p.303-306.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). Relatório Anual de Atividades 2015, 2015. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/files/publicacoes/c59411a243d6dab1da8e605be58348ac.pdf>>. Acesso em 20 de janeiro de 2018.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). Relatório Anual de Atividades 2016, 2017. Disponível em: <http://abpabr.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzido.pdf>. Acesso em 15 de dezembro de 2018.

BAE, D.; CHENG, CM.; KHAN, A.A. Characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing non-typhoidal *Salmonella* (NTS) from imported food products. **International Journal of Food Microbiology**, 2015, v.214, p.12–17.

BARILLI, E.; BACCI, C.; VILLA, Z.S.; MERIALDI, G.; D'INCAU, M.; BRINDANI, F.; VISMARRA, A. Antimicrobial resistance, biofilm synthesis and virulence genes in *Salmonella* isolated from pigs bred on intensive farms. **Italian Journal of Food Safety**, 2018, v.7, p.7223.

BESSA, M.C. **Caracterização fenotípica e genotípica de amostras de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium isoladas de suínos no Rio Grande do Sul** (2006). Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

BONNET, R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: The CTX-M enzymes. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, 2004, v. 48, p. 1-14.

BOORE, A.L.; HOEKSTRA, R.M.; IWAMOTO, M.; FIELDS, P.I.; BISHOP, R.D.; SWERDLOW, D.L. *Salmonella enterica* infections in the United States and assessment of coefficients of variation: A novel approach to identify epidemiologic characteristics of individual serotypes, 1996–2011. **PLoS One**, 2015, v.10, p.e0145416.

BORGES, K.A.; FURIAN, T.Q.; DE SOUZA, S.N.; MENEZES, R.; DE LIMA, D.A.; FORTES, F.B.B.; SALLE, C.T.P.; MORAES, H.L.S.; NASCIMENTO, V.P. Biofilm formation by *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium isolated from avian sources is partially related with their in vivo pathogenicity. **Microbial Pathogenesis**, 2018, v.118, p.238-241.

BOROWIAK, M.; FISCHER, J.; HAMMERL, J.A.; HENDRIKSEN, R.S.; SZABO, I.; MALORNY, B. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, 2017, v.72, p.3317–24.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). In *Resolução - RDC n° 216*, de 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre Regulamento Técnico de Boas Práticas para Serviços de Alimentação. Brasília, DF. 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). In *Resolução - RDC n° 14*, 28 de fevereiro de 2007. Dispõe sobre regulamento técnico para produtos com ação antimicrobiana. Brasília, DF. 2007.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). In *Resolução – RDC n° 216*, 15 de setembro de 2004. Dispõe sobre regulamento técnico de boas práticas para serviços de alimentação. 2004.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Portaria n° 122, de 29 de novembro de 1993. Princípio ativo ácido peracético, 1993.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n°12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de diagnóstico laboratorial da *Salmonella* spp. Brasília (DF). Disponível em: <http://portal.arquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/dezembro/15/manual-diagnostico-salmonella-spp-web.pdf>. Acessado em: 27 de setembro de 2018.

BUGAREL, M.; TUDOR, A.; LONERAGAN, G.H.; NIGHTINGALE, K.K. Molecular detection assay of five *Salmonella* serotypes of public interest: Typhimurium, Enteritidis, Newport, Heidelberg, and Hadar. **Journal of Microbiological Methods**, 2017, v.134, p.14–20.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2010, v. 54, n. 3, p. 969-976.

CAMPIONI, F.; BERGAMINI, A.M.M.B.; FALCÃO, J.P. Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. **Food Microbiology**, 2012, v.32, p.254-264.

CAMPOS, J.; MOURÃO, J.; SILVEIRA, L.; SARAIVA, M.; CORREIA, C.B.; MAÇÃS, A.P.; PEIXE, L.; ANTUNES, P. Imported poultry meat as a source of extended-spectrum cephalosporin-resistant CMY-2-producing *Salmonella* Heidelberg and *S. Minnesota* in European Union, 2014-2015. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2017, v.51, n.1, p.151-154.

CARATTOLI, A.; VILLA, L.; FEUDI, C.; CURCIO, L.; ORSINI, S.; LUPPI, A.; PEZZOTTI, G.; MAGISTRALI, C.F. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. **Euro Surveill**, 2017, v.22, n.31.

CARDOSO, A.L.S.P.; KANASHIRO, A.M.I.; STOPPA, G.F.Z.; de CASTRO, A.G.M.; LUCIANO, R.L.; TESSARI, E.N.C. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frango provenientes de abatedouros do estado de São Paulo, Brasil, no período de 2000 a 2010. **Revista Científica de Medicina Veterinária**, 2015, v.24, p.1-12.

CARFORA, V.; ALBA, P.; LEEKITCHAROENPHON, P.; BALLARÒ, D.; CORDARO, G.; DI MATTEO, P.; DONATI, V.; IANZANO, A.; IURESCIA, M.; STRAVINO, F.; TAGLIAFERRI, T.; BATTISTI, A.; FRANCO, A. Colistin resistance mediated by *mcr-1* in ESBL-producing, multidrug resistant *Salmonella* Infantis in broiler chicken industry, Italy (2016-2017). **Frontiers in Microbiology**, 2018, v.9, p.2395.

CASELLA, T.; NOGUEIRA, M.C.L.; SARAS, E.; HAENNI, M.; MADEC, JY. High prevalence of ESBLs in retail chicken meat despite reduced use of antimicrobials in chicken production, France. **International Journal of Food Microbiology**, 2017, v.257, p.271–275.

CDC, 2013. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks United States, 2013: Annual Report. Centers for Disease Control and Prevention, USA. Disponível em: <https://www.cdc.gov/foodsafety/pdfs/foodborne-disease-outbreaks-annual-report-2013-508c.pdf>. Acessado em: 02 de outubro de 2018.

CDC. Turtle-associated salmonellosis in humans: United States, 2006–2007. Morbidity and mortality weekly report (MMWR) 2007 v.56, n.26, p.649–652.

CHAUDHARY, U.; AGGARWAL, R. Extended spectrum -lactamases (ESBL) - An emerging threat to clinical therapeutics. **Indian Journal Medical Microbiology**, 2004, v.22, n.2, p.75-80.

CHU, H.Y.; SPROUFFSKE, K.; WAGNER, A. Assessing the benefits of horizontal gene transfer by laboratory evolution and genome sequencing. **BMC Evolutionary Biology**, 2018, v.18, n.1, p.54.

