

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE BIOFILME POR CEPAS DE
SALMONELLA ENTERITIDIS E *S. HEIDELBERG* ISOLADAS DE FONTES
AVÍCOLAS EM PLACAS DE POLIESTIRENO FRENTE A DIFERENTES
TEMPERATURAS**

SARA NEVES SOUZA

**Porto Alegre
2015/1**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

Avaliação da capacidade de formação de biofilme por cepas de *Salmonella* Enteritidis e *S.* Heidelberg isoladas de fontes avícolas em placas de poliestireno frente a diferentes temperaturas

Autora: Sara Neves Souza

Trabalho apresentado à Faculdade de Veterinária como requisito parcial para graduação em Medicina Veterinária

Orientador: Hamilton Luiz de Souza Moraes

Co-orientadora: Karen Apellanis Borges

**PORTO ALEGRE
2015/1**

Dedico este trabalho aos meus pais, Paulo Renato e Rosa Maria, que sempre priorizaram a minha educação e os meus estudos, mesmo com todas as dificuldades. Tenho certeza que, de onde quer que estejam, estão felizes com essa conquista.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a todos que estiveram comigo nessa longa trajetória: família, amigos, colegas e professores. Sem vocês, eu não encontraria forças para chegar até aqui. Vocês estiveram comigo para que eu não desistisse do meu maior sonho: ser Médica Veterinária.

Agradeço aos meus pais (*in memoriam*) por tudo o que sou hoje. Obrigada pelo amor incondicional, pelo incentivo e apoio na realização dos meus sonhos. Obrigada pelo carinho, pela compreensão, pela educação e por tudo o que fizeram por mim. Vocês são os meus maiores exemplos de amor, dedicação, persistência, integridade e responsabilidade. Meus maiores exemplos de vida. Eternamente, obrigada.

Agradeço ao meu namorado Gustavo, por todo o apoio, amor, carinho, companheirismo, compreensão, paciência e por todos os dias em que estudamos juntos, buscando a realização profissional e um futuro promissor. Obrigada por andares ao meu lado nessa vida.

Agradeço a todos do CDPA pela oportunidade de ter convivido com vocês durante dois anos e meio, por tudo o que aprendi e pelas amizades que fiz. Obrigada, Karen e Thales, por me ensinarem de forma admirável tudo o que vocês sabem, por me fazerem acreditar em mim mesma e pela confiança depositada. Vocês são meus exemplos de Médicos Veterinários responsáveis, competentes e íntegros.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Hamilton, pela confiança para a realização deste trabalho e por todos os ensinamentos durante o tempo em que estive no CDPA. Agradeço a Karen, por ser minha co-orientadora neste trabalho e por todo o auxílio prestado.

RESUMO

A presença de *Salmonella* spp. nos plantéis avícolas gera implicações econômicas e em saúde pública, uma vez que é um importante agente causador de doenças transmitidas por alimentos, especialmente através do consumo da carne de frango e de ovos contaminados. Os sistemas atuais de produção de alimentos de origem animal oferecem condições ideais para a formação dos biofilmes, que funcionam como pontos de contaminação de microrganismos patogênicos. Os biofilmes contribuem com o aparecimento de surtos de infecções alimentares envolvendo *Salmonella* spp. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de biofilme por cepas de *Salmonella* pertencentes a dois sorovares frequentemente isolados de produtos avícolas, frente a diferentes temperaturas de incubação para simular as condições às quais normalmente são submetidos os produtos de origem avícola desde o campo até o momento do consumo. Foram avaliadas 70 cepas de *S. Enteritidis* e 49 de *S. Heidelberg* quanto a sua capacidade de produzir biofilme em placas de poliestireno incubadas a 37°C. A classificação foi realizada com base nas leituras da densidade óptica dos isolados, diferenciando-os em quatro classificações: não produtores, fracamente, moderadamente ou fortemente produtores de biofilmes. As cepas classificadas como não produtoras ou como fortemente produtoras a 37°C foram selecionadas para avaliação do seu comportamento a 3°C e a 15°C. 88,2% das cepas foram capazes de produzir biofilme quando testadas em temperatura de ótimo crescimento (37°C), mas apenas 10,1% se aderiram fortemente à superfície. 84,3% das cepas de *S. Enteritidis* e 93,9% de *S. Heidelberg* foram capazes de produzir biofilme a 37°C. Entretanto, apenas *S. Enteritidis* se aderiu fortemente à placa de poliestireno. Quando testadas a 15°C e a 3°C, algumas cepas reduziram sua capacidade de adesão, enquanto outras adquiriram esta habilidade. O número de cepas fortemente produtoras de biofilme diminuiu, mas a quantidade de isolados capaz de se aderir aumentou nestas temperaturas. Os resultados demonstram que as cepas de *Salmonella* spp. podem aderir de forma eficaz às superfícies de poliestireno, e que a capacidade de formação de biofilme tende a variar conforme o sorovar. Entretanto, as variações entre os isolados indicam que a formação de biofilmes é cepa-dependente. A temperatura de incubação também influenciou na formação de biofilmes. Desta forma, o controle da temperatura a que são submetidos os produtos de origem avícola é essencial desde o matadouro-frigorífico até a residência do consumidor. É importante que haja um controle sanitário rígido em toda a cadeia avícola, assim como a garantia de processos de higienização eficazes na indústria de alimentos, a fim de se prevenir o aparecimento de *Salmonella* spp. e a sua manutenção no ambiente.

