

TRANSFERÊNCIA DE *Salmonella* Enteritidis POR CONTAMINAÇÃO CRUZADA E FORMAÇÃO DE BIOFILME EM DIFERENTES SUPERFÍCIES DE CORTE.

STÉFANI THAIS ALVES DANTAS

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus 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.

Vera Lúcia Mores Rall

**BOTUCATU-SP
2014**



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

TRANSFERÊNCIA DE *Salmonella* Enteritidis POR
CONTAMINAÇÃO CRUZADA E FORMAÇÃO DE
BIOFILME EM DIFERENTES SUPERFÍCIES DE CORTE.

STÉFANI THAIS ALVES DANTAS

VERA LÚCIA MORES RALL

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus 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.

Vera Lúcia Mores Rall

**BOTUCATU-SP
2014**

Esse trabalho é dedicado aos meus pais (Pedro e Vânia), aos meus irmãos (Joicy e Davi) e aos amigos que estiverem presentes torcendo e me apoiando em mais uma etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos...

Á Deus por estar comigo em todas as fases da minha vida, dando forças para que eu continuasse a seguir em frente, por me capacitar para o desenvolvimento desse trabalho e pelas pessoas maravilhosas que Ele colocou em meu caminho;

Á minha família que é o alicerce da minha vida, que sempre me apoiou, incentivou e me deu suporte em tudo que precisei, sem vocês nada disso teria acontecido;

Á minha mãe pelo amor incondicional que sempre dedicou a mim, pelos conselhos e por me apoiar nos momentos mais difíceis;

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Vera Lúcia Mores Rall, por acreditar na minha capacidade, pelos ensinamentos valiosos e pela amizade no decorrer desses meses;

Aos meus amigos de laboratório, Ana Claudia, Bruna L., Bruna R., Érika, Ivana, Lívia, Mirella, Nathalia, Paulo e Ricardo, pela amizade, companheirismo e por proporcionarem momentos únicos e inesquecíveis;

Aos amigos Armando Tadeo (Caracas), Caroline Zavatte, Elisângela (Dan), Fabi, Flávia (Tijuro), Heloisa (K-lúnia), Isabella (Lost), Luciane (Hã?), Moniki e Natália (Tops), por toda cumplicidade, todos os momentos compartilhados e por tornarem meus dias em Botucatu mais leves e alegres;

Ao Rodrigo por toda paciência e ajuda prestada durante a elaboração dessa dissertação;

A todos os demais amigos que de certa forma estiveram presentes me apoiando e ajudando durante todos esses meses;

Aos professores, discentes e funcionários do Departamento de Microbiologia e

Imunologia;

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa
de mestrado concedida;*

*À banca examinadora, Prof. Dr. José Paes de Almeida Nogueira Pinto e Prof. Dr.
Rodrigo Tavanelli Hernandes por aceitarem o convite e pelas correções realizadas;*

*E a todos que de alguma forma contribuíram para que eu concretizasse mais essa
etapa.*

EPÍGRAFE

"Se alguma coisa importa, tudo importa. Como você é importante, tudo o que faz é importante. Todas as vezes que você perdoa, o universo muda, cada vez que estende a mão e toca um coração ou uma vida, o mundo se transforma; a cada gentileza e serviço, visto ou não visto, meus propósitos são realizados e nada jamais será igual."

(William P. Young - A Cabana)

Sumário

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUÇÃO	3
1.1. <i>Salmonella</i> spp.	5
1.2. <i>Salmonella</i> e a contaminação cruzada.....	8
1.3. Produção de biofilme	10
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo geral.....	15
2.2. Objetivos específicos.....	15
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16
CAPÍTULO 1	25
RESUMO	27
1. INTRODUÇÃO	28
2. MATERIAL E MÉTODOS	30
2.1. Cepas de <i>Salmonella</i>	30
2.2. Aquisição do frango para inoculação artificial das superfícies de corte	30
2.3. Detecção de <i>Salmonella</i> pela metodologia tradicional.....	30
2.4. Detecção de <i>Salmonella</i> pela PCR.....	31
2.5. PCR para a pesquisa dos genes produtores de biofilme de <i>Salmonella</i>	32
2.6. Teste de verificação de contaminação cruzada, sem higienização.....	32
2.7. Teste de verificação de contaminação cruzada, após higienização	34
2.8. Produção e quantificação de biofilme	34
2.8.1. Preparo das placas	34
2.8.2. Preparo da cultura e inoculação na placa	34
2.8.3. Quantificação da produção de biofilme	35
2.9. Análise Estatística	35
3. RESULTADOS	36
3.1. Pesquisa dos genes produtores de biofilme.....	36
3.2. Recuperação de <i>S. Enteritidis</i> de superfícies de corte antes e após higienização.....	37
3.3. Contaminação cruzada de <i>S. Enteritidis</i> para pepinos, através de superfícies de corte antes e após higienização	37
3.4. Avaliação da produção de biofilme.....	38
3.5. Quantificação biofilme.....	41
4. DISCUSSÃO	42
5. CONCLUSÃO	47

RESUMO

A contaminação cruzada é um dos principais fatores que contribuem para os surtos de doenças de origem alimentar. Estima-se que até 60% dos casos de doenças transmitidas por alimentos estejam relacionados às práticas inadequadas, como a contaminação cruzada envolvendo superfícies de corte, onde a carne de frango crua é manipulada concomitantemente a outros alimentos. Dentre os micro-organismos responsáveis por causar doenças de origem alimentar, destaca-se *Salmonella* spp., sendo o sorovar *S. Enteritidis* o mais envolvido nos casos de infecções humanas além de ser reconhecida pela sua capacidade de aderir, colonizar e formar biofilme em superfícies de contato com alimentos. O biofilme permite que as bactérias se desenvolvam e cresçam aderidas a superfícies conferindo resistência aos processos de higienização, podendo causar contaminação durante o preparo dos alimentos. Assim, 10 cepas de *S. Enteritidis* foram utilizadas para testes de contaminação cruzada entre três superfícies de corte (plástico, madeira e vidro) e pepinos antes e depois da higienização. Além disso, essas cepas foram avaliadas quanto a sua capacidade de formar biofilme em materiais hidrofóbicos (madeira e plástico) e hidrofílicos (vidro). Quando as superfícies testadas não foram higienizadas houve a recuperação das células bacterianas de todas as superfícies e, depois, em todos os pepinos em contato com essas superfícies. Em relação às superfícies de corte higienizadas, o vidro foi o material que apresentou a menor recuperação do patógeno e a menor ocorrência de contaminação cruzada para pepinos. Entre as 10 cepas testadas, três (30%) não foram capazes de produzir biofilme em nenhuma das superfícies analisadas, mesmo possuindo os genes *csgD* e *adrA*. A maior porcentagem de produção de biofilme ocorreu na madeira e no plástico (60% e 40%, respectivamente) seguido do vidro (10%), mostrando que a bactéria adere melhor em materiais hidrofóbicos. Pode-se concluir que as superfícies de corte representam um ponto crítico quanto à contaminação cruzada, principalmente, quando não higienizadas corretamente. *S. Enteritidis* foi capaz de formar biofilme nos diferentes materiais que compõe as superfícies de corte, sendo o vidro o material com o menor número de cepas produtoras de biofilme.

Palavras chave: biofilme, contaminação cruzada, superfícies de corte

ABSTRACT

The cross-contamination is one of the main factors which contribute to foodborne outbreak. It is estimated that about 60% of foodborne diseases are related to the inappropriate practices, such as cross-contamination involving cutting surface, where the raw chicken is manipulated concurrently to other food. Among the microorganisms responsible by causing foodborne diseases, we can highlight the *Salmonella* spp., being the serovar *Salmonella* Enteritidis the one most involved in cases of infection in humans besides being recognized by its capacity to adhere, colonize and biofilm formation on surfaces of contact with food. The biofilm allows the bacteria to develop and grow adhered to surfaces offering resistance to the hygienic process, being able to cause contamination during the food prepare. Thus, 10 strains of *S. Enteritidis* were used to test the cross-contamination among three cutting surfaces (plastic, wood and glass) and cucumbers before and after hygiene. Besides, these strains were evaluated to their capacity to form biofilm in hydrophobic materials (wood and plastic) and hydrophilic (glass). When the tested surfaces were not sanitized there was the recovering of *Salmonella* on all the surfaces and in the cucumbers which had contact with these surfaces. Related to the cutting surfaces under sanitized process, the glass was the material with less recovering of the pathogen and the lower occurrence of cross contamination with the cucumbers. Among the 10 strains, three (30%) were not able to produce biofilm in any surface, even in a presence of *csgD* and *adrA* genes. The largest percentage of biofilm production occurred on the wood and plastic (60% and 40%, respectively) followed by glass (10%), showing the bacteria adhere better in hydrophobic material. It is possible to conclude that the cutting surfaces represent a critical point in cross-contamination, mainly when they weren't sanitized. *S. Enteritidis* was able to form biofilm in different cutting surface materials. The glass was the material with the lowest number of strains biofilm producers.

Key words: biofilm, cross-contamination, cutting surface

1. INTRODUÇÃO

As transformações sociais no mundo atual provocaram também mudanças significativas na alimentação, no preparo das refeições e nos hábitos alimentares dos seres humanos. Essas mudanças foram ocasionadas por fatores como a elevação do nível de vida e de educação e o acesso mais amplo da população ao lazer. (DEON et al., 2012). Além disso, devido à entrada das mulheres no mercado de trabalho, a dificuldade de locomoção do local de trabalho até a residência e a falta de tempo para o preparo dos alimentos, fez com que a escolha por refeições fora de casa tenha crescido (MESSIAS, 2007). De acordo com a Associação Brasileira das Empresas de Refeições Coletivas - ABERC (2013), 16 milhões de pessoas fizeram refeições fora de casa em 2011 e em 2012, foram 18 milhões.

As doenças de origem alimentar (DOA) continuam aumentando em todo o mundo, principalmente pela manipulação inadequada dos alimentos pelo próprio consumidor e por manipuladores que não estão informados sobre esse perigo. O maior interesse pelo consumo dos chamados "alimentos naturais", que incluem alimentos de origem animal consumidos crus ou mal cozidos, a grande população de pessoas imunodeprimidas, a ocorrência de bactérias emergentes e o aumento contínuo da população idosa podem levar a um aumento do número de surtos (MESSIAS, 2007).

Nas últimas décadas, a qualidade e segurança alimentar tem sido uma preocupação mundial. Algumas doenças mais recentes e mais mediáticas como a “doença da vaca louca” e a “gripe aviária” despertaram a atenção da opinião pública e do consumidor para este problema, desde a cadeia de produção, a manipulação dos alimentos e sua apresentação final ao consumidor. As doenças de origem alimentar causam efeitos deletérios a nível coletivo e individual pelos custos econômicos que essas imputam aos indivíduos, famílias, sistemas de saúde, setor produtivo e sociedade (ALVES, 2012).

A cada ano, milhões de pessoas são afetadas por doenças de origem alimentar, sendo um dos maiores problemas de saúde pública no mundo contemporâneo (WHO, 2000; SREY, et al., 2013). Segundo o Center for Disease Control and Prevention (Centro de Controle de Doenças e Prevenção – CDC, 2011), somente nos Estados Unidos, anualmente, um em cada seis americanos (isto é, 48 milhões de pessoas) fica doente, 128.000 são hospitalizados e 3.000 morrem, por doenças de origem alimentar. No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde (MS, 2009), ocorreram cerca de

95.000 internações entre 1999-2004, com 1.580 óbitos, a um custo de 46 milhões de reais.

Os sintomas mais comuns de DOA incluem náusea, vômitos, diarreia, diarreias persistentes e febre. Na maioria dos casos, a duração dos sintomas pode variar de poucas horas até mais de cinco dias, dependendo do estado físico do paciente, do tipo de micro-organismo ou toxina ingerida ou da concentração bacteriana. Em casos mais graves, pode ocorrer desidratação grave, diarreia sanguinolenta, insuficiência renal aguda e insuficiência respiratória (OLIVEIRA et al., 2010).

A maioria dos surtos tem sido relacionada à ingestão de alimentos com boa aparência, sabor e odor normais, sem qualquer alteração organoléptica visível. Isso ocorre porque a dose infectante de patógenos alimentares geralmente é menor que a quantidade de micro-organismos necessária para degradar os alimentos. Esses fatos dificultam a rastreabilidade dos alimentos causadores de surtos, uma vez que os consumidores afetados dificilmente conseguem identificar sensorialmente os alimentos fonte da DOA. Alimentos com características organolépticas alteradas dificilmente causam surtos alimentares, uma vez que não são consumidos devido à sensação repulsiva que causam aos consumidores. Nessas condições, a contaminação microbiana é elevada, muitas vezes ultrapassando números da ordem de 10^8 UFC/g de alimento (OLIVEIRA et al., 2010).

Boa parte dos surtos alimentares resulta da associação entre o consumo de alimentos contaminados através da manipulação inadequada e/ou conservação ou distribuição em condições impróprias (GREIG; RAVEL, 2009). Alimentos contaminados por pequenas quantidades de micro-organismos podem não causar surtos, porém se forem conservados em condições que permitam a multiplicação desses agentes microbianos, as chances para a ocorrência de surtos aumentam significativamente (OLIVEIRA et al., 2010).

As mãos dos manipuladores de serviços de alimentação podem ser veículos na disseminação de doenças de origem alimentar, devido higiene pessoal inadequada ou contaminação cruzada (BAS et al., 2006). Micro-organismos patogênicos podem entrar na cadeia alimentar em diferentes etapas do processo. Como são altamente versáteis, podem se adaptar ao ambiente produtivo, conseguindo sobreviver, multiplicar e produzir toxinas, se forem enterotoxigênicas (HAVELAAR et al., 2010).

Pode-se definir como um alimento seguro aquele cujos constituintes ou contaminantes que causam perigo à saúde estão ausentes ou em concentrações abaixo

do limite de risco (SOUSA et al., 2006). É impossível eliminar todos os micro-organismos de um ambiente de preparo de alimentos, mas podem ser feitos esforços para manter os níveis de contaminação tão baixos quanto possível.

O risco microbiológico pode ser reduzido significativamente pelo preparo adequado dos alimentos, mas quando as orientações não são seguidas, a cozinha pode se tornar um ponto importante de contaminação. Segundo o Centro de Controle de Doenças (CDC – Estados Unidos), aproximadamente, 20% das doenças de origem alimentar são causadas pelos manipuladores de alimentos (MICHAELS et al., 2004).