CHUAH, L.; SYUHADA, A.K.S.; SUHAIMI, I.M.; HANIM, T.F.; RUSUL, G. Genetic relatedness, antimicrobial resistance and biofilm formation of *Salmonella* isolated from naturally contaminated poultry and their processing environment in northern Malaysia. **Food Research International**, 2017, v.105, p.743-751.

CHYLKOVA, T.; CADENA, M.; FERREIRO, A.; PITESKY, M. Susceptibility of *salmonella* biofilm and planktonic bacteria to common disinfectant agents used in poultry processing. **Journal of Food Protection**, 2017, v. 80, n. 7, p.1072–1079.

CIZMAN, M. The use and resistance to antibiotics in the community. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2003, v. 21, n. 4, p. 297-307.

CLEMENTE, L.; MANAGEIRO, V.; FERREIRA, E.; JONES-DIAS, D.; CORREIA, I.; THEMUDO, P.; ALBUQUERQUE, T.; CANIÇA, M. Occurrence of extended-spectrum β -lactamases among isolates of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* from food-producing animals and food products, in Portugal. **International Journal of Food Microbiology**, 2013, v.167, p.221–228.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement**. EUA. 2015. (M100-S25).

COBURN, B.; GRASSL, G.A.; FINLAY, B.B. Salmonella, the host and disease: a brief review. **Immunology and Cell Biology**, 2007, v.85, p.112-118.

COLLIGHAN, R.J.; WOODWARD, M.J. The SEF14 fimbrial antigen of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis is encoded within a pathogenicity islet. **Veterinary Microbiology**, 2001, v.80, n.3, p.235-245.

COSBY, D.E.; COX, N.A.; HARRISON, M.A.; WILSON, J.L.; BUHUR, R.J.; FEDORKA-CRAY, P.J. *Salmonella* and antimicrobial resistance in broilers: A review. **Journal of Applied Poultry Research**, 2015, v.24, p.408–26.

CUE, D.; LEI, M. G.; LEE, C. Y. Genetic regulation of the intercellular adhesion *locus* in staphylococci. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2012, v.2, p. 1-13.

de JONG, H.K., et al. Host–pathogen interaction in invasive salmonellosis. **Plos Pathogens**, 2012, v.8, n.10, p.1002933.

CUNHA-NETO, A.; CARVALHO, L.A.; CARVALHO, R.C.T.; DOS PRAZERES RODRIGUES, D.; MANO, S.B.; FIGUEIREDO, E.E.S.; CONTE-JUNIOR, C.A. *Salmonella* isolated from chicken carcasses from a slaughterhouse in the state of Mato Grosso, Brazil: antibiotic resistance profile, serotyping, and characterization by repetitive sequence-based PCR system. **Poultry Science**, 2018, v.97, n.4, p.1373–1381.

DJEFFAL, S.; BAKOUR, S.; MAMACHE, B.; ELGROUD, R.; AGABOU, A.; CHABOU, S.; HIRECHE, S.; BOUAZIZ, O.; RAHAL, K.; ROLAIN, JM. Prevalence and clonal relationship of ESBL producing *Salmonella* strains from humans and poultry in northeastern Algeria. **BMC Veterinary Research**, 2017, v.13, p.132.

DOLEJSKA, M.; PAPAGIANNITSIS, C.C. Plasmid-mediated resistance is going wild. **Plasmid**, 2018, v.99, p.99-111.

DOS SANTOS, A.M.P.; FERRARI, R.G.; CONTE-JUNIOR, C.A. Virulence factors in *Salmonella* Typhimurium: the sagacity of a bacterium. **Current Microbiology**, 2018, v.75, p.1-12.

DOUMITH, M.; GODBOLE, G.; ASHTON, P.; LARKIN, L.; DALLMAN, T.; DAY, M.; DAY, M.; MULLER-PEBODY, B.; ELLINGTON, M.J.; DE PINNA, E.; JOHNSON, A.P.; HOPKINS, K.L.; WOODFORD, N. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene conferring colistin resistance in human and food isolates of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in England and Wales. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2016, v.71, p.2300–05.

DUARTE, D.A.M.; RIBEIRO, A.R.; VASCONCELOS, A.M.M.; SANTOS, S.B.; SILVA, J.V.D.; DE ANDRADE, P.L.A.; FALCÃO, L.S.P.C.A. Occurrence of *Salmonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2009, v.40, p.569-573.

EGUALE, T. Non-typhoidal *Salmonella* serovars in poultry farms in central Ethiopia: Prevalence and antimicrobial resistance. **BMC Veterinary Research**, 2018, v.14, p.217.

EL-TAYEBA, M.A.; IBRAHIMA, A.S.S.; AL-SALAMAH, A.A.; ALMAARY, K.S.; ELBADAWI, Y.B. Prevalence, serotyping and antimicrobials resistance mechanism of *Salmonella enterica* isolated from clinical and environmental samples in Saudi Arabia. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2017, v.48, p.499–508.

ERAMO, A.; MEDINA, M.W.R.; FAHRENFELD, N.L. Peracetic acid disinfection kinetics for combined sewer overflows: Indicator organisms, antibiotic resistance genes, and microbial community. **Environmental Science: Water Research & Technology**, 2017, v.3, n.6, p.1061–72.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY AND EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (EFSA and ECDC). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. **EFSA Journal**, 2018, v.16, n.12, e05500.

FALCÓ, I.; VERDEGUER, M.; AZNAR, R.; SÁNCHEZ, G.; RANDAZZO, W. Sanitizing food contact surfaces by the use of essential oils. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 2019, v.51, p.220-228.

FARDSANEI, F.; NIKKHAHI, F.; BAKHSHI, B.; SALEHI, T.Z.; TAMAI, I.A.; DALLAL, M.M.S. Molecular characterization of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates from food and human samples by serotyping, antimicrobial resistance, plasmid profiling, (GTG)5-PCR and ERIC-PCR. **New Microbes and New Infections**, 2016, v.14, p.24–30.

FARDSANEI, F.; DALLAL, M.M.S.; DOURAGHI, M.; SALEHI, T.Z.; MAHMOODI, M.; MEMARIANI, H.; NIKKHAHI, F. Genetic diversity and virulence genes of *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotype Enteritidis isolated from meats and eggs. **Microbial Pathogenesis**, 2017, v.107, p.451-456.

FARDSANEI, F.; DALLALA, M.M.S.; DOURAGHIA, M.; MEMARIANIC, H.; BAKHSHID, B.; SALEHIE, T.Z.; NIKKHAHI, F. Antimicrobial resistance, virulence genes and genetic relatedness of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis isolates recovered from human gastroenteritis in Tehran, Iran. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 2018, v.12, p.220-226.