Palavras-chave: *Salmonella*, adesão, poliestireno, biofilme.

ABSTRACT

The presence of Salmonella spp. in poultry flocks generates economic and public health implications, since it is an important causative agent of foodborne diseases, especially through consumption of poultry meat and contaminated eggs. Current systems of animal food production provides ideal conditions for biofilms formation, which act as contamination points of pathogenic microorganisms. Biofilms contribute to the foodborne outbreaks involving Salmonella spp. The aim of this study was to evaluate the biofilm production by Salmonella spp. strains belonging to two frequently isolated serotypes from poultry products, in different incubation temperatures, to simulate the conditions to which the poultry source products are usually subjected from the field to the moment of consumption. We evaluated 70 S. Enteritidis and S. 49 Heidelberg strains isolated from poultry sources and its ability to produce biofilm on polystyrene plates incubated at 37°C. The classification was based on optical density of the isolated, differentiating them into four classifications: non-producing, weak, moderate or strong producers of biofilms. Strains classified as not producer or as strong producers at 37°C were selected for assessment of its behavior to 3°C and 15°C. 88.2% of the strains were able to produce biofilm when tested in optimal growth temperature (37°C), but only 10.1% strongly adhered to the surface. 84.3% of S. Enteritidis and 93.9% of S. Heidelberg strains were able to produce biofilm at 37°C. However, only S. Enteritidis was strongly adhered to the polystyrene plate. When tested at 15°C and 3°C, some strains reduced their adhesion capacity, while others have acquired this ability. The number of strongly producing strains of biofilm decreased, but the amount of isolates able to adhering increased. The results showed Salmonella spp. strains can effectively adhere to polystyrene surfaces and the biofilm formation capacity tends to vary according to the serotype. Meanwhile, variations between isolates indicate that the biofilms formation is strain-dependent. The incubation temperature also influenced the biofilms formation. Thus, temperature control at which the poultry derived products are subjected is essential since the slaughter plant to the consumer's residence. A strict sanitary control throughout the poultry chain is important, as well as ensuring efficient cleaning processes in the food industry, in order to prevent the occurrence of Salmonella spp. and their environment maintenance.

Key-words: Salmonella, adhesion, polystyrene, biofilm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Etapas do teste de avaliação da capacidade de produção de biofilme.....	19
Figura 2 -	Classificação das cepas (%) de <i>S. Enteritidis</i> e <i>S. Heidelberg</i> quanto à capacidade de formação de biofilmes a 37°C	20
Figura 3 -	Classificação das cepas fortemente produtoras de biofilmes a 37°C, quando testadas com temperaturas de incubação de 15°C e de 3°C (n=12)	22
Figura 4 -	Classificação das cepas não produtoras de biofilmes a 37°C, quando testadas com temperaturas de incubação de 15°C e de 3°C (n=17)	22
Figura 5 -	Figura 5 – Comportamento das cepas de <i>S. Enteritidis</i> classificadas como não produtoras ou como fortemente produtoras de biofilme a 37°C, frente às temperaturas de incubação de 15°C e 3°C	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
≥	Maior ou igual
>	Maior
≤	Menor ou igual
<	Menor
μL	Microlitro
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHI	Infusão Cérebro-Coração (<i>Brain-Heart Infusion</i>)
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças (<i>Center for Disease Control and Prevention</i>)
CDPA	Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária
CGVS	Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde
DO	Densidade Óptica (controle negativo)
DOa	Densidade Óptica (amostra)
DTA	Doença Transmitida por Alimento
EUA	Estados Unidos da América
EVA	Equipe de Vigilância de Alimentos
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
pH	Potencial Hidrogeniônico
RS	Rio Grande do Sul
SES	Secretária Estadual da Saúde (RS)
SMS	Secretaria Municipal da Saúde (Porto Alegre)
TSA	Ágar Trypticase de Soja (<i>Tryptic Soy Agar</i>)
TSB	Caldo Trypticase de Soja (<i>Tryptic Soy Broth</i>)
UBPA	União Brasileira de Proteína Animal
UFC	Unidade Formadora de Colônia