O fornecimento de um alimento seguro ao consumidor envolve o conhecimento e uso de manipulação adequada, seguindo os princípios de Boas Práticas de Fabricação (BPF). As BPFs englobam os princípios e procedimentos fundamentais necessários à produção de alimentos com qualidade desejável. É importante a utilização de práticas de higiene, em que medidas sanitárias devem ser seguidas e mantidas pelos estabelecimentos, as quais devem ser sempre aplicadas e registradas, sendo pré-requisitos para outros sistemas, em especial, a análise de perigos e pontos críticos de controle, o APPCC (LEVINGER, 2005).

1.1. *Salmonella* spp.

Salmonella spp. é uma bactéria entérica, responsável por graves infecções de origem alimentar, sendo um dos principais agentes envolvidos em surtos registrados em vários países (SHINOHARA et al., 2008). A contaminação por *Salmonella* ocorre, principalmente, pelo consumo de carne de frango e ovos, provocando distúrbios intestinais leves ou sintomas mais graves, como disenterias (GAST, 2003).

As bactérias do gênero *Salmonella* estão amplamente distribuídas na natureza (VARNAM; EVANS, 1991). Podem estar presentes em várias espécies animais, especialmente nas aves e nos suínos, sendo patogênica para humanos e muitas espécies de animais (HOLT et al., 1994).

As bactérias do gênero *Salmonella* são pequenos bacilos Gram negativos, não formadores de esporos e pertencentes à família Enterobacteriaceae. São anaeróbios facultativos, capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono, produzem gás a partir da glicose (exceto *Salmonella* Typhi). Em sua maioria são móveis, por flagelos peritríquios, exceto os sorovares *Salmonella* Pullorum e *Salmonella* Gallinarum, que são imóveis (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

A classificação do gênero *Salmonella* a partir da identificação de antígenos teve início em 1926. Tais estudos deram origem ao chamado Esquema de Kauffman & White, bastante empregado nos dias atuais e que propõe a divisão do grupo em sorogrupos e sorovares, com base na presença dos antígenos O (somático), H (flagelar) e Vi (capsular) (BELL; KYRIAKIDES, 2002).

Segundo Guibourdenche et al. (2010), o gênero *Salmonella* consiste de duas espécies, *Salmonella bongori* e *Salmonella enterica*, sendo esta última dividida em seis subespécies: *S. enterica* subespécie *enterica*, *S. enterica* subespécie *salamae*, *S. enterica* subespécie *arizonae*, *S. enterica* subespécie *diarizonae*, *S. enterica* subespécie *houtenae*, *S. enterica* subespécie *indica*. Os sorovares pertencentes à *S. enterica* subsp. *enterica* são designados por um nome geralmente relacionado com o local geográfico do seu primeiro isolamento. Este nome é escrito em letras romanas normais (não em itálico) e a primeira letra em maiúsculo. Sorovares pertencentes às outras subespécies e a espécie *S. bongori* são designados por seus antígenos, seguidos do nome da subespécie. Segundo essa classificação, são reconhecidos 2610 sorovares de *Salmonella*. A subespécie *enterica* é considerada a mais importante, já que mais de 99% dos sorovares isolados em humanos pertencem a ela (FRANCO; LANDGRAF, 2005).

Em relação aos fatores intrínsecos de um alimento, a atividade de água (aw) pode afetar o crescimento de *Salmonella*, sendo seu valor mínimo igual a 0,94 (aw ótimo: 0,99). Esse micro-organismo pode viver um ano ou mais em alimentos com baixa aw, como chocolate, pimenta e gelatina. Em relação ao pH, o valor mínimo para o crescimento é 3,8 e o máximo, 9,5, sendo o ótimo entre 7 e 7,5 (ICMSF, 1996).

O crescimento de *Salmonella* pode ser evitado se o alimento for mantido sob refrigeração abaixo de 5°C. A temperatura ótima de crescimento está na faixa de 35-43°C e a máxima é de até 49,5°C. Assim, alimentos quentes devem ser mantidos acima dessa temperatura e, embora 55°C já seja uma temperatura segura, 63°C é a recomendada em regulamentações (ICMSF, 1996). A habilidade de crescer em temperaturas abaixo de 7°C depende do sorovar envolvido. Cepas de *S. Typhimurium* são capazes de crescer em temperaturas entre 5 e 6°C e as de *S. Agona*, abaixo de 6°C (VARNAM; EVANS, 1991).

Salmonelose é a doença de origem alimentar mais frequente no mundo (BOLLAERTS et al., 2008) e 95% dos casos são decorrentes da ingestão de alimentos contaminados com células viáveis de sorovares de *Salmonella* (JAY, 2005). Os sintomas são caracterizados por dor abdominal, calafrios, febre, diarreia, vômito,

desidratação e dores de cabeça e o período de incubação pode variar de 5 a 72 horas, frequentemente ocorrendo entre 12 e 36 horas. O quadro é auto-limitante e, em geral, cessa em 1 a 4 dias após o aparecimento dos sintomas (FRANCO; LANDGRAF, 2005; BOLLAERTS et al., 2008).

A dose mínima infectante (DMI) para o homem é incerta, pois o número de micro-organismos necessários para a produção de sintomas pode variar entre 10 a 1 milhão de células. Em consequência, muitos países exigem a ausência de *Salmonella* no produto final, inclusive o Brasil (NOTERMANS; HOOGENBOOM-VERDEGAAL, 1992; BRASIL, 2001).

Embora diversos sorovares possam ser causadores de salmoneloses, *S. Enteritidis* é reconhecida como a principal responsável por causar infecção em humanos, situando-a como importante problema econômico e de saúde pública (MOORE et al., 2007; PANG et al., 2007; KOTTWITZ et al., 2010).

Durante o período de 1999 a 2008, no Brasil, foram notificados 6.062 surtos de doença de origem alimentar com o envolvimento de 117.330 pessoas. Embora não tenha ocorrido a identificação do agente etiológico em 3.088 dos surtos, *Salmonella* foi o micro-organismo mais comumente isolado, correspondendo a 42% do total de surtos identificados (BRASIL, 2008).

Segundo Viana (2002), no estado do Mato Grosso do Sul, 81,4% dos surtos de origem alimentar ocorridos entre 1998 e 2001 foram decorrentes da contaminação por *S. Enteritidis*. Materiais clínicos humanos analisados no estado de São Paulo entre 1996 e 2003 indicaram *S. Enteritidis* em 67,4% das amostras (FERNANDES et al., 2006). Kottwitz et al. (2010) ao conduzirem um estudo no estado do Paraná, constataram uma prevalência de 83,3% do sorovar *S. Enteritidis* em 310 cepas isoladas de surtos que ocorreram entre os anos de 1999 e 2008.

Especificamente em relação aos alimentos, a introdução de *Salmonella* no ambiente doméstico pode ocorrer especialmente pela carne de frango contaminada, devido ao fato desse patógeno ser isolado com frequência em amostras de carcaças encontradas no varejo (REDMOND et al., 2004). A carne de frango desempenha um papel importante na alimentação da população brasileira, devido ao seu preço baixo no comércio associado ao seu alto valor nutricional (OLIVEIRA et al., 2009).

Os processos de abate nas plantas de processamento de aves favorecem a sobrevivência e transmissão de bactérias comensais levando à deterioração e, potencialmente, a transmissão de bactérias patogênicas. As condições de manejo

durante a criação e os cuidados higiênicos nas operações de abate dos animais e posterior manipulação das carcaças influenciam na ocorrência e na quantidade de micro-organismos nas mesmas. A carne de frango ainda é passível de contaminação por micro-organismos capazes de colonizar o trato gastrointestinal das aves como a *Salmonella*, podendo contaminar as carcaças e outros produtos caso, no processo de abate não sejam utilizadas medidas corretas de higiene (HUYS et al., 2005).

Levantamento em diferentes países tem mostrado que de 30 a 50% das carcaças de frangos congelados ou refrigerados estão contaminados por *Salmonella* (SILVA et al., 2004). No Brasil, há relatos de contaminação por *Salmonella* em frangos e seus derivados variando de 13,3 a 86,7% (CARVALHO; CORTEZ, 2005; RALL et al., 2009).

Práticas inadequadas de manipulação contribuem significativamente para a ocorrência de surtos de origem alimentar, sendo responsáveis por 40-60% de casos de doenças alimentares originadas em ambientes domésticos (RAVISHANKAR et al., 2010; de JONG et al., 2008).

Por esses dados serem preocupantes uma série de pesquisas foi desenvolvida para avaliar como estas práticas estão diretamente relacionadas com a ocorrência de casos ou surtos de salmonelose de origem domiciliar (GORMAN et al., 2002; COGAN et al., 2002; BARKER et al., 2003). Ao observar os consumidores ou simular suas práticas na cozinha, foi possível perceber a influência da manipulação inadequada dos alimentos e a falta de higiene cooperando para o aumento do risco de ocorrência de DOA (ASSELT et al., 2009).

1.2. *Salmonella* e a contaminação cruzada

Estima-se que 40 a 60% dos casos de doenças transmitidas por alimentos estão relacionados às práticas inadequadas no ambiente doméstico (de JONG et al., 2008). Segundo Redmond (2004) e Todd et al. (2009) *Salmonella* spp. tem sido implicada em um terço dos eventos, embora este valor seja, provavelmente, subestimado (REDMOND, 2004; TODD et al., 2009).

A contaminação cruzada é definida como a transmissão de micro-organismos de fontes naturalmente contaminadas para um produto livre de contaminação e é um dos principais fatores que contribuem para os surtos de doenças de origem alimentar, desempenhando um papel significativo na transferência de patógenos de carnes para

outros alimentos consumidos crus (PARRY et al., 2005; RAVISHANKAR et al., 2010). Um exemplo é a transferência de bactérias de carcaças de frango por superfícies de contato não corretamente higienizadas, para alimentos prontos para consumo.

Dewit et al. (1979) foram os pioneiros demonstrando a contaminação cruzada por superfícies inanimadas durante o preparo doméstico de frangos contaminados. As superfícies de corte podem ser contaminadas com números elevados de *Salmonella* durante o preparo de carne de frango contaminada. Isto pode ser explicado, possivelmente, pelo fato desses micro-organismos possuírem estruturas superficiais, como as fímbrias, as quais facilitam sua adesão em superfícies não higienizadas (SOARES et al., 2012).

As superfícies de corte são empregadas nas cozinhas em uma diversidade de tarefas durante o preparo de alimentos e estas representam um risco de infecção no ambiente de processamento. Nas cozinhas onde foram preparadas carnes de frango, a prevalência de *Salmonella* foi de 60% para as superfícies de corte e 10% para as maçanetas das portas, armários, fogões e geladeiras (RUSIN et al., 1998; MORETRO et al., 2011).

O risco de ocorrer uma infecção de origem alimentar associada à contaminação cruzada depende de dois fatores: do nível de contaminação das superfícies em que o alimento é manipulado e da probabilidade destas atuarem como veículo de transferência de micro-organismos para os alimentos a serem consumidos (KUSUMANINGRUM et al., 2003).

Segundo PARRY et al. (2005), após o manuseio de carne de frango crua e ovos contaminados por *Salmonella*, foi possível encontrar o patógeno nas mãos, utensílios, roupas, equipamentos e superfícies de contato onde o alimento foi manipulado. Tal ocorrência pode ser explicada pelo fato da bactéria sobreviver por, pelo menos, 24 horas nas superfícies da cozinha, sendo uma fonte contínua de contaminação.

Moore et al. (2007) constataram que de 30 a 71% dos consumidores usaram a mesma superfície de corte para preparar carne crua e depois, para outros alimentos. Conseqüentemente, uma limpeza inadequada após a manipulação de carne de frango pode ser crucial na contaminação do ambiente doméstico por *Salmonella*.

Resultados semelhantes foram encontrados por Carrasco et al. (2012) onde 81% dos consumidores utilizavam os mesmos utensílios e superfícies de corte para o manuseio de alimentos crus e alimentos prontos para o consumo. Nesse contexto, pesquisadores têm debatido a relação do material que compõem as superfícies de corte e

o risco que esta representa para a saúde em termos de contaminação cruzada durante o preparo dos alimentos.

Assim, a questão crucial com relação às superfícies de corte é o tipo de material utilizado para a confecção das mesmas e a facilidade de higienização. Para que uma superfície seja caracterizada como a mais adequada, ela deve apresentar uma maior facilidade na remoção da sujidade e menor risco de contaminação cruzada. Desse modo acredita-se que as superfícies de madeira sejam mais difíceis de lavar e sanitizar do que as de plástico e de vidro, pois apresentam porosidades (MOORE et al., 2007; CARRASCO et al., 2012).

Falhas no processo de higienização das superfícies de corte permitem que resíduos fiquem aderidos nas mesmas, transformando-as em fonte de contaminação de alimentos. Os mecanismos que regem a adesão da *Salmonella* spp. em superfícies inertes não são completamente compreendidos. Vários estudos têm mostrado que a adesão de bactérias depende, em parte, da natureza e das propriedades dessas superfícies. A compreensão da adesão microbiana é de grande importância na prevenção da formação de biofilmes indesejáveis (OLIVEIRA et al., 2007), pois os microorganismos organizados em biofilme são conhecidos por serem 1000 vezes mais resistentes aos desinfetantes e antimicrobianos do que quando existem no ambiente como células planctônicas (REUTER et al., 2010).

A aplicação de procedimentos de higienização durante a manipulação e preparo dos alimentos tem por finalidade reduzir a contaminação microbiológica em superfícies de corte evitando a ocorrência de contaminação cruzada e garantindo a inocuidade dos alimentos (BARKER et al., 2003).

1.3. Produção de biofilme

A maior parte da atividade bacteriana na natureza ocorre, não com as células individualizadas crescendo de maneira planctônica, em suspensão, mas com as bactérias organizadas em comunidades de diferentes graus de complexidade, associadas a diversas superfícies, geralmente compondo um biofilme. Esses biofilmes são constituídos por células aderidas a uma superfície inerte (abiótica) ou viva (biótica), embebidas numa matriz de exopolissacarídeo (IST, 2008). A associação dos organismos em biofilmes constitui uma forma de proteção ao seu desenvolvimento, fomentando relações simbióticas e permitindo a sobrevivência em ambientes hostis (KYAW, 2008).

Dessa forma, constituem um aspecto fundamental da ecologia e biologia bacteriana (WONG; O'TOOLE, 2011).

Bactérias são capazes de formar biofilmes em várias superfícies abióticas, como plástico, madeira, vidro e aço inox (JOSEPH et al., 2001; KIM; WEI, 2009; MORITA et al., 2011). No entanto, os fatores e propriedades da superfície que afetam a produção de biofilme ainda não estão totalmente elucidados (SCHLISSELBERG; YARON, 2013).