FERNÁNDEZ, J.; GUERRA, B.; RODICIO, M.R. Resistance to Carbapenems in Non-Typhoidal *Salmonella enterica* Serovars from Humans, Animals and Food. **Veterinary Sciences**, v.5, n.2, p.40, 2018.

FINCH, R.; DAVEY, P.; WILCOX, M. H.; IRVING, W. Antimicrobial Chemotherapy, **6^a ed. Oxford**, 2012, p. 137.

FITCH, F.M.; CARMO-RODRIGUES, M.S.; OLIVEIRA, V.G.; GASPARI, M.V.; DOS SANTOS, A.; DE FREITAS, J.B.; PIGNATARI, A.C. β -lactam resistance genes: characterization, epidemiology, and first detection of *bla*CTX-M-1 and *bla*CTX-M-14 in *Salmonella* spp. isolated from poultry in Brazil-Brazil Ministry of Agriculture's Pathogen Reduction Program. **Microbial Drug Resistance**, 2016, v.22, p.164-71.

FLUIT, A.C. Towards more virulent and antibiotic-resistant *Salmonella*? **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 2005, v.43, p.1-11.

FOLEY, S.; LYNNE, A.; NAYAK, R. Challenges: Prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. **Journal of Animal Science**, 2008, v.86, p.E149-E162.

FOLEY, S.L.; NAYAK, R.; HANNING, I.B.; JOHNSON, T.J.; HAN, J.; RICKE, S.C. Population dynamics of *Salmonella enterica* serotypes in commercial egg and poultry production. **Applied and Environmental Microbiology**, 2011, v.77, n.13, p.4273-4279.

FORTES, T.P.; FAGUNDES, M.Q.; VASCONCELLOS, F.A.; TIMM, C.D.; DA SILVA, E.F. *Salmonella enterica* pathogenicity islands: A review. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, 2012, v.71, n.2, p.219-27.

FRAIS, S.; NG, YL.; GULABIVALA, K. Some factors affecting the concentration of available chlorine in commercial sources of sodium hypochlorite. **International Endodontic Journal**, 2001, v.34, p.206–215.

FRAIS, S.; NG, YL.; GULABIVALA, K. Some factors affecting the concentration of FUKUZAKI, S. Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. **Biocontrol Science**, 2006, v.11, n.4, p.147-157.

GARCÍA-GONZALO, D; PAGÁN, R. Influence of environmental factors on bacterial biofilm formation in the food industry: A review. **Journal of Postdoctoral Research**, 2015, v. 3, n. 6, p.3-13.

GARCIA, K.C.D.O.D.; CORRÊA, I.M.D.O.; PEREIRA, L.Q.; SILVA, T.M.; MIONI, M.D.S.R.; IZIDORO, A.C.D.M.; BASTOS, I.H.V.; GONÇALVES, G.A.M.; OKAMOTO, A.S.; ANDREATTI FILHO, R.L. Bacteriophage use to control *Salmonella* biofilm on surfaces present in chicken slaughterhouses. **Poultry Science**, 2017, v.96, n.9, p.3392-3398.

GIURIATTI, J.; STEFANI, L.M.; BRISOLA, M.C.; CRESCENCIO, R.B.; BITNER, D.S.; FARIA, G.A. *Salmonella* Heidelberg: Genetic profile of its antimicrobial resistance related to

- extended spectrum β -lactamases (ESBLs). **Microbial Pathogenesis**, 2017, v.109, p.195-199.
- GONZÁLEZ-MACHADO, C.; CAPITA, R.; RIESCO-PELÁEZ, F.; ALONSO-CALLEJA, C. Visualization and quantification of the cellular and extracellular components of *Salmonella* Agona biofilms at different stages of development. **PLoS One**, 2018, v.13, n.7, p.e0200011.
- GUIBOURDENCHE, M., et al. Supplement 2003 – 2007 (No. 47) to the White- Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, 2010, v. 161, p.26- 29.
- GUPTA, A.; FONTANA, A.J.; CROWE, C.; BOLSTORFF, B.; STOUT, A.; DUYNE, S.V.; HOEKSTRA, M.P.; WHICHARD, J.M.; BARRETT, T.J.; ANGULO, F.J. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Newport infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins in the United States. **The Journal of Infectious Diseases**, 2003, v.188, p.1707–16.
- HAMID, H.; ZHAO, L.H.; MA, G.Y.; LI, W.X.; SHI, H.Q.; ZHANG, J.Y.; JI, C.; MA, Q.G. Evaluation of the overall impact of antibiotics growth promoters on broiler health and productivity during the medication and withdrawal period. **Poultry science**, 2019.
- HAMILTON, S., et al. The transcriptional programme of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a key role for tryptophan metabolism in biofilms. **Biomed Central Genomics**, 2009, v.10, p.599.
- HANSEN-WESTER, I.; HENSEL, M. *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. **Microbes and Infection**, 2001, v.3, n.7, p.549-559.
- HARAGA, A.; OHLSON, M.B.; MILLER, S.I. Salmonellae interplay with host cells. **Nature Reviews Microbiology**, 2008, v.6, n.1, p.53-66.
- HASMAN, H.; MEVIUS, D.; VELDMAN, K.; OLESEN, I.; AARESTRUP, F.M. β -Lactamases among extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2005, v.56, p.115–121.
- HASSAN, A.R.H.A.; SALAM, H.S.H.; ABDEL-LATEF, G.K. Serological identification and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates from broiler carcasses and human stools in Beni-Suef, Egypt. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, 2016, v.5, p.202–207.
- HENAO, L.D.; TUROLLA, A.; ANTONELLI, M. Disinfection by-products formation and ecotoxicological effects of effluents treated with peracetic acid: A review. **Chemosphere**, 2018, v.213, p.25-40.
- HENLEY, S.C.; LAUNCHI, N.; QUINLAN, J.J. Survival of *Salmonella* on raw poultry exposed to 10% lemon juice and vinegar washes. **Food Control**, 2018, v.94, p.229-232.
- HENRIQUES, A.R.; FRAQUEZA, M.J. Biofilm-forming ability and biocide susceptibility of *Listeria monocytogenes* strains isolated from the ready-to-eat meat-based food products food chain. **LWT - Food Science and Technology**, 2017, v.81, p.180-187.
- HEREDIA, N.; GARCÍA, S. Animals as sources of food-borne pathogens: A review. **Animal Nutrition**, 2018, v.4, p.250-255.