Os biofilmes em condições naturais tendem a ser compostos por micro-organismos em culturas mistas e são considerados mais resistentes a agentes antimicrobianos e aos produtos utilizados comumente para limpeza e sanificação, representando uma fonte constante de contaminação devido à dificuldade encontrada em sua total remoção (JAY, 2005; OLIVEIRA, M et al., 2010).

Os biofilmes são tipicamente constituídos por água, micro-organismos, substâncias poliméricas extracelulares, partículas retidas e substâncias dissolvidas e adsorvidas (PEREIRA, 2001). A água é a parte mais significativa, variando entre 70 a 97%, da massa total (SUTHERLAND, 2001). Já os micro-organismos representam somente uma pequena parte da massa e do volume de um biofilme, menos de 10%, embora excretem as substâncias poliméricas que representam a fração dominante da matéria orgânica seca do biofilme (PEREIRA, 2001).

As salmonelas possuem fímbrias, que consistem em apêndices de membrana, menores que os flagelos. São compostas pela proteína pilina, dispostas de maneira helicoidal na superfície das bactérias Gram-negativas (TORTORA et al., 2010). As fímbrias e estruturas associadas tem se mostrado importantes na adesão e colonização de superfícies, sendo importantes também na interação bactéria-hospedeiro, na persistência ambiental, colonização e invasão de células e na formação de biofilmes (GIBSON et al., 2007). Tais estruturas possuem resíduos hidrofóbicos de aminoácidos, contribuindo para a hidrofobicidade da célula bacteriana com as superfícies e auxiliando ainda mais na agregação de novas bactérias. A principal função das fímbrias é superar a barreira de repulsão eletrostática inicial que pode existir entre uma célula e o substrato (CORPE, 1980), permitindo à célula bacteriana fazer contato com superfícies inanimadas e células eucarióticas ou procarióticas (RÖMLING et al., 1998).

A aderência bacteriana às superfícies é caracterizada por um processo sequencial de adesão inicial, formação de micro-colônias, produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) e maturação (Figura 1) (DAVEY; O'TOOLEY, 2000).

Após a estabilização do biofilme, algumas bactérias podem se desprender da camada mais externa e aderir ao ambiente circundante, permitindo que o biofilme se espalhe e se estabeleça ao longo da superfície (HALL-STOODLEY; STOODLEY, 2005; LASA, 2006).

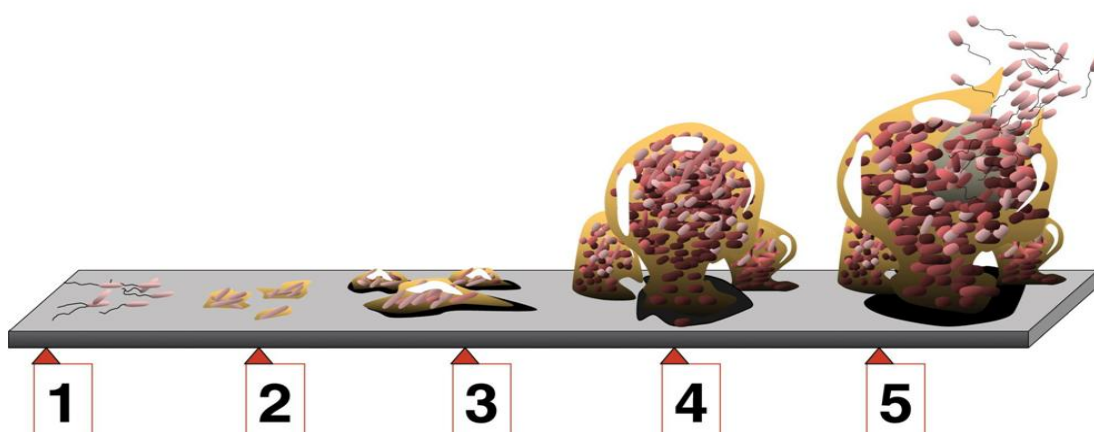


Figura 1. Processo sequencial da formação de biofilme. 1. Adesão inicial; 2. Formação de micro-colônias; 3. Produção de EPS; 4. Maturação; 5. Desprendimento de células planctônicas. Adaptado de Monroe (2007) (crédito de imagem: D. Davis).

Tanto o desprendimento de células ou agregados celulares da estrutura do biofilme como o desenvolvimento primário e a maturação são dependentes da densidade populacional e modulação da expressão gênica, controlados por moléculas sinalizadoras, no processo denominado *quorum sensing*. Bactérias Gram-negativas tipicamente produzem N-acil-homoserinas lactonas (AHLs) e Gram-positivas, oligopeptídeos. A concentração externa destas moléculas autoindutoras aumenta em função de elevações na densidade populacional bacteriana. Bactérias são capazes de detectar o acúmulo de limiares mínimos de estimulação desses autoindutores, alterando sua expressão gênica e seu comportamento. Pela utilização desse sistema de sinalização, bactérias sincronizam comportamentos particulares em escala populacional, agindo como organismos multicelulares (WATERS; BASSLER, 2005).

Os biofilmes têm importante papel na sobrevivência de *Salmonella* sob condições ambientais desfavoráveis, graças às fímbrias agregativas e à produção de celulose que formam a matriz extracelular, incorporando as células em uma estrutura semelhante ao mel de abelha e permitindo a formação do biofilme através de interações célula-célula e adesão a superfícies bióticas e abióticas (GERSTEL; RÖMLING, 2003;

WANG et al., 2013).

As fimbrias bacterianas desempenham um papel importante na adesão de *Salmonella* spp. à superfície da célula alvo e já foram identificados pelo menos 20 operons distintos no genoma de *Salmonella* spp. relacionados com a produção de fimbrias (COLLIGHAN; WOODWARD, 2001). O operon é um conjunto de genes que encontram-se relacionados funcionalmente, são contíguos e controlados coordenadamente (SANTOS, 2011).

A celulose, aparentemente, desempenha um papel estrutural conferindo proteção mecânica, química e biológica contra o meio em que está inserido o biofilme ou facilitando o processo de adesão celular (SOLANO et al., 2002).

A EPS é formada por vários componentes, como proteínas, carboidratos, DNA e vesículas de membrana (FLEMMING et al., 2007) e cada grupo funcional desempenha um papel adesivo ou coesivo na manutenção do biofilme (GEOGHEGAN et al., 2008). A produção de polímeros extracelulares é um investimento metabólico caro, por isso, pode-se inferir que a presença de EPS é crucial para a formação e manutenção do biofilme (STOODLEY et al., 2002).

Fimbrias e celulose estão entre os principais componentes da matriz em biofilmes de *Salmonella* (OLIVEIRA, 2011). As fimbrias *curli* (também chamadas de fimbrias agregativas finas) são o maior fator de adesão às superfícies, agregação celular e formação de biofilme em muitas bactérias (RÖMLING et al., 1998). A expressão de *curli* é ligada à biossíntese de celulose, que leva a produção de uma matriz extracelular e resulta em interações firmes entre célula-célula e célula-superfície (RÖMLING et al., 2000; ZOGAJ et al., 2003).

Gerstel e Römling (2003) demonstraram que o gene *csgD* (*curli* subunit gene D, antigamente chamado de *agfD* em *S. Typhimurium*) controla positivamente os dois componentes da matriz extracelular em *S. Typhimurium*. A expressão de ambos, *curli* e celulose, depende da proteína CsgD, um regulador transcricional da família LuxR, que ativa a transcrição do operon *csgBAC* (ARNQVIST, OLSEN; NORMAK, 1994), que codifica as subunidades estruturais de *curli* e a transcrição do gene *adrA*, um efetor positivo de biossíntese de celulose (RÖMLING et al., 2000). A co-expressão dos dois componentes da matriz extracelular dos biofilmes de *Salmonella* leva à formação de uma rede altamente hidrofóbica com células compactadas, alinhadas em paralelo formando uma matriz rígida.

AdrA é uma proteína interna de membrana, codificada pelo gene *adrA*, que

ancora um domínio GGDEF (RÖMLING et al., 2000) responsável pela regulação da atividade de Diguanosina Monofostafato Cíclico (c-di-GMP) (GARCIA et al., 2004), cuja função não é restrita à ativação da biossíntese de celulose (SIMM et al, 2004). Em *S. Typhimurium* e *Escherichia coli*, a expressão de *adrA* e, conseqüentemente, o aumento nos níveis de c-di-GMP também estimula a expressão de *curli* (RÖMLING, 2005). Assim, o aumento da produção de biofilme quando *adrA* é expresso se deve tanto ao aumento de celulose, quanto à biossíntese de *curli* e, devido ao fato de que a mobilidade é inibida pela expressão de *adrA* e altos níveis de c-di-GMP (SIMM et al., 2004), concluindo-se que, nessas condições, é favorecida a forma sésil da bactéria e a produção de matriz de moléculas adesivas em *S. Typhimurium* (RÖMLING, 2005).

A superfície em que o biofilme é formado desempenha um papel importante na forma e desenvolvimento do mesmo. O estado de conservação da superfície também pode influenciar na formação do biofilme, pois depósitos porosos e irregulares que se encontram frequentemente às superfícies são regiões propensas ao crescimento bacteriano (CHAVES, 2004).

Assim a compreensão do mecanismo envolvido na fixação, desenvolvimento e maturação do biofilme é importante para elucidar o impacto sobre as áreas médicas, industriais e de saúde pública.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Analisar o processo de transferência de *Salmonella* Enteritidis, a partir de carne de frango contaminada para pepinos, em diferentes superfícies de corte, antes e depois da higienização e formação de biofilme nessas superfícies.

2.2. Objetivos específicos

- Pesquisar a presença dos genes *adrA* e *csgD*, envolvidos na produção de biofilme por cepas de *Salmonella* Enteritidis.

- Verificar a transferência das células de *Salmonella* do frango para três superfícies de corte diferentes (plástico, madeira e vidro) e destas, para um vegetal consumido cru (pepino), imediatamente após a contaminação.

- Verificar a transferência das células de *Salmonella* do frango para três superfícies de corte diferentes (plástico, madeira e vidro) e destas, para um vegetal consumido cru (pepino), após processo de higienização.

- Verificar e quantificar a produção de biofilme pelas cepas em diferentes materiais (plástico, madeira e vidro).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERC. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE EMPRESAS DE REFEIÇÕES COLETIVAS - ABERC – História e Mercado. Disponível em: <<http://www.aberc.com.br>>. Acesso em 9 setembro 2013.

ALVES, A. R. F. **Doenças alimentares de origem bacteriana**. 2012. Dissertação (Mestrado) – Universidade Fernando Pessoa, 2012.

ARNQVIST, A.; OLSEN, A.; NORMARK, S. Dependent growth-phase induction of the *csgBA* promoter in *Escherichia coli* can be achieved in vivo by in the absence of the nucleoid-associated protein H-NS. **Molecular Microbiology**, v. 13, p. 1021-1032, 1994.

ASSELT, E. D. V.; FISCHER, A.; DE JONG, A. E. I.; NAUTA, M. N.; DE JONG, R. Cooking practices in the kitchen-observed versus predicted behavior. **Risk Analysis**, v.29, n.4, p. 533-540, 2009.

BARKER, J.; NAEENI, M.; BLOOFIELD, S. L. The effects of cleaning and disinfection in reducing *Salmonella* contamination in a laboratory model kitchen. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 1351-1360, 2003.

BAS, M.; ERSUN, A.S.; KIVANÇ, G. The evaluation of food hygiene knowledge, and practices of food handlers in food businesses in Turkey. **Food Control**, v. 17, p. 317-322, 2006.

BELL, C.; KYRIAKIDES, A. **Salmonella: a practical approach to the organism and its control in foods**. Iowa: Blackwell Science, 2002.

BOLLAERTS, K.; AERTES, M.; FAES, C.; GRIJSPEERDT, K.; DEWULF, J.; MINTIENS, K. Human salmonellosis: estimation of dose-illness from outbreak data. **Risk Analysis**, v.28, n.2, p. 427-440, 2008.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos, 2001.

BRASIL. Análise epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil. Brasília, 2008. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos_dta_15.pdf. Acesso em: 28 agosto

2013

CARVALHO, A.C.F.B; CORTEZ, A.L.L. *Salmonella* spp. em carcaças, carne mecanicamente separada, linguiças e cortes comerciais de frango. **Ciência Rural**, v. 35, n. 6, p. 1465-1468, 2005.

CARRASCO, E.; MORALES-RUEDA, A.; GARCÍA-GIMENO, R. M. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. **Food Research International**, v. 45, p. 545-556, 2012.

CDC. CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Findings CDC Estimates of Foodborne Illness in the United States in 2011. Disponível em: <http://www.cdc.gov/foodborneburden/PDFs/FACTSHEET_A_FINDINGS_updated4-13.pdf>. Acesso em: 09 setembro 2013.

CHAVES, L. C. D. **Estudo da cinética de formação de biofilmes em superfícies em contato com água potável**. 2004. 156f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga.

COGAN, T. A.; BLOOMFIELD, S. F.; HUMPHREY, T. J. Achieving hygiene procedures for prevention of cross-contamination from chicken carcasses in the domestic kitchen. **Letters in Applied Microbiology**, v.29, p. 354-358, 2002.

COLLIGHAN, R. J.; WOODWARD, M. J. The SEF 14 fimbrial antigen of *Salmonella* enteric serovar Enteritidis is encoded within a pathogenicity islet. **Veterinary Microbiology**, v. 80, n. 3, p. 235-245, 2001.

CORPE, W.A. Microbial surface components involved in adsorption of microorganisms onto surfaces. In: Adsorption of microorganisms to surfaces. G. Bitton and K.C. Marshal (Eds), **John Wiley & Sons**, Inc, New York, USA, p. 105-144, 1980.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 64, p. 847-867, 2000.

DEON, B. C. Programa de boas práticas em domicílios da cidade de Santa Maria – RS. **Brazilian Journal of Food Technology**, p. 74 -77, 2012.

de JONG, A. E. I.; VERHOEFF-BAKKENES, L.; NAUTA, M. J.; DE JONG, R. . Cross- contamination in the kitchen: effect of hygiene measures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 615-624, 2008.

DEWITT, J. C.; PURCHASE, D. KAMPLEMACHER, E. H. Cross-contamination during preparation of frozen chicken in the kitchen. **Journal of Hygiene**, v. 83, p. 27-32, 1979.

FERNANDES, S. A.; TAVECCHIO, A. T.; GHILIARDI, A. C. *Salmonella* serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 4, p. 179-184, 2006.

FLEMMING, H. C.; NEU, T. R.; WOZNIAK, D. R. The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. **Journal of Bacteriology**. v. 189, n. 22, p. 7945–7947, 2007.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2005.

GARCIA, B.; LATASA, C.; SOLANO, C.; DELPORTILLO, F. G.; GAMAZO, C.; LASA, I. Role of the GGDEF protein family in *Salmonella* cellulose biosynthesis and biofilm formation. **Molecular Microbiology**. v. 54, n.1, p. 264–277, 2004.

GAST, R.K. Paratyphoid infections, 11 ed. In: SAIF, Y.M. **Diseases of Poultry**. Ames, Iowa: Iowa State Press, 2003, p. 583-613.

GEOGHEGAN, M.; ANDREWS, J. S.; BIGGS, C. A.; EBOIGBODIN, K. E.; ELLIOTT, D. R.; ROLFE, S.; SCHOLLES, J.; OJEDA, J. J.; ROMERO-GONZÁLEZ, M. E.; EDYVEAN, R. G. J. The polymer physics and chemistry of microbial cell attachment and adhesion. **Faraday Discussions**. v. 139, p. 85–103, 2008.

GERSTEL, U.; RÖMLING, U. The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella* Typhimurium. **Research in Microbiology**. v. 154, p. 659–667, 2003.

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

GORMAN, R.; BLOOMFIELD, S.; ADLEY, C.C. A study of cross-contamination of food-borne pathogens in the domestic kitchen in the Republic of Ireland. **International Journal of Food Microbiology**, v.76, p. 143-150, 2002.

GREIG, J. D.; RAVEL, A. Analysis of foodborne outbreak data reported

internationally for source attribution. **International Journal of Food Microbiology**, v. 130, p. 77-87, 2009.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P. I.; BOCKEÜHL, J.; GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F. X. Supplement 2003 – 2007 (No. 47) to the White- Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 26- 29, 2010.

HALL-STOODLEY, L.; STOODLEY, P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens. **Trends Microbiology**. v. 13, p. 7-10, 2005.

HAVELAAR, A. H.; BRUL, S.; de JONG, A.; de JONGE, C.; ZWIETERING, M. H.; ter KUILE, B. H. Future challenges to microbial food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p. S79-S94, 2010.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R; SNEATH, P. H. A.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 787, 1994.

HUYS, G.; D'HAENE, K.; ELDERE, J. V.; HOLY, A.; SWINGS, J. Molecular diversity and characterization of tetracycline-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a poultry processing plant. **Applied Environmental Microbiology**. v.71, p.574–579, 2005.

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

IST. Grupo de Ciências Biológicas do Instituto Superior Técnico. Universidade Técnica de Lisboa. **Crescimento microbiano em biofilmes**. Publicado em 2005, Revisto em 2008. Disponível em < <http://www.e-escola.pt/topico.asp?id=354>>. Acesso em 14 de maio de 2013.

JAY, J.M. **Microbiologia de Alimentos**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 711 p., 2005.

JOSEPH, B.; OTTA, S.K.; KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, v.64, p.367-372, 2001.

KIM, S. H.; WEI, C. I. Molecular characterization of biofilm formation and attachment of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 on food contact surfaces. **Journal of Food Protection**. v. 72, n. 9, p. 1841-1847, 2009.

KOTTWITZ, L. B. M.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; ALCOGER, I.; FARAH, S.; ABRAHÃO, W. M.; RODRIGUES, D. P. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v.32, n.1, p. 9-15, 2010.

KUSUMANINGRUM, H. D.; van ASSELT, E. D.; BEUMER, R. R.; ZWIETERING, M. H. A quantitative analysis of cross-contamination of *Salmonella* and *Campylobacter* spp. via domestic kitchen surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 9, p. 1892-1903, 2004.

KYAW, C.M. **Biofilmes Microbianos**, 2008. Disponível em <www.unb.br/ib/cel/microbiologia/biofilme/biofilme.html>. Acesso em 10 de maio de 2013.

LASA, I. Towards the identification of the common features of bacterial biofilm development. **International Microbiology**. v. 9, p. 21-28, 2006.

LEVINGER, B. School feeding, school reform, and food security: connecting the dots. **Food Nutrition Bulletin**, v. 26, p. 170-178, 2005.

MESSIAS, G.M. **Aspectos higiênico-sanitários, manipuladores de alimentos, gerentes e consumidores: situações das lanchonetes tipo fast food da cidade do Rio de Janeiro, RJ**. 2007. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MICHAELS, B. ; KELLER, M. ; BLEVINS, G. ; PAOLI, T.; RUTHMAN, B.; TODD, E.; GRIFFITH, C. J. Prevention of food worker transmission of foodborne pathogens: risk assessment and evaluation of effective hygiene intervention strategies. **Food Service Technology**, v. 4, n. 1, p. 31–49, 2004.

MOORE, G.; BLAIR, I. S.; MCDOWELL, D. A. Recovery and transfer of *Salmonella* Typhimurium from four different domestic food contact surfaces. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 10, p. 2273-2280, 2007.

MORETRO, T.; HEIR, E.; NESSE, L. L.; VESTBY, L. K.; LANGSRUD, S. Control of *Salmonella* in food related environments by chemical disinfection. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 532-544, 2011.

MORITA, Y.; KOMODA, E.; ONO, K.; KUMAGAI, S. Survival of biofilm-forming

Salmonella on stainless steel bolt threads under dry conditions. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**. v. 52, n. 5, p. 299-303, 2011.

MS. Ministério da Saúde. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/analise_ep_surtos_dta_brasil_2009.pdf>. Acesso em: 10 setembro 2013.

NOTERMANS, B.; HOOGENBOOM-VERDEGAAL, A. Existing and emerging foodborne disease. **International Journal of Food Microbiology**, v. 15, p. 197- 205, 1992.

OLIVEIRA, K.; OLIVEIRA, T.; TEIXEIRA, P.; AZEREDO, J.; OLIVEIRA, R. Adhesion of *Salmonella* enteritidis to stainless steel surfaces. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 318-323, 2007.

OLIVEIRA, A. L.; PEREIRA, M. T.; BUENO, P. H. S.; OLIVEIRA, R. B. P.; PINTO, F. C.; CORREIA, R. F.; MACHADO, M. M. Qualidade microbiológica da carne de frango irradiada em embalagem convencional e a vácuo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v. 61, n. 5, p. 1210-1217, 2009.

OLIVEIRA, A. B. A; de PAULA, C. M. D.; CAPALONGA, R.; CARDOSO, M. R. I.; TONDO, E. C. Doenças transmitidas por alimentos, principais agentes etiológicos e aspectos gerais : Uma revisão. **Revista do Hospital das Clínicas de Porto Alegre**, v. 30, n. 3, p. 279-285, 2010.

OLIVEIRA, M. M. M de.; BRUGNERA, D. F; PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos na industria de alimentos: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v.69, n.3, p.277-284, 2010.

OLIVEIRA, D. C. V. **Produção de biofilme por *Salmonella* sp. isolada de frango**. 2011. 83f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

PANG, J. C.; CHIU, T. H.; HELMUTH, R.; SCHROETER, A.; GUERRA, B.; TSEN, H. Y. A pulsed field gel electrophoresis (PFGE) study that suggests a major world-wide clone of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 116, p. 305-312, 2007.

PARRY, S. M.; SLADER, J.; HUMPHREY, T.; HOLMES, B.; GUILDEA, Z.; PALMER, S. R. ; SEWIDLG. A case-control study of domestic kitchen microbiology and sporadic *Salmonella* infection. **Epidemiology and Infection**, v. 133, p. 829-835,

2005.

PEREIRA, O. B. O. **Comparação da eficácia de dois biocidas (carbamato e glutaraldeído) em sistemas de biofilme.** (2001) 221f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, 2001.

RALL, V. L. M.; MARTIN, J. G. P.; CANDEIAIS, J. M. G.; CARDOSO, K. F. G.; SILVA, M. G.; RALL, R.; ARAÚJO JÚNIOR, J. P. Pesquisa de *Salmonella* e das condições sanitárias em frangos e lingüiças comercializados na cidade de Botucatu. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 3, p. 167-174, 2009.

RAVISHANKAR, S.; ZHU, L.; JARONI, D. Assessing the cross- contamination and transfer rates of *Salmonella enteric* from chicken to lettuce under different food-handling scenarios. **Food Microbiology**, p. 1-4, 2010.

REDMOND, E. C.; GRIFFITH, C. J.; SLADER, J.; HUMPHREY, T. J. Microbiological and observational analysis of cross contamination risks during domestic food preparation. **British Food Journal**, v. 106, n. 8, p. 581-597, 2004.

REUTER, M.; MALLETT, A.; PEARSON, B. M.; van VLIET, A. H. M. Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* is increased under aerobic conditions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n.7, p. 2122-2128, 2010.

RÖMLING, U; BIAN, Z; HAMMAR, M; SIERRALTA, W.D.; NORMARK, S. *Curli* fibers are highly conserved between *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. **Journal of Bacteriology**. v. 180, p. 722–731, 1998.

RÖMLING, U.; ROHDE, M.; OLSEN, A.; NORMARK, S.; REINKOSTER, J. AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella* Typhimurium regulates at least two independent pathways. **Molecular Microbiology**. v. 36, p. 10–23, 2000.

RÖMLING, U. Characterization of the *rdar* morphotype, a multicelular behaviour in Enterobacteriaceae. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 62, p. 1234–1246, 2005.

RUSIN, P.; OROSZ-COUGHILIN, P.; GERBA, C. Reduction of faecal coliform, coliform and heterotrophic plate count bacteria in the household kitchen and bathroom by disinfection with hypochlorite cleaner. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, p.

819–828, 1998.

SANTOS, D. Operon. 2011. Disponível em: <djalmasantos.wordpress.com/2011/03/12/operon/>. Acesso em: 15 de Abr. 2013.

SCHLISSELBERG, D. B.; YARON, S. The effects of stainless steel finish on *Salmonella* Typhimurium attachment, biofilm formation and sensitivity to chlorine. **Food Microbiology**. v. 35, p. 65-72, 2013.

SHINOHARA, N.K.S.; BARROS, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. C. L.; DUTRA, R. A. F.; FILHO, J. L. L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.13, n.5, p. 1675-1683, 2008.

SILVA, M.C.D. et al. *Salmonella* sp em ovos e carcaças de frangos “in natura” comercializadas em Maceió, AL. **Higiene Alimentar**, v.18, n.121, p.80-84, 2004.

SIMM, R.; MORR, M.; KADER, A.; NIMTZ, M.; RÖMLING, U. GGDEF and EAL domains inversely regulate cyclic di-GMP levels and transition from sessility to motility. **Molecular Microbiology**. v. 53, p. 1123–1134, 2004.

SOARES, V. M.; PEREIRA, J. G.; VIANA, C.; IZIDORO, T. B.; BERSOT, L. S.; PINTO, J. P. A. N. Transfer of *Salmonella* Enteritidis to four types of surfaces after cleaning procedures and cross-contamination to tomatoes. **Food Microbiology**, v. 30, p. 453-456, 2012.

SOLANO, C.; GARCIA, B.; VALLE, J.; BERASAIN, C.; GHIGO, J. M.; GAMAZO, C.; LASA, I. Genetic analysis of *Salmonella* Enteritidis biofilm formation: critical role of cellulose. **Molecular Microbiology**. v. 43, p. 793–808, 2002.

SOUSA, C. P. Segurança alimentar e doenças veiculadas por alimentos: utilização do grupo coliforme como um dos indicadores de qualidade de alimentos. **Revista de Atenção Primária à Saúde**, v. 9, n. 1, p. 83-88, 2006.

SPRICIGO, D. A.; BARDINA, C.; CORTÉS, P.; LLAGOSTERA, M. Use of a bacteriophage cocktail to control *Salmonella* in food and the food industry. *International Journal of Food Microbiology*, v. 165, p. 169-174, 2013.

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

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J. W. Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology**. v. 56, p. 187–209, 2002.

SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. **Trends in Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 222-227, 2001.

TODD, E. C. D.; GREIG, J. D.; BARTLESON, C. A.; MICHAELS, B. S. Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 6. Transmission and survival of pathogens in the food processing and preparation environment. **Journal of Food Protection**, v.72, n.1, p. 202-219, 2009.

TORTORA, G. J; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology**. Ed. 10^a. Pearson 2010, p. 960.

VARNAM, A. H.; EVANS M. G. **Foodborne pathogens: an illustrated text**. St Louis: Moby-Year Book, p. 209-234, 1991.

VIANA, S. A. **Surtos de toxinfecções alimentares no estado de Mato Grosso do Sul, 1998-2001**. 2002. 79f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso de Especialização em Gestão em Saúde) Escola de Saúde Pública “Dr. Jorge David Nasser”, Campo Grande, 2002.

WANG, H.; YE, K.; ZHANG, Q.; DONG, Y.; XU, X.; ZHOU, Z. Biofilm formation of meat-borne *Salmonella enterica* and inhibition by the cell-free supernatant from *Pseudomonas aeruginosa*. **Food Control**, v. 32, p. 650-658, 2013.

WATERS, C. M.; BASSLER, B. L. Quorum Sensing: cell-to-cell communication in bacteria. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 21, p. 319-346, 2005.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Food borne disease: A focus for health education**. Geneva: World Health Organization, 2000.

WONG, G. C. L.; O'TOOLE, G. A. All together now: Integrating biofilm research across disciplines. **MRS Bulletin**, v. 36, p. 339–342, 2011.

ZOGAJ, X.; BOKRANZ, W; NIMTZ, M.; RÖMLING, U. Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family Enterobacteriaceae isolated from the human gastrointestinal tract. **Infection and Immunity**. v. 71, p. 4151–4158, 2003.

CAPÍTULO 1

Este trabalho deu origem ao artigo “Avaliação da contaminação cruzada e da formação de biofilme, por *Salmonella* Enteritidis, em diferentes superfícies de corte”.

Avaliação da contaminação cruzada e da formação de biofilme, por *Salmonella*
Enteritidis, em diferentes superfícies de corte.

Stéfani Thais Alves Dantas¹; Livia Gramolini Baptista¹; Paulo Eduardo Budri¹; Vera
Lúcia Mores Rall¹

¹Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP –
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu – SP, Brasil.

Autor para correspondência:

Vera Lúcia Mores Rall

Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Biociências, UNESP –
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu – SP, Brasil.

Caixa-Postal 510

CEP 18618-970, Distrito de Rubião Jr., s/n, Botucatu, SP – Brasil.