HERRERO-FRESNO, A.; OLSEN, JE. *Salmonella* Typhimurium metabolism affects virulence in the host: A mini-review. **Food Microbiology**, 2018, v.71, p.98-110.

HU, G-Q., et al. Critical role for *Salmonella* effector SopB in regulating inflammasome activation. **Molecular Immunology**, 2017, v.90, p.280-286.

HUANG, J.; WANG, M.; DING, H.; YE, M.; HU, F.; GUO, Q.; XU, X.; WANG, M. New Delhi metallo- β -lactamase-1 in carbapenem-resistant *Salmonella* strain, China. **Emerging infectious diseases**, 2013, v.19, n.12, p.2049.

HUR, J.; KIM, J.H.; PARK, J.H.; LEE, YJ.; LEE, J.H. Molecular and virulence characteristics of multi-drug resistant *Salmonella* Enteritidis strains isolated from poultry. **The Veterinary Journal**, 2011, v.189, p.306–311.

ICMSF. Microorganisms in foods 5. Microbiological specifications of food pathogens. London, **Blackel Academic & Professional**, 1996, p. 513.

IGLESIAS, M.A.; KRONING, I.S.; DECOL, L.T.; FRANCO, M.B.D.G.; DA SILVA, W.P. Occurrence and phenotypic and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in slaughterhouses in southern Brazil. **Food Research International**, 2017, v.100, p.96-101.

ILYAS, B.; TSAI, C.N.; COOMBES, B.K. Evolution of *Salmonella*-host cell interactions through a dynamic bacterial genome. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, 2017, v.7, p.428.

IÑIGUEZ-MORENO, M.; GUTIÉRREZ-LOMELÍ, M.; GUERRERO-MEDINA, P.J.; AVILA-NOVOA, M.G. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. under mono and dual-species conditions and their sensitivity to cetrimonium bromide, peracetic acid and sodium hypochlorite. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2018, v.49, p.310-319.

ISSENHUTH-JEANJEAN, S., et al. Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, 2014, v.165, n.7, p.526-530.

JACOBY, G. A. AmpC β -lactamases. **Clinical microbiology reviews**, 2009, v. 22, n. 1, p. 161-182.

JARLIER, V.; NICOLAS, M. H.; FOURNIER, G.; PHILIPPON, A. Extended broad- spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer β -lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. **Reviews of Infectious Diseases**, 1988, v. 10, n. 4, p. 867-878.

JOO, H.; OTTO, M. Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. **Chemistry & Biology**, 2012, v. 19, n. 12, p. 1503-13.

KAGAMBÈGA, A.; LIENEMANN, T.; FRYE, J.G.; BARRO, N.; HAUKKA, K. Whole genome sequencing of multidrug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from humans and poultry in Burkina Faso. **Tropical Medicine and Health**, 2018, v.46, p.4.

KANASHIRO, A.M.I.; STOPPA, G.F.Z.; CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C.; CASTRO, A.G.M. Serovars of *Salmonella* spp isolated from broiler chickens and commercial breeders in

diverse regions in Brazil from July 1997 to December 2004. **Brazilian Journal of Poultry Science**, 2005, v.7, n.3, p.195-198.

KAO, C.-Y.; CHEN, C.A.; LIU, Y.F.; WU, H. M.; CHIOU, C.S.; YAN, J.J.; WU, J.J. Molecular characterization of antimicrobial susceptibility of *Salmonella* isolates: First identification of a plasmid carrying *qnrD* or *oqxAB* in Taiwan. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, 2017, v.50, p.214-223.

KAWASAKI, K. Complexity of lipopolysaccharide modifications in *Salmonella enterica*: Its effects on endotoxin activity, membrane permeability, and resistance to antimicrobial peptides. **Food Research International**, 2012, v.45, p.493-501.

KHAN, S.B.; KHAN, M.A.; AHMAD, I.; UR REHMAN, T.; ULLAH, S.; DAD, R.; SULTARI, A.; MEMON, A.M. Phenotypic, genotypic antimicrobial resistance and pathogenicity of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis in poultry and poultry products. **Microbial pathogenesis**, 2019, v.129, p.118-124.

KEMPF, I.; JOUY, E.; CHAUVIN, C. Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2016, v.48, p.598–606.

KITIS, M. Disinfection of wastewater with peracetic acid: A review. **Environment International**, 2004, v.30, p.47– 55.

KOECK, J.L.; ARLET, G.; PHILIPPON, A.; BASMACIOGULLARI, S.; THIEN, H.V.; BUISSON, Y.; CAVALLO, J.D. A plasmid-mediated CMY-2 β -lactamase from an Algerian clinical isolate of *Salmonella senftenberg*. **FEMS Microbiology Letters**, 1997, v.152, n.2, p.255-260.

KÖHLER, A.T.; RODLOFF, A.C.; LABAHN, M.; REINHARDT, M.; TRUYEN, U.; SPECK, S. Efficacy of sodium hypochlorite against multidrug-resistant gram-negative bacteria. **Journal of Hospital Infection**, 2018, v.100, n.3, p.40-46.

KOTHARY, M. H.; BABU, U.S. infective dose of foodborne pathogens in volunteers: A review. **Journal of Food Safety**, 2001, v.21, n.1, p.49–68.

KUMAR, G.D.; WILLIAMS, R.C.; SRIRANGANATHAN, N.; BOYER, R.R.; EIFERT, J.D. Survival of tomato outbreak associated *Salmonella* serotypes in soil and water and the role of biofilms in abiotic surface attachment. **Foodborne Pathogens and Disease**, 2018, v.15, n.9.

KURTZ, J.R.; GOGGINS, J.A.; MCLACHLAN, J.B. *Salmonella* infection: Interplay between the bacteria and host immune system. **Immunology Letters**, 2017, v.190, p.42–50.

LAMAS, A.; PAZ-MENDEZ, A.M.; REGAL, P.; VAZQUEZ, B.; MIRANDA, J.M.; CEPEDA, A.; FRANCO, C.M. Food preservatives influence biofilm formation, gene expression and small RNAs in *Salmonella enterica*. **LWT - Food Science and Technology**, 2018, v.97, p.1–8.

LAMAS, A.; PAZ-MENDEZ, A.M.; REGAL, P.; VAZQUEZ, B.; MIRANDA, J.M.; CEPEDA, A.; FRANCO, C.M. Influence of milk, chicken residues and oxygen levels on biofilm formation on stainless steel, gene expression and small RNAs in *Salmonella enterica*. **Food Control**, 2018, v.90, p.1-9.