Telefone: (14) 3880-0438, Fax (14) 3811-6240

e-mail: vlmores@ibb.unesp.br

RESUMO

A contaminação cruzada é um dos principais fatores que contribuem para os surtos de doenças de origem alimentar. Estima-se que até 60% dos casos de doenças transmitidas por alimentos estejam relacionados às práticas inadequadas, como a contaminação cruzada envolvendo superfícies de corte, onde a carne de frango crua é manipulada concomitantemente a outros alimentos. Dentre os micro-organismos responsáveis por causar doenças de origem alimentar, destaca-se *Salmonella* spp., sendo o sorovar *S. Enteritidis* o mais envolvido nos casos de infecções humanas além de ser reconhecida pela sua capacidade de aderir, colonizar e formar biofilme em superfícies de contato com alimentos. O biofilme permite que as bactérias se desenvolvam e cresçam aderidas a superfícies conferindo resistência aos processos de higienização, podendo causar contaminação durante o preparo dos alimentos. Assim, 10 cepas de *S. Enteritidis* foram utilizadas para testes de contaminação cruzada entre três superfícies de corte (plástico, madeira e vidro) e pepinos antes e depois da higienização. Além disso, essas cepas foram avaliadas quanto a sua capacidade de formar biofilme em materiais hidrofóbicos (madeira e plástico) e hidrofílicos (vidro). Quando as superfícies testadas não foram higienizadas houve a recuperação das células bacterianas de todas as superfícies e, depois, em todos os pepinos em contato com essas superfícies. Em relação às superfícies de corte higienizadas, o vidro foi o material que apresentou a menor recuperação do patógeno e a menor ocorrência de contaminação cruzada para pepinos. Entre as 10 cepas testadas, três (30%) não foram capazes de produzir biofilme em nenhuma das superfícies analisadas, mesmo possuindo os genes *csgD* e *adrA*. A maior porcentagem de produção de biofilme ocorreu na madeira e no plástico (60% e 40%, respectivamente) seguido do vidro (10%), mostrando que a bactéria adere melhor em materiais hidrofóbicos. Pode-se concluir que as superfícies de corte representam um ponto crítico quanto à contaminação cruzada, principalmente, quando não higienizadas corretamente. *S. Enteritidis* foi capaz de formar biofilme nos diferentes materiais que compõe as superfícies de corte, sendo o vidro o material com o menor número de cepas produtoras de biofilme.

Palavras chave: biofilme, contaminação cruzada, superfícies de corte

1. INTRODUÇÃO

As doenças de origem alimentar (DOA) continuam aumentando em todo o mundo, principalmente pela manipulação inadequada dos alimentos pelo próprio consumidor e por manipuladores que não estão informados desses perigos (MESSIAS 2007). A cada ano, milhões de pessoas são afetadas por doenças de origem alimentar, sendo um dos maiores problemas de saúde pública no mundo contemporâneo (WHO, 2000; SREY, et al., 2013).

Salmonella spp. é um dos principais patógenos responsáveis por causar doenças de origem alimentar (SHINOHARA et al., 2008; CARRASCO et al., 2012; SPRICIGO et al., 2013; SREY et al., 2013). *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium foram os sorovares mais frequentemente isolados, sendo a primeira, reconhecida como a principal responsável por causar infecção em humanos (SPRICIGO et al., 2013).

Salmonella é transmitida quando as células são introduzidas na área de manipulação dos alimentos. Vários fatores, como, falhas nas boas práticas de fabricação relacionadas à inadequada conservação dos alimentos, falhas no processo de cocção e contaminação cruzada envolvendo superfícies de corte, onde a carne de frango crua é manipulada concomitantemente a outros alimentos, contribuem para a ocorrência da doença (CARRASCO et al., 2012; SOARES et al., 2012).

As superfícies de contato contaminadas representam um importante potencial de disseminação de patógenos no ambiente doméstico. Estudos demonstraram que bactérias como, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp., podem sobreviver nas mãos, em panos de prato, esponjas e utensílios por horas ou dias após o contato inicial com os micro-organismos, aumentando o risco de contaminação cruzada entre mãos dos manipuladores de alimentos, alimentos e superfícies de contato com alimentos (KUSUMANINGRUM et al., 2003; LUBER, 2009; CARRASCO et al., 2012).

A aderência bacteriana à superfícies é caracterizada por um processo sequencial de adesão inicial, formação de micro-colônias, produção de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) e maturação (DAVEY; O'TOOLEY, 2000), essa interação é influenciada pelo ambiente físico e químico em que a célula bacteriana e a superfície estão expostas (LIANOU; KOUTSOUMANIS, 2012).

Salmonella é reconhecida pela sua capacidade de aderir, colonizar e formar biofilme em uma grande variedade de alimentos e superfícies de contato com alimentos

(WANG et al., 2013). Os biofilmes representam uma fonte constante de infecção, nos Estados Unidos cerca de 80% das infecções bacterianas foram associadas a biofilmes (SREY et al., 2013). A compreensão do mecanismo envolvido na fixação, desenvolvimento e maturação do biofilme é importante para elucidar o impacto sobre as áreas médicas, industriais e de saúde pública.

O biofilme permite com que as bactérias se desenvolvam e cresçam aderidas a superfícies bióticas ou abióticas e essa associação lhes garante uma forma de proteção ao seu desenvolvimento conferindo assim uma maior resistência contra estresse ambiental, antimicrobianos, desinfetantes e ao sistema imune do hospedeiro (KYAW, 2008; RAZA et al., 2011; LIANOU; KOUTSOUMANIS, 2012).

A formação de biofilme é um processo dinâmico que envolve a fixação dos micro-organismos e a maturação da matriz (ROHDE et al., 2010). Pode ser influenciada por fatores ambientais e depende também da constituição genética da cepa (MELCHIOR et al., 2009). O gene *csgD* e o gene *adrA* são componentes genéticos envolvidos na produção de biofilme.

Fímbrias e celulose estão entre os principais componentes da matriz em biofilmes de *Salmonella* (OLIVEIRA, 2011). Gerstel e Römling (2003) demonstraram que o gene *csgD* (curl subunit gene D) controla positivamente esses dois componentes da matriz extracelular em *S. Typhimurium*, atuando diretamente sobre o gene *adrA*, que participa indiretamente na produção de celulose (OLIVEIRA, 2011).

Salmonella é capaz de formar biofilmes em várias superfícies abióticas, como plástico, madeira, vidro e aço inox (KIM; WEI, 2009; MORITA et al., 2011; LIANOU; KOUTSOUMANIS, 2012). E a superfície em que o biofilme é formado desempenha um papel importante na forma e desenvolvimento do mesmo. O estado de conservação da superfície pode influenciar na formação do biofilme (CHAVES, 2004). Com relação às superfícies de corte, um ponto crucial é o tipo de material utilizado para a confecção das mesmas e a facilidade de higienização. Para que uma superfície seja caracterizada como a mais adequada, ela deve apresentar uma maior facilidade na remoção da sujidade e menor risco de contaminação cruzada. Desse modo acredita-se que as superfícies de madeira sejam mais difíceis de lavar e sanitizar do que as de plástico e de vidro, pois apresentam porosidades (MOORE et al., 2007; CARRASCO et al., 2012; GIAOURIS et al., 2013).

Desta forma, o presente estudo teve por objetivo analisar o processo de disseminação de *Salmonella* Enteritidis, a partir de carne de frango contaminada para

pepinos, em diferentes superfícies de corte, antes e depois da higienização e avaliar a formação de biofilme nessas superfícies.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Cepas de *Salmonella*

Para a pesquisa dos genes *csgD* e *adrA* foram testados 26 cepas de *S. Enteritidis*, selecionadas ao acaso, pertencentes à Bacterioteca do Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto de Biociências de Botucatu. Em estudo prévio as cepas haviam sido isoladas de carcaças de frango e sorotipadas pela Fundação Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro. Dentre as cepas que apresentaram positividade para ambos os genes foram selecionadas randomicamente 10 cepas para os testes de verificação de contaminação cruzada e produção de biofilme.

2.2. Aquisição do frango para inoculação artificial das superfícies de corte

As amostras de peito de frango foram coletadas em açougues e supermercados, da cidade de Botucatu-SP, transportadas em sacos plásticos esterilizados (114x229mm-Inlab), sob refrigeração, em caixa isotérmica contendo gelo reciclável, até o momento do processamento no laboratório.

Antes do teste, parte da amostra foi analisada para verificação da ausência de *Salmonella*. Deve ser ressaltado que a outra parte foi congelada, a fim de evitar sua deterioração, até a obtenção do resultado. A pesquisa de salmonela foi realizada pela metodologia tradicional e pela PCR.

2.3. Detecção de *Salmonella* pela metodologia tradicional

Para a detecção da presença de *Salmonella*, 25 gramas de amostra foram homogeneizados em 225 mL de água peptonada 1%, no “Stomacher”, com incubação a 35°C/24 horas. Em seguida, foi transferido 1 mL do homogeneizado para um tubo com 10 mL de caldo tetracionato, suplementado imediatamente antes do uso com 0,2 ml de solução de iodo e incubado a 35°C/24 horas. Outra alíquota de 0,1 mL foi transferida para um tubo com 10 mL de caldo Rapapporte-Vassiliadis, incubado a 42°C/24 horas.

Após este período, uma alçada de cada tubo foi semeada em placas contendo ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato (XLD) e de ágar Chromagar *Salmonella*. Após o período de incubação a 35°C/24 horas, as colônias características de *Salmonella* foram repicadas para tubos inclinados de ágar Trypticase Soja (TSA). A partir destes, foram realizados testes bioquímicos de triagem, em tubos inclinados de ágar Tríplice Açúcar Ferro (TSI) e ágar Fenil (Ágar Fenilalanina). As colônias que apresentaram reações típicas foram submetidas à identificação pelo sistema API-20E (Biomérieux). As cepas que apresentaram confirmação positiva foram testadas frente aos soros polivalentes somático e flagelar (ANDREWS et al., 2001).

2.4. Detecção de *Salmonella* pela PCR

Após a incubação dos caldos de enriquecimento tetracionato e Rapaport-Vassiliadis (item 2.3), foi realizada a pesquisa da presença de *Salmonella* pela PCR. Para a extração do DNA, 1 ml de cada caldo foi centrifugado a 10.000g/10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento, ressuspendido em 1 ml de PBS (Solução Tampão de Fosfato – 0,01 M, pH 7,2). Esse passo foi repetido mais duas vezes, com tempo de centrifugação de 5 minutos. Após, o sedimento foi ressuspendido em 200 µl de tampão de lise (50 mM Tris-H-Cl, 1 mM EDTA 0,025% Tween, 0,2 mg proteinase K) incubado em banho-maria a 56°C/1 hora e depois, a 95°C/10 minutos. Ocorreu nova centrifugação a 13.000g/5 minutos e o sobrenadante foi usado para a reação da PCR (ARNOLD et al., 2004).

Para as reações, o volume total de 25 µL era composto por 2,5 µL de PCR Buffer 10x, 0,75 µM de Cloreto de Magnésio, 200 µM de cada dNTP, 1 U de Taq DNA Polimerase, 10 picomoles de cada *primer*, água ultrapura autoclavada (qsp) (Milli-Q Plus, Millipore) e 3 µL 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 5 minutos para desnaturação inicial, seguidos por 35 ciclos com 94°C/30s, 60°C/30s e 72°C/30s. A temperatura de extensão final foi de 72°C por 4 minutos. Em todas as reações realizadas foi utilizado um controle negativo, através da substituição da amostra por água ultrapura. Como controle positivo, foi utilizada uma cepa padrão de *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028. A Tabela 1 apresenta as características dos primers do gene *invA* (ARNOLD et al., 2004).

Os produtos das reações de PCR foram submetidos à eletroforese

(Electrophoresis Power Supply Model EPD 600 – Amersham-Pharmacia Biotech Inc.) em gel de agarose 1,5% (Sigma Aldrich) em tampão de ácido bórico-Tris-EDTA (TBE) e revelados com Syber Safe (Invitrogen). Os fragmentos de DNA foram analisados comparativamente com marcadores de DNA de 100 bp (100 Base Pair Ladder – Promega), sendo analisados e fotografados em analisador de imagens (Alphaimager – Alpha esasy FC Software – AlphaInotech Corporation).

Tabela 1. *Primers* e suas propriedades, usadas para identificação e caracterização das cepas de *S. Enteritidis*, isoladas de carcaças de frango.

<i>primer</i>	Sequência	T°C anelamento	pb
<i>csgD</i> F	TGCGGACTCGGTGCTGTTGT		
<i>csgD</i> R	CAGGAACACGTGGTCAGCGG	60°C	123
<i>adrA</i> F	GGGCGGCGAAAGCCCTTGAT		
<i>adrA</i> R	GCCCATCAGCGCGATCCACA	60°C	92
<i>invA</i> F	TCATCGCACCGTCAAAGGAAC		
<i>invA</i> R	GTGAAATTATCGCCACGTTTCGG	60°C	284

T°C: temperatura em graus centígrados; PB: pares de bases.

Os *primers* para os genes *csgD* e *adrA* foram desenhados utilizando o programa Primer Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore>):

csgD: número de acesso: NC 0031971; gene *csgD* 1252660; intervalo: 1229728 - 1230378

adrA: número de acesso: NC 0031971; gene *adrA* 1251904; intervalo: 438129-439241.

2.5. PCR para a pesquisa dos genes produtores de biofilme de *Salmonella*

A extração e amplificação dos DNA para a pesquisa dos genes *csgD* e *adrA* foram realizados conforme o item 2.4. Os primers utilizados e suas características estão listados na Tabela 1.

2.6. Teste de verificação de contaminação cruzada, sem higienização

O peito de frango foi descongelado, após a confirmação da ausência de

Salmonella na amostra e suas medidas foram reduzidas assepticamente a 25,0 cm² (5,0 cm x 5,0 cm).

Cada cepa foi semeada em caldo Infusão de cérebro e coração (BHI- Oxoid) e incubada a 35° C/24 horas. A seguir, a cultura foi diluída até 10⁴ UFC de bactérias/ml com o auxílio do Densicheck (Biomeriéux) e 1,0 mL foi uniformemente espreado na superfície da carne.

Foram avaliadas três superfícies de corte, utilizadas para a manipulação de alimentos: plástico, madeira e vidro.