LANGSRUD, S.; SIDHU, M.S.; HEIR, E.; HOLCK, A.L. Bacterial disinfectant resistance: A challenge for the food industry. **International Biodeterioration & Biodegradation**, 2003, v.51, n.4, p.283–290.

LAROCK, D.L.; CHAUDHARY, A.; MILLER, S.I. Salmonellae interactions with host processes. **Nature Reviews Microbiology**, 2015, v.13, n.4, p.191–205.

LESCAT, M.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Rapid multiplex polymerase chain reaction for detection of *mcr-1* to *mcr-5* genes. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 2018, v.92, n.4, p.267-269.

LEVY, S. B. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2002, v. 49, n. 1, p. 25-30.

LIASSINE, N.; ASSOUVIE, L.; DESCOMBES, M. C.; TENDON, V. D.; KIEFFER, N.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Very low prevalence of MCR-1/MCR-2 plasmid-mediated colistin resistance in urinary tract Enterobacteriaceae in Switzerland. **International Journal of Infectious Diseases**, 2016, v.51, p.4-5.

LIU, Y. Y.; WANG, Y.; WALSH, T. R.; YI, L. X.; ZHANG, R.; SPENCER, J.; DOI, Y.; TIAN, G.; DONG, B.; HUANG, X.; YU, L. F.; GU, D.; REN, H.; CHEN, X.; LV, L.; HE, D.; ZHOU, H.; LIANG, Z.; LIU, J. H.; SHEN, J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, 2016, v.16, n.2, p.161-168.

LIU, Y.Y.; WANG, Y.; WALSH, T.R.; YI, L.X.; ZHANG, R.; SPENCER, J.; DOI, Y.; TIAN, G.; DONG, B.; HUANG, X.; YU, L.F.; GU, D.; REN, H.; CHEN, X.; LV, L.; HE, D.; ZHOU, H.; LIANG, Z.; LIU, J.H.; SHEN, J. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, 2016, v.16, n.2, p.161–8.

LUUKKONEN, T.; HEYNINCK, T.; RAMO, J.; LASSI, U. Comparison of organic peracids in wastewater treatment: Disinfection, oxidation and corrosion. **Water Research**, 2015, v.85, p.275-285.

MACHADO, T.R.M.; MALHEIROS, P.S.; BRANDELLI, A.; TONDO, E.C. The resistance of *Salmonella* strains to the biocides peracetic acid, quaternary ammonium and sodium hypochlorite. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, 2010, v.69, n.4, p.475-81.

MADEC, JY.; HAENNI, M.; NORDMANN, P.; POIREL, L. ESBL/AmpC- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in animals: A threat for humans? **Clinical Microbiology and Infection**, 2017, v.23, n.11, p.826-833.

MAH, T.F.; O'TOOLE, G.A. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. **Trends Microbiology**, 2011, v.9, p.34–39.

MAJOWICZ, S.E.; MUSTO, J.; SCALLAN, E.; ANGULO, F.J.; KIRK, M.; O'BRIEN, S.J.; JONES, T.F. The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. **Clinical Infectious Diseases**, 2010, v.50, n.6, p.882-889.

MATEVA, G.; PEDERSEN, K.; SORENSEN, G.; ASSEVA, G.; DASKALOV, H.; PETROV, P.; KANTARDJIEV, T.; ALEXANDAR, I.; LÖFSTRÖM, C. Use of multiple-locus variable-

number of tandem repeats analysis (MLVA) to investigate genetic diversity of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium isolates from human, food, and veterinary sources. **Microbiology Open**, 2018, v.7, p.1-7.

MERINO, L.; PROCURA, F.; TREJO, F.M.; BUENO, D.J.; GOLOWCZY, M.A. Biofilm formation by *Salmonella* sp. in the poultry industry: Detection, control and eradication strategies. **Food Research International**, 2017.

MEZAL, E.H.; STEFANOVA, R.; KHAN, A.A. Isolation and molecular characterization of *Salmonella enterica* serovar Javiana from food, environmental and clinical samples. **International Journal of Food Microbiology**, 2013, v.164, p.113-118.

MIR, I.A.; KASHYAP, S.K.; MAHERCHANDANI, S. Isolation, serotype diversity and antibiogram of *Salmonella enterica* isolated from different species of poultry in India. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 2015, v.5, n.7, p.561–567.

MIRIAGOU, V.; TASSIOS, P.T.; LEGAKIS, N.J.; TZOUVELEKIS, L.S. Expanded-spectrum cephalosporin resistance in non-typhoid *Salmonella*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2004, v.23, p.547–555.

MOHAMMED, M. Phage typing or CRISPR typing for epidemiological surveillance of *Salmonella* Typhimurium? **BMC Research Notes**, 2017, v.10, p.578.

MORETRO, T.; LANGSRUD, S. Residential bacteria on surfaces in the food industry and their implications for food safety and quality. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 2018, v.16, n.5, p.1022-41.

MOURA, M.S.; OLIVEIRA, R.P.; MELO, R.T.; MENDONÇA, E.P.; FONSECA, B.B.; ROSSI, D.A. Virulence genes and genetic diversity in *Salmonella* spp. isolated from samples of swine origin. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2014, v.66, n.5, p.1367-1375.

MOURA, Q.; FERNANDES, M.R.; SILVA, K.C.; MONTE, D.F.; ESPOSITO, F.; DROPA, M.; NORONHA, C.; MORENO, A.M.; LANDGRAF, M.; NEGRÃO, F.J.; LINCOPAN, N. Virulent nontyphoidal *Salmonella* producing CTX-M and CMY-2 β -lactamases from livestock, food and human infection, Brazil. **Virulence**, 2018, v.9, n.1, p.281-286.

MUNOZ-PRICE, L. S.; POIREL, L.; BONOMO, R. A.; SCHWABER, M. J.; DAIKOS, G. L.; CORMICAN, M.; CORNAGLIA, G.; GARAU, J.; GNIADKOWSKI, M.; HAYDEN, M. 2179 K.; KUMARASAMY, K.; LIVERMORE, D. M.; MAYA, J. J.; NORDMANN, P.; PATEL, J. B.; PATERSON, D. L.; PITOUT, J.; VILLEGAS, M. V.; WANG, H.; WOODFORD, N.; QUINN, J. P. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **The Lancet Infectious Diseases**, 2013 v. 13, p. 785-796.

NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Tentative Standards**. Waive: NCCLS, Document M31-T, 1997. 64p.