Em cada superfície, foi delimitada uma área de 100,0 cm² (10,0 cm x 10,0 cm) com tinta permanente e esterilizadas em autoclave a 121°C/15 minutos. A seguir, a superfície de cada material foi contaminada através da fricção, por 30 segundos, do peito contaminado. Essa etapa foi realizada em duplicata.

a) na primeira superfície, foi esfregado um *swab* umedecido na área delimitada que foi colocado num tubo com 3,0 ml de água peptonada tamponada, que foi submetido a um *vortex*, em velocidade máxima, por um minuto, para que as células de *Salmonella* aderidas se desprendessem do algodão. O crescimento das colônias foi verificado em dois momentos distintos. No primeiro, uma alçada dessa água peptonada foi semeada em meio de cultura cromogênico (Chromagar *Salmonella*) e XLD e as placas foram incubadas por 35°C/24 horas. Num segundo momento, após a água peptonada ser incubada a 35°C/24, horas uma alíquota foi semeada nos mesmos meios de cultura.

A pesquisa também foi realizada pela PCR, a partir da água peptonada, após *vortex* e após incubação por 35°C/24 horas.

b) na segunda superfície, foi friccionado um vegetal consumido cru, no caso, um dos ingredientes mais comuns utilizados em saladas, o pepino, previamente lavado e desinfetado com água clorada (250 ppm/15 minutos). Após ser descascado, com faca esterilizada, foi cortado longitudinalmente, em tamanho menor que 10,0 cm. Após a fricção, foi homogeneizado em 225 ml de água peptonada tamponada (diluição 10⁻¹), incubada a 35°C/24 horas, com plaqueamento em ágar cromogênico. A pesquisa também foi realizada pela PCR.

Como já descrito, essa etapa foi realizada em superfícies duplicadas a fim de confirmar se ocorreu a transferência de salmonela da carne para a superfície, pois o *swab* pode capturar a maioria das células, levando a ausência ou a uma contagem

indetectável no vegetal, devido ao baixo número de células residuais, após a primeira fricção.

2.7. Teste de verificação de contaminação cruzada, após higienização

Nesse item, foi repetida toda a metodologia do item 2.6, com a diferença que, depois da contaminação da superfície, houve a lavagem da mesma, antes da contaminação do vegetal.

As superfícies foram lavadas em água corrente fria por 10 segundos, esfregadas de forma vigorosa com esponja de limpeza nova, umedecida em água e acrescida de detergente líquido neutro, por 5 vezes e enxaguadas em água corrente fria por 10 segundos e colocadas para escorrer por 5 minutos.

2.8. Produção e quantificação de biofilme

A produção de biofilme foi testada em três materiais diferentes, madeira, plástico e vidro, pois são os principais materiais usados como das superfícies de corte.

2.8.1. Preparo das placas

Foram utilizados círculos (fichas), com diâmetro de 1 cm de plástico, madeira e vidro. Esses materiais foram devidamente lavados, secos, acondicionados em placas de Petri e autoclavados. A seguir, com o auxílio de uma pinça esterilizada, cada ficha foi depositada no fundo de um poço de uma placa de 24 poços, estéril e com tampa.

Os círculos de plástico e madeira foram obtidos pelo corte de superfícies vendidas comercialmente.

2.8.2. Preparo da cultura e inoculação na placa

As cepas de *Salmonella* que apresentaram os genes *csgD* e *adrA* foram incubadas em caldo Luria bertani (LB) da Oxoid a 35°C/24horas. A seguir, a cultura foi diluída até 10^8 UFC de bactérias, com o auxílio do Densichek (Biomeriéux). Alíquotas de 300 µL dessa diluição foram distribuídas nos poços, e incubadas na temperatura de 35°C/96 horas.

2.8.3. Quantificação da produção de biofilme

As fichas foram transferidas para uma nova placa. Esse passo teve como objetivo evitar a quantificação de biofilme eventualmente produzido no poliestireno, ao redor das fichas de diferentes materiais. Uma vez na placa nova, as fichas foram lavadas três vezes, com solução tampão (PBS, pH 7,4), para a remoção das células não fixadas e coradas com violeta cristal 1%, por 15 minutos. O corante foi removido e a placa, novamente lavada. A seguir, o biofilme foi ressuspendido em 300 µl de ácido acético glacial, por 15 minutos, que assegura a homogeneidade do material corado. Um volume de 200 µl foi transferido para 96 poços de microplacas e sua densidade óptica (DO) lida num leitor de ELISA (Babsystems, Multiskan EX) a 560nm. O LB não inoculado foi utilizado como branco e uma média de três poços foi utilizada para corrigir o valor da absorvância.

A partir da média das três repetições (DO) e de acordo com a relação entre DO e DOc (controle negativo), as amostras foram classificadas segundo Stepanović et al. (2000), em não produtor de biofilme, produtor fraco, moderado ou forte, de acordo com a seguinte fórmula:

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

2.9. Análise Estatística

Os resultados obtidos a partir do teste de contaminação cruzada foram submetidos à análise de variância não paramétrica, teste de Friedman, adotando-se o nível de significância de 5%. Para a análise estatística dos demais resultados foi empregada à análise de variância e a comparação entre as médias foram feitas pelo teste de Student (SNK) a 5% de probabilidade, utilizando o software Sisvar.

Os dados também foram submetidos à análise multivariada de dados, por meio da técnica de Análise de Agrupamentos (Cluster Analysis) adotando-se o método do vizinho mais próximo (Single Linkage) a partir da distância Euclidiana, para descrever a dissimilaridade entre as superfícies de corte avaliadas.

3. RESULTADOS

3.1. Pesquisa dos genes produtores de biofilme

Foram realizadas reações de PCR para pesquisa dos genes *csgD* (Figura 1) e *adrA* (Figura 2), envolvidos na produção de biofilme, nas 26 cepas de *S. Enteritidis* e todas as cepas foram positivas para ambos os genes. Assim, 10 cepas foram randomicamente selecionadas para os testes de verificação de contaminação cruzada e produção de biofilme (controles negativos não apresentados).

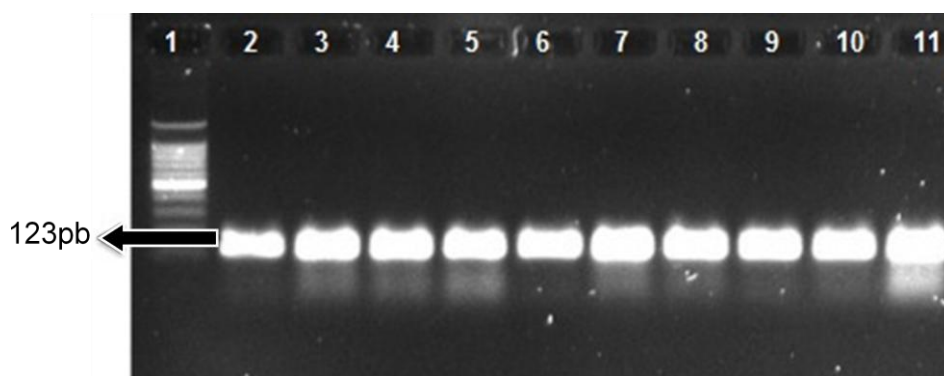


Figura 1. Gel de eletroforese do produto da PRC do gene *csgD*. Poço 1: 100pb ladder; 2: *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028; 3-11: amostras positivas.

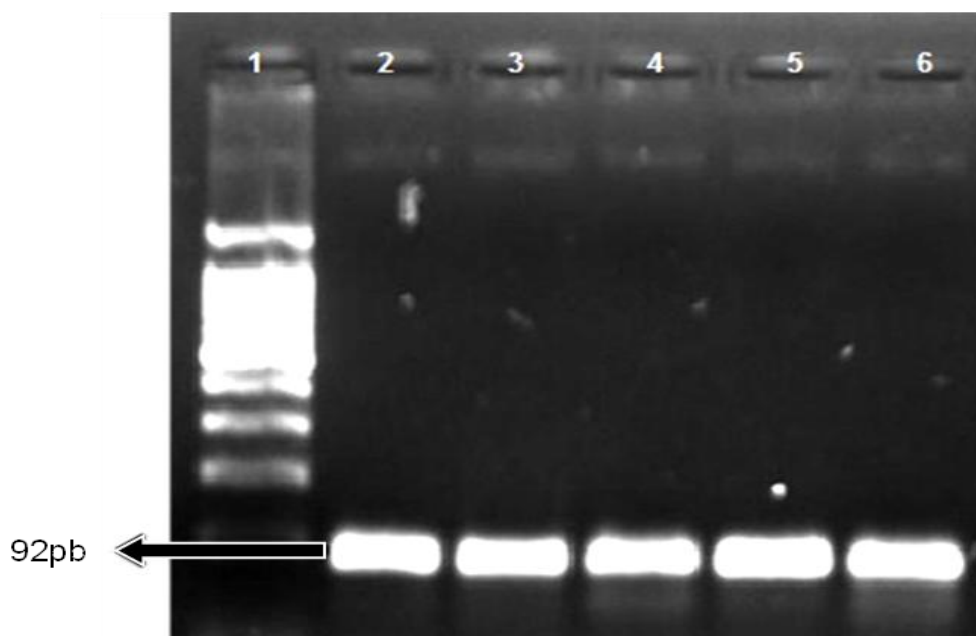


Figura 2. Gel de eletroforese do produto da PCR do gene *adrA*. Poço 1: 100pb ladder; 2: *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028; 3-6: amostras positivas.

3.2. Recuperação de *S. Enteritidis* de superfícies de corte antes e após higienização

Na Tabela 2 estão apresentados os resultados da recuperação das células bacterianas em superfícies de madeira, plástico e vidro após a contaminação, antes e depois da higienização.

Tabela 2. Percentagem de amostras positivas para a pesquisa de 10 cepas de *S. Enteritidis* em superfícies de corte antes e depois da higienização.

	Madeira	Plástico	Vidro	Valor de p
Antes de higienizar	100	100	100	-
Depois de higienizar	90 ^a	30 ^{ab}	10 ^b	0,002

Materiais seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Friedman.

Quando as superfícies não foram higienizadas após o contato com a carne de frango contaminada, houve crescimento bacteriano após o plaqueamento resultante do swab realizado em cada superfície de corte e 100% das amostras foram positivas para todas as superfícies avaliadas.

Em relação às superfícies higienizadas, a madeira apresentou uma maior positividade na recuperação do patógeno, pois 9 das 10 simulações realizadas apresentaram resultado positivo após a análise dos swabs das superfícies. Uma redução no número de amostras positivas para a pesquisa de *S. Enteritidis* foi observada no plástico e vidro: 30% e 10%, respectivamente. Estatisticamente, a superfície de vidro diferiu significativamente das demais, apresentando-se como o material mais fácil de higienizar.

3.3. Contaminação cruzada de *S. Enteritidis* para pepinos, através de superfícies de corte antes e após higienização

Na Tabela 3 são apresentados os resultados da recuperação da população bacteriana de *S. Enteritidis* nos pepinos manipulados nas superfícies de madeira, plástico e vidro antes e após higienização das mesmas.

Tabela 3. Percentagem de amostras positivas para a pesquisa das 10 cepas de *S. Enteritidis* em pepinos manipulados nas superfícies de corte antes e depois da higienização.

	Madeira	Plástico	Vidro	Valor de p
	----- % -----			
Antes de higienizar	100	100	100	-
Depois de higienizar	90 ^a	30 ^{ab}	10 ^b	0,002

Materiais seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo teste de Friedman.

Todos os pepinos manipulados nas superfícies de corte que não sofreram o método de higienização apresentaram *S. Enteritidis*.

Ao observar os resultados das análises microbiológicas nos pepinos manuseados nas superfícies de madeira, plástico e vidro após serem submetidas ao processo de higienização, é possível notarmos que a maior transferência de células bacterianas da superfície de corte para o pepino, ocorreu na superfície de madeira, seguida da superfície de plástico na qual 30% dos pepinos apresentaram positividade para *Salmonella* e por fim da superfície de vidro, com 10% de positividade. Novamente, o vidro foi o material mais higiênico, diferindo estatisticamente da madeira e do plástico.

3.4. Avaliação da produção de biofilme

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados da análise de variância para os valores médios de absorbância (VA). Houve efeito isolado da superfície de corte e das cepas avaliadas. A interação entre os fatores superfície de corte e cepa também foi significativa.

Tabela 4. Análise de variância para os valores médios de absorbância (VA) pelas 10 cepas de *S. Enteritidis* e pela *S. Typhimurium* ATCC 14028 (controle positivo) avaliadas nas superfícies de corte de madeira, plástico e vidro.

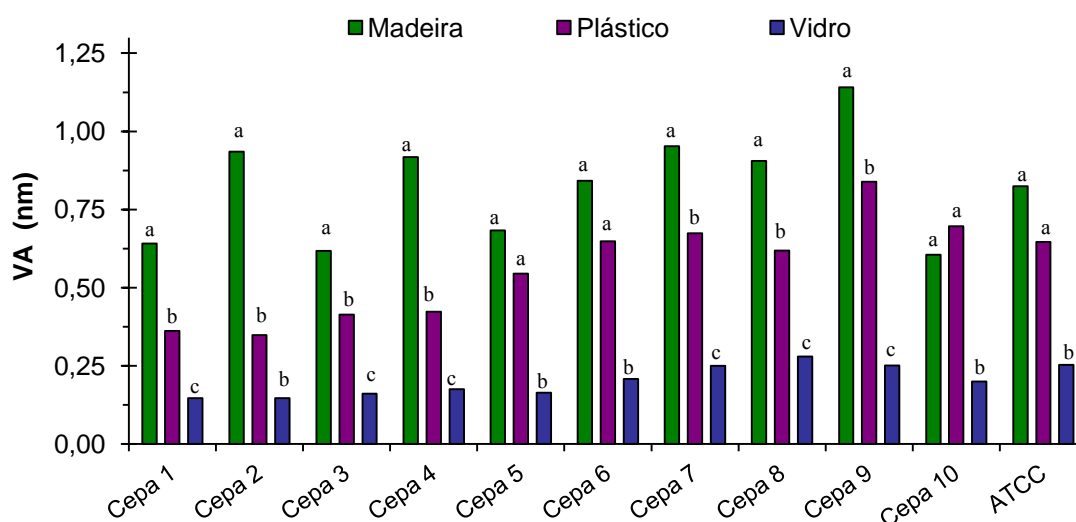
Fontes de variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	Fc
Superfície (A)	2	6,421465	3,210732	207,201*
Cepa (B)	10	0,997888	0,099789	6,44*
A x B	20	0,695203	0,034760	2,243*
Rep	2	0,042913	0,021457	1,385 ^{ns}
Resíduo	64	0,992	0,015	-
Total	98	-	-	-

Coefficiente de variação: 23,45; *significativo a 5% de probabilidade; ^{ns} não significativo.

Na (Figura 3) são apresentados os valores médios de absorvância, em nanômetros, pela leitura em leitor de Elisa. Na superfície de corte de madeira, das dez cepas avaliadas, nove apresentaram os maiores VA, com exceção da cepa 10, que apresentou maior VA sobre a superfície de corte de plástico. Os menores VA ocorreram sobre a superfície de corte de vidro, demonstrando que este material proporciona condições menos favoráveis a produção de biofilme.

As cepas 1, 3, 4, 7, 8 e 9 (Figura 3) apresentaram diferenças estatísticas nos VA. Os maiores VA nessas cepas ocorreram em ordem crescente na superfície de corte vidro < plástico < madeira. Já as cepas 5, 6, 10 e ATCC não apresentaram diferença nos VA quando manipuladas sobre as superfícies de corte de madeira e plástico, mostrando, portanto que esses dois materiais podem ser apropriados para o desenvolvimento de biofilmes por *Salmonella* Enteritidis.

Na superfície de corte de plástico, seis cepas (1, 3, 4, 7, 8 e 9) apresentaram menor VA comparado à madeira e maior do que na de vidro, demonstrando que a superfície de corte de plástico, proporciona condições intermediárias entre os outros dois materiais avaliados. Apenas para a cepa 2, as superfícies de plástico e vidro proporcionaram VA semelhantes (Figura 3).



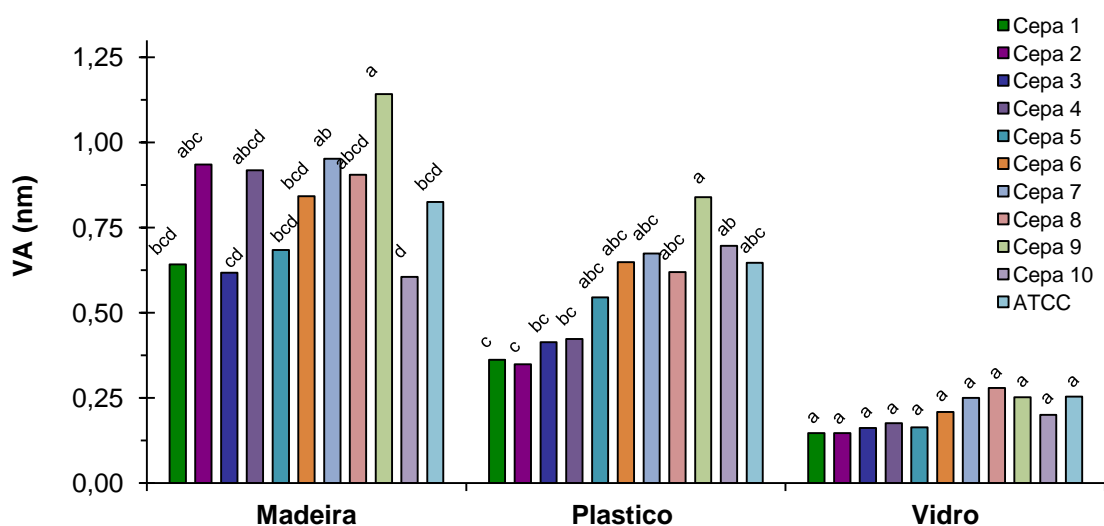
Barras seguidas de mesma letra dentro de cada cepa não diferem significativamente entre si pelo teste de Student a 5% de probabilidade.

Figura 3. Valores médios de absorvância (VA) pelas 10 cepas de *S. Enteritidis* e pela *S. Typhimurium* ATCC 14028 (controle positivo) avaliadas nas superfícies de corte de madeira, plástico e vidro.

Na Figura 4 estão as comparações entre as médias de VA em cada superfície de corte. Pode-se observar que em cada material houve comportamento diferenciado entre as cepas.

Na superfície de corte de madeira e de plástico, a cepa 9 foi a maior produtora de biofilme. A menor produtora de biofilme em madeira foi a cepa 10, contudo quando essa cepa foi avaliada sobre a superfície de corte de plástico, esta foi a segunda maior produtora de biofilme. Estes resultados permitem inferir que a cepa 9 possui relativamente maior capacidade de produzir biofilme nos dois materiais, madeira e plástico. Já a cepa 10 provavelmente encontrou ambiente mais favorável à produção de biofilme sobre a superfície de corte de plástico e se manteve como a segunda mais produtora, portanto a produção pode não estar somente ligada à capacidade genotípica de produção de biofilme de cada cepa, mas também à superfície do material em que a bactéria se instala.

Na superfície de corte de vidro não houve diferença no comportamento das cepas (Figura 4) confirmando os resultados visualizados na Figura 3, mostrando que esse material proporciona condições menos favoráveis a produção de biofilme, independentemente da cepa utilizada.



Barras seguidas de mesma letra dentro de cada superfície de corte não diferem significativamente entre si pelo teste de Student a 5% de probabilidade.

Figura 4. Valores médios de absorvância (VA) pelas 10 cepas de *S. Enteritidis* e pela *S. Typhimurium* ATCC 14028 (controle positivo) avaliadas nas superfícies de corte de madeira, plástico e vidro.

Na Figura 5, o dendrograma gerado pela análise de agrupamentos baseada na variabilidade dos VA pelas 10 cepas de *S. Enteritidis*, além do controle positivo (ATCC) separou as três superfícies de cortes satisfatoriamente em dois ramos distintos. O primeiro ramo é composto pela madeira e plástico, que possuem 45% de semelhança, levando-se em consideração o comportamento das cepas avaliadas.

O segundo ramo foi composto pela superfície de corte de vidro, que apresentou apenas 16% de similaridade com o primeiro ramo (Plástico e Madeira), comprovando que as cepas tiveram comportamentos distintos sob esse material, em relação aos demais.

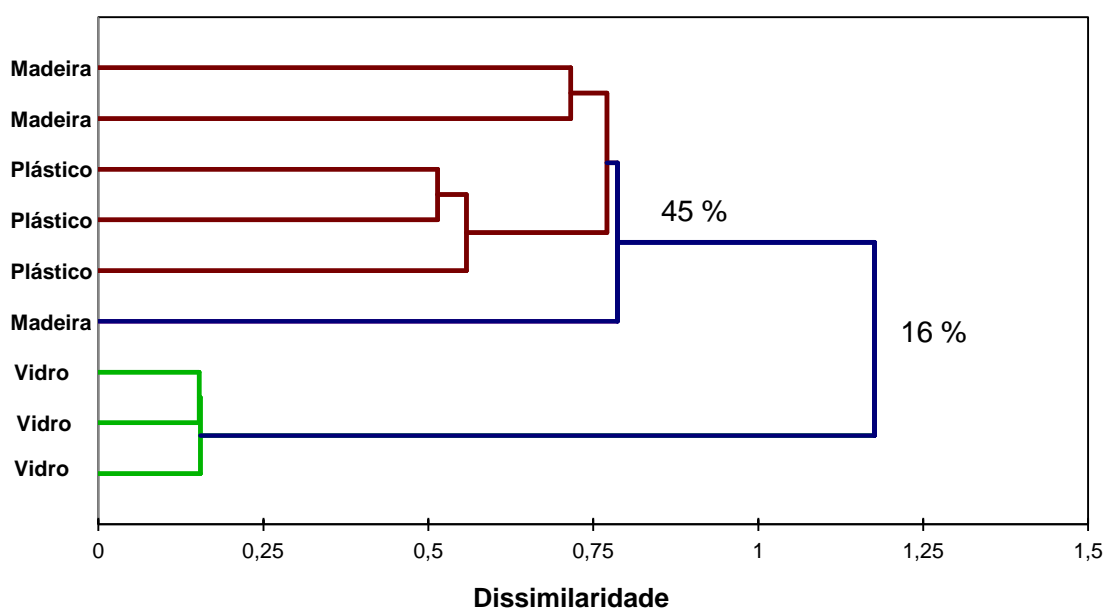


Figura 5. Dendrograma da dissimilaridade baseada na distância euclidiana das superfícies de corte de madeira, plástico e vidro. Análise de Agrupamentos baseada nos valores de absorbância (nm) pelas 10 cepas de *S. Enteritidis* e pela *S. Typhimurium* ATCC 14028 (controle positivo) sobre as superfícies de corte.

3.5. Quantificação biofilme

Com base na leitura da densidade óptica (DO) na produção de biofilme das cepas, estas foram classificadas de acordo Stepanović et al. (2000), em não produtor de biofilme, fraco, moderado ou forte produtor (Tabela 5).

Tabela 5. Quantificação de biofilme, produzido pelas 10 cepas de *S. Enteritidis*, nos diferentes tipos de superfície de corte.

Material	NP	Fraco	Moderado	Forte	Total de Produtores
Madeira	4	5	1	0	6
Plástico	6	4	0	0	4
Vidro	9	1	0	0	1

NP: não produtor

4. DISCUSSÃO

Surtos de salmonelose vinculados à contaminação cruzada tem se destacado devido ao fato das células de *Salmonella* permanecerem viáveis nas superfícies de contato com alimentos por um longo período, aumentando o risco de contaminação cruzada entre os alimentos, os manipuladores de alimentos e as superfícies de corte (CARRASCO et al., 2012).

Ao analisarmos as Tabela 2 e Tabela 3, pode-se observar que, na ausência de higienização, após a contaminação das superfícies de corte com a carne de frango, houve recuperação de células de *Salmonella* de todas as superfícies e de todos os pepinos manipulados nelas. Este resultado também foi observado por outros autores que usaram *Salmonella* como contaminante das superfícies (KUSUMANINGRUM et al., 2003; MOORE et al., 2007).

Ravishankar et al. (2010) estudaram a transferência de *S. Newport* de frangos para alface através de superfícies de corte e faca em diversos cenários de limpeza. Quando os utensílios não eram higienizados após sua utilização, a transferência foi 2,21 logs UFC/cm² da carne de frango para a superfície de corte e 2,09 logs UFC/cm² da carne para a faca. A taxa de transferência da superfície de corte e da faca para a alface foi de 2,97 logs UFC/cm², isso mostra que as bactérias presente na superfície, onde a carne de frango crua foi manipulada e na faca utilizada foram facilmente transferidas para a alface. Essa mesma situação foi constatada por Soares et al. (2012), que analisaram a taxa de transferência de *S. Enteritidis* de pele de frango contaminada para diferentes superfícies de corte (madeira, plástico com triclosan, vidro e aço inox) e destas para tomates.

Por esses resultados, observa-se o quão grande é o risco de ocorrer contaminação cruzada durante o manuseio e preparo de alimentos em superfícies de corte sem nenhum tipo de higienização.

No dia a dia, durante o preparo de carne de frango contaminada por *Salmonella* e *Campylobacter* pode ocorrer a disseminação desses patógenos para as mãos e para as

superfícies de contato com alimentos, existentes nas cozinhas (SCOOT, 2000). É essencial a aplicação de procedimentos de higienização durante a manipulação e preparo dos alimentos para garantir a redução da contaminação microbológica em superfícies de corte evitando a ocorrência de contaminação cruzada e assegurando a inocuidade dos alimentos (BARKER et al., 2003; CARRASCO et al., 2012).

Desta forma, esse estudo avaliou a higienização das superfícies de corte através do uso de água para enxague das superfícies juntamente com a esfregação manual com esponja e detergente neutro, prática comumente empregada durante a limpeza das superfícies e utensílios usados para o preparo dos alimentos.

O resultado após o processo de higienização (Tabela 2) mostrou que quando comparado ao plástico e vidro, a recuperação das células bacterianas foi significativamente maior na madeira e, portanto mais difícil de higienizar quando comparada as outras superfícies de corte, destacando-se a superfície de vidro que apresentou o menor risco de contaminação cruzada quando o procedimento correto de higienização é aplicado. Cogan et al. (1999) demonstraram que a higienização das superfícies de contato com alimentos após a preparação dos mesmos teve uma redução de contaminação cruzada por *Campylobacter* e *Salmonella* para os alimentos na cozinha.

Resultado semelhante foi descrito por Barker et al. (2003), ao compararem métodos de higienização em superfícies de corte, facas, panos de prato e mãos dos manipuladores de alimentos concluíram que a combinação da lavagem dos utensílios com água e detergente proporcionou uma redução do risco de contaminação microbológica.

Em menor frequência, células de *S. Enteritidis* foram recuperadas das amostras de pepinos manipuladas nas diferentes superfícies de corte higienizadas (Tabela 3). Ravishankar et al. (2010), após a manipulação de carne de frango contaminada, recuperaram pequenos números de *Salmonella* nas superfícies de corte higienizadas com detergente, água quente e esfregação mecânica e em alfaces manipuladas posteriormente nessas superfícies, demonstrando a importância desse processo na diminuição na ocorrência de contaminação cruzada a partir das superfícies de corte. Soares et al. (2012) também observaram uma significativa redução na contaminação das superfícies de corte e nas células de *Samonella* recuperadas nas amostras de tomate ao associar o uso de detergente, água e esfregação mecânica durante a higienização. Esses resultados demonstraram que esse procedimento causou redução na contaminação, mas

não foi eficaz na completa remoção das células patogênicas.

Foram pesquisados, por meio da técnica de PCR, os genes *csgD* e *adrA* em 26 cepas de *S. Enteritidis* isoladas em estudos prévios. Todas as cepas apresentaram positividade para ambos os genes. Com relação à presença de genes responsáveis pela formação de biofilme, resultado semelhante foi encontrado por Oliveira (2011) que avaliou a expressão das características morfológicas *red*, *dry* e *rough* (*rdar*) (vermelha, seca e rugosa), resultante da produção de celulose e fímbrias *curli* em *Salmonella* sp., isoladas de carcaças de frango, em temperaturas de 28° C e 35° C. Verificou-se a presença dos dois genes em 100% das 174 cepas analisadas, sendo que 80% (n=96) expressaram a característica *rdar*, indicando a formação de biofilme.

Embora todas as cepas tenham sido positivas para os genes relacionados com a produção de biofilme, nem todas foram capazes de expressar a matriz nas diferentes superfícies de corte testadas. Isto pode ser explicado pelo fato de que a formação de biofilme sofre interferência de fatores extrínsecos que interferem na expressão dos genes e que outros genes também possam estar envolvidos na produção de biofilme. Stepanović et al. (2003) constataram que a regulação da formação de biofilme por *Salmonella* spp. é muito complexo, uma vez que, o promotor de atividade *csgD* é regulado por uma interação dinâmica entre fluxo de nutriente e disponibilidade de oxigênio.