NI, P.; XU, Q., YIN, Y., LIU, D., ZHANG, J., WU, Q., TIAN, P., SHI, X.; WANG, D. Prevalence and characterization of *Salmonella* serovars isolated from farm products in Shanghai. **Food Control**, 2018, v.85, p.269-275.

NIETO, P.A.; PARDO-ROA, C.; SALAZAR-ECHEGARAI, F.J.; TOBAR, H.E.; CORONADO-ARRAZOLA, I.; RIEDEL, C.A.; KALERGIS, A.M.; BUENO, S.M. New insights about excisable pathogenicity islands in *Salmonella* and their contribution to virulence. **Microbes and Infection**, 2016, v.18, p.302-309.

NORDMANN, P.; POIREL, L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, 2014, v.20, p.821–830.

OLIVEIRA, D. C. V.; FERNANDES JUNIOR, A.; KANENO, R.; SILVA, M.G.; ARAUJO JUNIOR, J.P.; SILVA, N.C.C.; RALL, V. L. M. Ability of *Salmonella* spp. to produce biofilm is dependent on temperature and surface material. **Foodborne Pathogens and Disease**, 2014, v.11, n.6, p.478-483.

PARK, B.; SEO, Y.; EADY, M.; YOON, S.C.; HINTON, A.; LAWRENCE, K.S.; GAMBLE, G.R. Classification of *Salmonella* serotypes with hyperspectral microscope imagery. **Annals of Clinical Pathology**, 2017, v.5, p.1108.

PATERSON, D.L. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. **American Journal of Infection Control**, 2006, v.34, p.20-28.

PAUL, N. G. ; SULLIVAN, T. S. ; SHAH, D.H. Differences in antimicrobial activity of chlorine against twelve most prevalent poultry-associated *Salmonella* serotypes. **Food Microbiology**, 2017, v. 64, p. 202–209.

PATHAK, P.; JAISHI, N.; YADAV, B.K.; SHAH, P.K. Prevalence of extended spectrum beta lactamases (ESBL) and metallo beta lactamases (MBL) mediated resistance in Gram negative bacterial pathogens. **Microbiology Tribhuv**, 2017, v.4, n.1, p.49.

POIREL, L.; KIEFFER, N.; FERNANDEZ-GARAYZABAL, J.F.; VELA, A.I.; LARPIN, Y.; NORDMANN, P. MCR-2-mediated plasmid-borne polymyxin resistance most likely originates from *Moraxella pluranimalium*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2017, v.72, p.2947–9.

POIREL, L.; WALSH, T. R.; CUVILLIER, V.; NORDMANN, P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 2011, v.40, n. 1, p.119-123.

POKHAREL, B.M.; KOIRALA, J.; DAHAL, R.K.; MISHRA, S.K.; KHADGA, P.K.; TULADHAR, N.R. Multidrug-resistant and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Salmonella enterica* (serotypes Typhi and Paratyphi A) from blood isolates in Nepal: surveillance of resistance and a search for newer alternatives. **International Journal of Infectious Diseases**, 2006, v.10, p.434-438.

POWERS, R. A. Structural and functional aspects of extended-spectrum AmpC cephalosporinases. **Current Drug Targets**, 2016, v. 17, n. 9, p. 1051-60.

PROCURA, F.; BUENO, D.J.; BRUNO, S.B.; ROGÉ, A.D. Prevalence, antimicrobial resistance profile and comparison of methods for the isolation of *Salmonella* in chicken liver from Argentina. **Food Research International**, 2017, v.65, n.1, p.95-101.

- PUGA, C.; SANJOSE, C.; ORGAZ, B. Biofilm development at low temperatures enhances *Listeria monocytogenes* resistance to chitosan. **Food Control**, 2016, v.65, p.143-151.
- QIAO, J.; ALALI, W.Q.; LIU, J.; WANG, Y.; CHEN, S.; CUI, S.; YANG, B. Prevalence of virulence genes in extended-spectrum β -lactamases (ESBLs)-producing *Salmonella* in retail raw chicken in China. **Journal of Food Science**, 2018, v.83, n.4, p.1048-52.
- QIAO, J.; ZHANG, Q.; ALALI, W.Q.; WANG, J.; MENGA, L.; XIAO, Y.; YANG, H.; CHEN, S.; CUI, S.; YANG, B. Characterization of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs)-producing *Salmonella* in retail raw chicken carcasses. **International Journal of Food Microbiology**, 2017, v.248, p.72–81.
- QUESADA, A.; UGARTE-RUIZ, M.; IGLESIAS, M.R.; PORRERO, M.C.; MARTÍNEZ, R.; FLOREZ-CUADRADO, D.; CAMPOS, M.J.; GARCÍA, M.; PÍRIZ, S.; SÁEZ, J.L.; DOMÍNGUEZ, L. Detection of plasmid mediated colistin resistance (MCR-1) in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine in Spain. **Research in Veterinary Science**, 2016, v.105, p.134–135.
- RAHMAN, H.S.; OTHMAN, H.H. *Salmonella* infection: The common cause of human food poisoning. **Progress in Bioscience and Bioengineering**, 2017, v.1, n.1, p.5–10.
- RAHMAN, S.U.; ALI, T.; ALI, I.; KHAN, N.A.; HAN, B.; JIAN GAO, J. The growing genetic and functional diversity of extended spectrum beta-lactamases. **BioMed Research International**, 2018, v.2018, p.9519718.
- REYES, A.W.B.; HONG, T.G.; HOP, H.T.; ARAYAN, L.T.; HUY, T.X.N.; MIN, W.; LEE, H.J.; LEE, K.S.; KIM, S. The in vitro and in vivo protective effects of tannin derivatives against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. **Microbial Pathogenesis**, 2017, v.109, p.86-93.
- RIDGE, Y.; LANDINI, P.; THOMPSON, A. High throughput screening of a collection of known pharmacologically active small compounds for inhibitors of *Salmonella* invasion and intracellular replication. **Journal of Applied Microbiology**, 2018, v.125, n.3, p.724-730.
- ROSCHANSKI, N.; FISCHER, J.; FALGENHAUER, L.; PIETSCH, M.; GUENTHER, S.; KREIENBROCK, L.; CHAKRABORTY, T.; PFEIFER, Y.; GUERRA, B.; ROESLER, U.H. Retrospective analysis of bacterial cultures sampled in german chicken-fattening farms during the years 2011–2012 revealed additional vim-1 carbapenemase-producing *Escherichia coli* and a serologically rough *Salmonella enterica* serovar Infantis. **Frontiers in Microbiology**, 2018, v.9, p.538.
- ROSSI, F.; ANDREAZZI, D.B. Resistência Bacteriana – Interpretando o Antibiograma. 1ª ed. **Atheneu**, 2006.
- ROSSONI, E.M.M.; GAYLARDE, C.C. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitizing agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. **International Journal of Food Microbiology**, 2000, v.61, p.81–85.
- SACCOL, ALF.; GIACOMELLI, SC.; MESQUITA, MO.; CASTRO, AKF.; SILVA JR., EA.; HECKTHEUER, LHR. Sanitary legislation governing Food Services in Brazil. **Food Control**, 2015, v.52, p.27-33.