A maioria dos fatores de virulência das bactérias do gênero *Salmonella*, como a presença de plasmídeos e estruturas como fímbrias bacterianas e produção de celulose, está codificada em genes agrupados em Ilhas de Patogenicidade (IPs) (VIEIRA, 2009), que nessas bactérias são chamadas de *Salmonella Pathogenicity Islands* (SPI) (BARROW et al, 2010). Algumas delas são conservadas entre os diferentes sorovares de *Salmonella*, indicando que foram adquiridas há muito anos (HENSEL, 2004; BARROW et al., 2010).

A formação de biofilme é um modelo bacteriano conhecido por permitir o crescimento e a sobrevivência dos micro-organismos nele envolvido, protegendo-o de estresses ambientais como a limpeza de superfícies usadas para preparo de alimentos. A contaminação cruzada entre alimentos crus e alimentos processados através das superfícies de contato com esses alimentos representa um evento perigoso, pois *Salmonella* é capaz de aderir a essas superfícies e conseqüentemente formar biofilmes (CARRASCO et al., 2012). Uma vez formado o biofilme, esse se transforma numa fonte de contaminação para os alimentos manipulados e preparados nessas superfícies

tornando-as uma ameaça constante a segurança alimentar (ADETUNJI; ISOLA, 2011; CARRASCO et al., 2012).

A adesão da bactéria e a posterior formação de biofilme dependem de três fatores: das células bacterianas, da superfície e dos fatores ambientais. A superfície das células bacterianas é carregada negativamente, tornando-a adversa a adesão, devido à força de repulsão eletrostática. Porém, as superfícies das células bacterianas podem possuir fimbrias, flagelos e lipopolissacarídeo (LPS) conferindo-lhes hidrofobicidade. Interações hidrofóbicas entre a superfície das células e do substrato podem permitir que as células superem as forças repulsivas e sejam capazes de aderirem e produzirem biofilme. Além disso, as propriedades das superfícies de fixação são fatores que afetam o potencial de formação de biofilme e determinam a facilidade de higienização (GIAOURIS et al., 2013).

Uma variedade de materiais, tais como madeira, plástico e vidro, são utilizados na confecção de utensílios e superfícies de corte, usados no preparo dos alimentos. Dessa forma, foi analisada a formação de biofilme em superfícies hidrofóbicas (madeira e plástico) e hidrofílicas (vidro) A maior porcentagem de produção de biofilme ocorreu na madeira e no plástico (60% e 40%, respectivamente) seguido pelo vidro (10%). Estudos realizados por Sinde e Carballo (2000) demonstraram que *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* aderiram melhor a superfícies hidrofóbicas sendo capazes de produzir biofilme nessas superfícies.

Entre as 10 cepas testadas, três (30%) não foram capazes de produzir biofilme em nenhuma das superfícies analisadas, apesar da presença dos genes *csgD* e *adrA*. Assim, 70% das cepas foram capazes de expressar a matriz exopolissacarídica em um dos materiais em questão. Lu et al. (2011) encontraram 62,9% das amostras positivas para a produção de biofilme.

De acordo com a Tabela 5, 70% das cepas foram capazes de produzir biofilme, sendo fracos ou moderados produtores. Resultado semelhante ao encontrado por Stepanović et al. (2004) que analisaram a intensidade da produção de biofilme de 122 cepas de *Salmonella* sp em superfície de plástico, no qual 72,9% foram classificadas como produtoras de biofilme. As cepas 2, 4, 6, 7 e 8 foram classificadas como fraco produtor de biofilme e a cepa 9 como moderado produtor na superfície de madeira, ao observarmos a Figura 4, vemos que na madeira, a cepa 9 foi a que apresentou estatisticamente maior produção de biofilme. Já no plástico, as cepas classificadas como fraco produtor foram 6, 7, 9 e 10 e no vidro somente a cepa 8 enquadrou-se na

classificação de fraco produtor.

As propriedades físico-químicas dos diferentes materiais utilizados na confecção das superfícies podem influenciar a aderência de micro-organismos. (SINDE; CARBALLO, 2000; JOSEFH et al., 2001 DONLAN, 2002; DONLAN; COSTERTON, 2002). Gouch e Dodd (1998) ao estudarem a possibilidade de contaminação cruzada por superfícies de corte observaram maior permanência de *Salmonella* Typhimurium em superfícies de corte de madeira devido à dificuldade de higienização. Stepanović et al. (2004) ao avaliarem a produção de biofilme por *Salmonella* spp. constataram que essa bactéria possui alta capacidade de formação de biofilme em superfícies de plástico. Em um estudo Adetunji e Isola (2011) avaliaram a produção de biofilme por *Listeria monocytogenes* e *Listeria spp.* em superfícies de madeira, aço inox e vidro e como resultado houve uma maior formação de biofilme na superfície de madeira.

Oliveira (2011) avaliando a produção de biofilme por *Salmonella* em diferentes temperaturas e diferentes materiais observou que o vidro foi o material que apresentou o maior número de cepas não produtoras de biofilme, resultado semelhante ao encontrado no nosso estudo.

Nos países desenvolvidos houve uma redução do uso da madeira como superfície de contato com alimentos por ser um material poroso e absorvente, no qual a matéria orgânica e as bactérias podem penetrar nesse material promovendo assim a ocorrência de contaminação cruzada, comportando-se como um importante veículo de disseminação de micro-organismos patogênicos responsáveis por causar infecções de origem alimentar (ADETUNJI; ISOLA, 2011). O vidro por sua vez é o material mais indicado para a fabricação de superfícies que entrem em contato com alimentos, devido à sua superfície lisa e à sua resistência a corrosão (ADETUNJI; ISOLA, 2011; SREY et al., 2013).

A capacidade das bactérias em formar biofilme não varia muito, apenas entre as espécies. A força de formação de biofilme pode variar significativamente dentro das mesmas espécies entre as diferentes cepas e sorovares. Essa variação dentro das espécies aliada a outros fatores, como as propriedades das superfícies e disponibilidade de nutrientes, faz como que um tipo de bactéria comporte-se como um forte produtor de biofilme em um determinado ambiente e em outra situação torne-se um fraco produtor de biofilme (SREY et al., 2013). Patel e Sharma (2010) ao testarem a capacidade de formação de biofilme, em alface e repolho, de cinco diferentes sorovares de *Salmonella enterica* observaram que os sorovares Tennessee e Thompson produziram mais biofilme

quando comparados aos sorovares Braenderup, Negev e Newport. Essa diferença pode ser notada em nosso estudo, onde as dez cepas testadas tiveram comportamentos variados entre os diferentes materiais estudados (Figura 3).

Todas as superfícies que entram em contato com os alimentos são susceptíveis a colonização por micro-organismos se os procedimentos de higienização não forem executados corretamente. É importante salientar que os biofilmes são conhecidos pela sua resistência à ação de antimicrobianos, de sanitizantes, além de serem difíceis de erradicar.

5. CONCLUSÃO

Pela presença de *Salmonella* Enteritidis nos pepinos, as superfícies de corte representam risco de contaminação cruzada durante a manipulação de alimentos, principalmente se não higienizadas corretamente.

Essas superfícies influenciam na capacidade de adesão e de produção de biofilme, pelas bactérias, devendo ser também de fácil higienização e por isso, o vidro foi o melhor material. O uso da madeira é altamente não recomendado, entretanto, superfícies de corte de plástico também devem ser evitadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADETUNJI, V. O.; ISOLA, T. O. Crystal violet binding assay for assessment of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* and *Listeria spp* on wood, steel and glass surfaces. **Global Veterinarian**, v. 6, n. 1, p. 6-10, 2011.

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

ARNOLD, T.; SCHOLZ, H. C.; MARG, H.; ROSLER, 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 B**, v.51, n.10, p. 459-463, 2004.

BARKER, J.; NAEENI, M.; BLOOFIELD, S. L. The effects of cleaning and disinfection in reducing *Salmonella* contamination in a laboratory model kitchen. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 1351-1360, 2003.

BARROW, P. A.; JONES, M. A.; THOMSON, N. *Salmonella*. In: GYLES, C. L.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, G.; THOEN, C. O. (Ed.) **Pathogenesis of bacterial infection in animals**, 4.ed. Ames: Blackwell Publishing, 2010. p.231-266.

CARRASCO, E.; MORALES-RUEDA, A.; GARCÍA-GIMENO, R. M. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. **Food Research International**, v. 45, p. 545-556, 2012.

CHAVES, L. C. D. **Estudo da cinética de formação de biofilmes em superfícies em contato com água potável**. 2004. 156f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia do Ambiente) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga.

COGAN, T. A.; BLOOMFIELD, S. F.; HUMPHREY, T. J. The effectiveness of hygiene procedures for prevention of cross-contamination from chicken carcasses in the domestic kitchen. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29,p. 354-358, 1999.

DAVEY, M. E.; O'TOOLE, G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v. 64, p. 847-867, 2000.

DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, v. 8, n. 9, p. 881-890, 2002.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2, p. 167–193, 2002.

GERSTEL, U.; RÖMLING, U. The *csgD* promoter, a control unit for biofilm formation in *Salmonella* Typhimurium. **Research in Microbiology**. v. 154, p. 659–667, 2003.

GIAOURIS, E.; HEIR, E.; HÉBRAUD, M.; CHORIANOPOULOS, N.; LANGSRUD, R.; MORETRO, T.; HABIMANA, O.; DESVAUX, M.; RENIER, S.; NYCHAS, G. Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: Causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods. *Meat Science* (2013).

GOUCHN. L.; DODD, C. E. R. The survival and disinfection of *Salmonella* Typhimurium on chopping board surfaces of wood and plastic. **Food Control**, v. 9, n. 6, p. 363-368, 1998.

HENSEL, M. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. **International Journal of Medical Microbiology**. v.294, p.95-102, 2004.

JOSEPH, B.; OTTA, S.K.; KARUNASAGAR, I. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. **International Journal of Food Microbiology**, v.64, p.367-372, 2001.

KIM, S. H.; WEI, C. I. Molecular characterization of biofilm formation and attachment of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 on food contact surfaces. **Journal of Food Protection**. v. 72, n. 9, p. 1841-1847, 2009.

KUSUMANINGRUM, H. D.; RIBOLDI, G.; HAZELEGER, W. C.; BEUMER, R. R. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. **International Journal of Food Microbiology**, v. 85, p. 227-236, 2003.

KYAW, C.M. **Biofilmes Microbianos**, 2008. Disponível em <www.unb.br/ib/cel/microbiologia/biofilme/biofilme.html>. Acesso em 10 de maio de 2013.

LIANOU, A.; KOUTSOUMANIS, K. P. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. **International**

Journal of Food Microbiology, v. 160, p. 171-178, 2012.

LU, Y.; DONG, H.; CHEN, S.; CHEN, Y.; PENG, D.; LIU, X. Characterization of biofilm formation by *Salmonella enterica* serovar Pullorum strains. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 17, p. 2428-2437, 2011.

LUBER, P. Cross-contamination versus undercooking of poultry meat or eggs — which risks need to be managed first? **International Journal of Food Microbiology**, v. 134, p. 21-28, 2009.

MELCHIOR, M. B.; VAN OSCH, M. H. J.; GRAAT, R. M.; VAN DUIJKEREN, E.; MEVIUS, D. J.; NIELEN, M.; GAASTRA, W.; FINK-GREMMELS, J. Biofilm formation and genotyping of *Staphylococcus aureus* bovine mastitis isolates: Evidence for lack of penicillin-resistance in Agr-type II strains. **Veterinary Microbiology**, v. 137, p. 83–89, 2009.

MESSIAS, G.M. **Aspectos higiênico-sanitários, manipuladores de alimentos, gerentes e consumidores: situações das lanchonetes tipo *fast food* da cidade do Rio de Janeiro, RJ**. 2007. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

MOORE, G.; BLAIR, I.S.; MCDOWELL, D.A. Recovery and transfer of *Salmonella* Typhimurium from four different domestic food contact surfaces. **Journal of Food Protection**, v.70, n.10, p. 2273-2280, 2007.

MORITA, Y.; KOMODA, E.; ONO, K.; KUMAGAI, S. Survival of biofilm-forming *Salmonella* on stainless steel bolt threads under dry conditions. **Journal of the Food Hygienic Society of Japan**. v. 52, n. 5, p. 299-303, 2011.

OLIVEIRA, D. C. V. **Produção de biofilme por *Salmonella* sp. isolada de frango**. 2011. 83f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

PATEL, J.; SHARMA, M. Differences in attachment of *Salmonella enterica* serovars to cabbage and lettuce leaves. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139, p. 41-47, 2010.

RAVISHANKAR, S.; ZHU, L.; JARONI, D. Assessing the cross- contamination and transfer rates of *Salmonella enteric* from chicken to lettuce under different food-handling scenarios. **Food Microbiology**, p. 1-4, 2010.

RAZA, A.; SARWAR, Y.; ALI, A.; JAMIL, A.; HAQUE, A.; HAQUE, A. Effect of biofilm formation on the excretion of *Salmonella enterica* serovar Typhi in feces. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, p. e747-e752, 2011.

ROHDE, H.; FRANKENBERGER, S.; ZÄHRINGER, U.; MACK, D. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. **European Journal of Cell Biology**, v. 89, p. 103–111, 2010.

SCOTT, E. Relationship between cross-contamination and the transmission of foodborne pathogens in the home. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, v. 19, n. 10, p. s111-s113, 2000.

SHINOHARA, N.K.S.; BARROS, V. B.; JIMENEZ, S. M. C.; MACHADO, E. C. L.; DUTRA, R. A. F.; FILHO, J. L. L. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.13, n.5, p. 1675-1683, 2008.

SINDE, E.; CARBALLO, J. Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber, and polytetrafluorethylene: The influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. **Food Microbiology**, v. 17, p. 439-447, 2000.

SOARES, V. M.; PEREIRA, J. G.; VIANA, C.; IZIDORO, T. B.; BERSOT, L. S.; PINTO, J. P. A. N. Transfer of *Salmonella* Enteritidis to four types of surfaces after cleaning procedures and cross-contamination to tomatoes. **Food Microbiology**, v. 30, p. 453-456, 2012.

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

STEPANOVIĆ, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiology Methods**, v.40, p.175–179, 2000.

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**, v. 20, p. 339-343, 2003.

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

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

WANG, H.; YE, K.; ZHANG, Q.; DONG, Y.; XU, X.; ZHOU, Z. Biofilm formation of meat-borne *Salmonella enterica* and inhibition by the cell-free supernatant from *Pseudomonas aeruginosa*. **Food Control**, v. 32, p. 650-658, 2013.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Food borne disease: A focus for health education**. Geneva: World Health Organization, 2000.