SAEED, A.A.; HASOON, M.F.; MOHAMMED, M.H. Isolation and molecular identification of *Salmonella* Typhimurium from chicken meat in Iraq. **Journal of World's Poultry Research**, 2013, v.3, p.63–7.

SALEM, W.M.; EL-HAMED, S.D.M.W.; SAYED, W.F.; ELAMARY, R.B. Alterations in virulence and antibiotic resistant genes of multidrug resistant *Salmonella* serovars isolated from poultry: The bactericidal efficacy of *Allium sativum*. **Microbial Pathogenesis**, 2017, v.108, p.91-100.

SANCHEZ-MALDONADO, A. F., et al. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from two pork processing plants in Alberta, Canada. **International Journal of Food Microbiology**, 2017, v. 241, p. 49-59.

SANTIAGO, G.S.; DA MOTTA, C.C.; BRONZATO, G.F.; GONÇALVES, D.; DE SOUZA, M.M.S.; COELHO, I.S.; FERREIRA, H.N.; OLIVEIRA COELHO, S.M.O. Revisão: Produção de β -lactamases do tipo AmpC em Enterobacteriaceae. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, 2016, v.38, p.17-30.

SARJIT, A.; DYKES, G.A. Trisodium phosphate and sodium hypochlorite are more effective as antimicrobials against *Campylobacter* and *Salmonella* on duck as compared to chicken meat. **International Journal of Food Microbiology**, 2015, v.203, p.63–69.

SARJIT, A.; DYKES, G.A. Antimicrobial activity of trisodium phosphate and sodium hypochlorite against *Salmonella* biofilms on abiotic surfaces with and without soiling with chicken juice. **Food Control**, 2017, v.73, p.1016-22.

SCHILL, F.; ABDULMAWJOOD, A.; KLEINA, G.; REICH, F. Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and AmpC β -lactamase producing Enterobacteriaceae in fresh pork meat at processing level in Germany. **International Journal of Food Microbiology**, 2017, v.257, p.58–66.

SCHMIDT, H.; HENSEL, M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. **Clinical Microbiology Reviews**, 2004, v.19, n.1, p.14-56.

SHAH, D.H., et al. Cell invasion of poultry-associated *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isolates is associated with pathogenicity, motility and proteins secreted by the type III secretion system. **Microbiology**, 2011, v.157, p.1428-45.

SHI, H.; ZHOU, X.; ZOU, W.; WANG, Y.; LEI, C.; XIANG, R.; ZHOU, L.; LIU, B.; ZHANG, A.; WANG, H. Co-occurrence of biofilm formation and quinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium carrying an IncHI2-type oqxAB-positive plasmid. **Microbial Pathogenesis** 2018, v.123, p.68-73.

SHIPPY, D.C.; BEARSON, B.L.; HOLMAN, D.B.; BRUNELLE, B.W.; ALLEN, H.K.A.; BEARSON, S.M.D. Porcine Response to a Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* serovar I 4,[5],12:i:- Outbreak Isolate. **Foodborne Pathogens and Disease**, 2018, v.15, n.5, p.253-561.

SILVA, I.D.; CARELI, R.T.; LIMA, J.C.; ANDRADE, N.J. Effectiveness of cleaning and sanitizing procedures in controlling the adherence of *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella* Enteritidis, and *Staphylococcus aureus* to domestic kitchen surfaces. **Ciência e Tecnologia Alimentar**, 2010, v.30, n.1, p.231-236.

SILVA, M.C.D.; RAMALHO, L.S.; FIGUEIREDO, E.T. *Salmonella* sp em ovos e carcaças de frangos “in natura” comercializadas em Maceió, AL. **Higiene Alimentar**, 2004, v.18, n.121, p.80-84.

SINGH, P.; HUNG, Y-C.; QI, H. Efficacy of peracetic acid in inactivating foodborne pathogens on fresh produce surface. **Journal of Food Science**, 2018, v.83, n.2, p.432-439.

SKYBERG, J.A., LOGUE, C.M., NOLAN, L.K. Virulence genotyping of *Salmonella* spp. with multiplex PCR. **Avian Diseases**, 2006, v.50, p.77-81.

SOLANO, C., et al. Genetic analysis of *Salmonella* Enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose. **Molecular Microbiology**, 2002, v.43, p.793–808.

SREY, S.; JAHID, I. K.; HA, S.-D. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. **Food Control**, 2013, v. 31, p. 572-585.

STEENACKERS, H.; HERMANS, K.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S.C.J. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. **Food Research International**, 2012, v.45, p.502–531.

STEININGER, C.G.; HARRISON, M.A.; BERRANG, M.E. Application of antimicrobial treatment to whole carcasses during prechill can improve microbial quality of broiler parts. **Journal of Food Safety**, 2017, v.38, n.2, p.e12434.

STEPANOVIĆ, S.; ĆIRKOVIĆ, I.; MIJAC, V.; SVABIĆ-VLAHOVIĆ, M. Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. **Food Microbiology**, 2003, v.20, p.339-343.

SUN, J.; ZHANG, H.; LIU, YH.; FENG, Y. Towards understanding MCR-like colistin resistance. **Trends in Microbiology**, 2018, v.26, n.9, p.794-808.

SUN, P.; ZHANG, T.; MEJIA-TICKNER, B.; ZHANG, R.; CAI, M.; HUANG, CH. Rapid disinfection by peracetic acid combined with UV irradiation. **Environmental Science & Technology Letters**, 2018, v.5, n.6, p.400-404.

SUN, S.; NEGREA, A.; RHEN, M.; ANDERSSON, D.I. Genetic analysis of colistin resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2009, v.53, n.6, p.2298-2305.

TIPPELSKIRCH, P.V.; GÖLZ, G.; PROJAHN, M.; DAEHRE, K.; FRIESE, A.; ROESLER, U.; ALTER, T.; ORQUERA, S. Prevalence and quantitative analysis of ESBL and AmpC beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in broiler chicken during slaughter in Germany. **International Journal of Food Microbiology**, 2018, v.281, p.82–89.

TRABULSI, L.B.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 6a ed. **Atheneu**, 2015.

TRIMOULINARD, A.; BERAL, M.; HENRY, I.; ATIANA, L.; PORPHYRE, V.; TESSIER, C.; LECLERCQ, A.; CARDINALE, E. Contamination by *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and *Listeria* spp. of most popular chicken- and pork-sausages sold in Reunion Island. **International Journal of Food Microbiology**, 2017, v.250, p.68–74.

TRIMOULINARD, A.; BERAL, M.; HENRY, I.; ATIANA, L.; PORPHYRE, V.; TESSIER, C.; LECLERCQ, A.; CARDINALE, E. Contamination by *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and *Listeria* spp. of most popular chicken- and pork-sausages sold in Reunion Island. **International Journal of Food Microbiology**, 2017, v.250, p.68–74.

TURKI, Y., et al. Biofilm formation, virulence gene and multi-drug resistance in *Salmonella* Kentucky isolated in Tunisia. **Food Research International**, 2012, v.45, p.940–946.

VERBRUGGHE, E.; DHAENENS, M.; LEYMAN, B.; BOYEN, F.; SHEARER, N.; PARYS, A.V.; HAESSENDONCK, R.; BERT, W.; FAVOREEL, H.; DEFORCE, D.; THOMPSON, A.; HAESBROUCK, F.; PASMANS, F. Host stress drives *Salmonella* recrudescence. **Scientific Reports**, 2016, v.6, p.20849.

VISVALINGAM, J.; HOLLEY, R.A. Evaluation of chlorine dioxide, acidified sodium chlorite and peroxyacetic acid for control of *Escherichia coli* O157:H7 in beef patties from treated beef trim. **Food Research International**, 2018, v.103, p.295–300.

VOSS-RECH, D.; VAZ, C.S.; ALVES, L.; COLDEBELLA, A.; LEAO, J.A.; RODRIGUES, D.P.; BACK, A. A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. **Poultry Science**, 2015, v.94, n.3, p.433-441.

WAGHMARE, R.B.; ANNAPURE, U.S. Integrated effect of sodium hypochlorite and modified atmosphere packaging on quality and shelf life of fresh-cut cilantro. **Food Packaging and Shelf Life**, 2015, v.3, p.62–69.

WAJID, M.; AWAN, A.B.; SALEEMI, M.K.; WEINREICH, J.; SCHIERACK, P.; SARWAR, Y.; ALI, A. Multiple drug resistance and virulence profiling of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Enteritidis from poultry farms of Faisalabad, Pakistan. **Microbial Drug Resistance**, 2018, v.25, n.1, p.133-142.

WALSH, R.J.; WHITE, B.; HUNKER, L.; LEISHMAN, O.; HILGREN, J.; KLEIN, D. Peracetic acid and hydrogen peroxide post-dip decay kinetics on red meat and poultry. **Food Protection Trends**, 2018, v.38, n.2, p.96–103.

WANG, H.; ZHANG, X.; DONG, Y.; XU, X.; ZHOU, G. Insights into the transcriptome profile of mature biofilm of *Salmonella* Typhimurium on stainless steels surface. **Food Research International**, 2015, v.77, p.378-384.

WHANG, Y.P.; LIA, L.; SHENA, J.Z.; YANGB, F.J.; WU, Y.W. Quinolone-resistance in *Salmonella* is associated with decreased mRNA expression of virulence genes *invA* and *avrA* growth and intracellular invasion and survival. **Veterinary Microbiology**, 2009, v. 133, n.4, p.328-334.

XAVIER, B.B.; LAMMENS, C.; RUHAL, R.; KUMAR-SINGH, S.; BUTAYE, P.; GOOSSENS, H.; MALHOTRA-KUMAR, S. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. **Euro Surveill**, 2016, v.21, n.27.

YANG, Y.; MIKS-KRAJNIK, M.; ZHENG, Q.; LEE, SB.; LEE, SC.; YUK, HG. Biofilm formation of *Salmonella* Enteritidis under food-related environmental stress conditions and its subsequent resistance to chlorine treatment. **Food Microbiology**, 2016, v.54, p.98-105.

YEH, Y.; DE MOURA, F.H.; BROEK, K.V.D.; DE MELLO, A.S. Effect of ultraviolet light, organic acids, and bacteriophage on *Salmonella* populations in ground beef. **Meat Science**, 2018, v.139, p.44–48.

YIN, B.; ZHU, L.; ZHANG, Y.; DONG, P.; MAO, Y.; LIANG, R.; NIU, L.; LUO, X. The characterization of biofilm formation and detection of biofilm-related genes in *Salmonella* isolated from beef processing plants. **Foodborne Pathogens and Disease**, 2018, v.15, n.10.

YIN, W.; LI, H.; SHEN, Y.; LIU, Z.; WANG, S.; SHEN, Z.; RONG, Z.; TIMOTHY, R.W.; JIANZHONG, S.; YANG, W. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. **MBio**, 2017, v.8, n.3, p. e00543-17.

ZHANG, K.; RIBA, A.; NIETSCHKE, M.; TOROW, N.; REPNIK, U.; TZ, A.P.; FULDE, M.; DUPONT, A.; HENSEL, M.; HORNEF, M. Minimal SPII-T3SS effector requirement for *Salmonella* enterocyte invasion and intracellular proliferation in vivo. **PLoS Pathogens**, 2018, v. 14, n. 3, p.1006925.

ZHAO, W. H.; HU, Z. Q. Epidemiology and genetics of CTXM extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, 2013 v. 39, n. 1, p. 79-101.

ZHAO, X.; ZHAO, F.; WANG, J.; ZHONG, N. Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. **Royal Society of Chemistry Advances**, 2017, v.7, p.36670-83.

ZIECH, R. E.; PERIN, A.P.; LAMPUGNANI, C.; SERENO, M. J.; VIANA, C.; SOARES, V.M.; PEREIRAC, J.G.; NOGUEIRAPINTO, J.P.A.N.; BERSOT, L.S. Biofilm-producing ability and tolerance to industrial sanitizers in *Salmonella* spp. isolated from Brazilian poultry processing plants. **LWT-Food Science and Technology**, 2016, v.68, p.85-90.

ZOGAJ, X.; NIMTZ, M.; ROHDE, M.; BOKRANZ, W.; RÖMLING, U. The multicellular morphotypes of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. **Molecular Microbiology**, 2000, v.39, p.1452-63.