UFRGS Universidade Federal do Rio Grande do Sul
USDA Departamento de Agricultura dos EUA (*United States Department of Agriculture*)
WHO Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*)
XLD Ágar Xilose Lisina Desoxicolato

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	Características do gênero <i>Salmonella</i>	12
2.2	Infecção nas aves	12
2.3	Infecção no homem	13
2.4	A importância de <i>Salmonella</i> spp. em saúde pública	13
2.5	<i>Salmonella</i> spp. e a produção de biofilmes	15
3	MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1	Cepas de <i>Salmonella</i>	17
3.2	Teste para avaliar a capacidade de produção de biofilme	17
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5	CONCLUSÕES	25
	REFERÊNCIAS	26
	APÊNDICE A – Classificação das cepas conforme a produção de biofilme	30

1 INTRODUÇÃO

Segundo dados da União Brasileira de Proteína Animal (UBPA), o Brasil encerrou o ano de 2013 como o terceiro maior produtor mundial de carne de frango, produzindo 12,3 milhões de toneladas, o que corresponde a 16,1% da produção mundial. Em 2013, o Brasil exportou 3,9 milhões de toneladas de carne de frango, mantendo-se como o maior exportador. Nas projeções para 2015, o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos aponta um aumento de 5% na produção e uma expansão de quase 12% nas exportações brasileiras, além de um aumento no consumo per capita de carne de frango. Entre os principais estados exportadores de carne de frango no Brasil, destacam-se os três estados da Região Sul, sendo o Paraná o maior exportador (29,4%), seguido por Santa Catarina (24,1%) e Rio Grande do Sul (18,3%), o que representa mais de 70% do total das exportações brasileiras.

A globalização aumentou a demanda por alimentos, exigindo da indústria alimentícia uma produção em maior escala. Esta exigência teve influência direta na expansão da avicultura industrial, resultando em um maior desenvolvimento econômico e social dos países, especialmente para os grandes produtores e exportadores de carne de frango, como o Brasil. A maior concentração de aves no ambiente de produção aumentou o risco de disseminação de doenças. Entre estas doenças, têm especial importância aquelas que podem ser transmitidas ao homem através dos alimentos, como a salmonelose. Além de interferir nas exportações do produto brasileiro e refletir na economia do país, a *Salmonella* spp. é um problema em saúde pública, pois é um importante agente causador de surtos de doenças transmitidas por alimentos, especialmente através do consumo da carne de frango e de ovos.

Os sistemas atuais de produção de alimentos de origem animal são locais muito propícios à formação de biofilmes, uma vez que oferecem as condições ideais para o seu desenvolvimento. Os biofilmes funcionam como um ponto de contaminação, na qual há a liberação de microrganismos patogênicos e deteriorantes, que podem comprometer a qualidade microbiológica dos alimentos. A formação de biofilmes na cadeia de produção de alimentos de origem animal é um fator que contribui com o aparecimento de surtos de infecções alimentares, uma vez que pode ocorrer a contaminação dos produtos devido ao contato do alimento com a superfície contaminada. As bactérias que fazem parte de um

biofilme apresentam características diferentes, sendo mais resistentes às defesas do hospedeiro e aos antimicrobianos, além de terem uma maior capacidade de compartilhar material genético.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de biofilme por cepas de *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg* em placas de poliestireno frente a diferentes temperaturas de incubação, simulando as condições às quais normalmente são submetidos os produtos de origem avícola, desde o campo até o momento do consumo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características do gênero *Salmonella*

Os microrganismos pertencentes ao gênero *Salmonella* são considerados cosmopolitas e pertencem à família das enterobactérias. São classificados como bacilos curtos, Gram negativos, aeróbios e anaeróbios facultativos, não possuem cápsula e não formam esporos. São bactérias móveis (com exceção dos sorovares *S. Pullorum* e *S. Gallinarum*) e possuem flagelos peritríquios. Para o crescimento adequado, o pH ideal é 7, mas também crescem em pH entre 4 e 9. A temperatura ótima de crescimento é 37°C, mas crescem em variações entre 5° e 45°C (GAST, 1997; GAST, 2008).

O gênero *Salmonella* é dividido em duas espécies: *S. bongori* e *S. enterica*, sendo a 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* e *S. enterica* subespécie *indica*. As espécies podem ser diferenciadas por análise antigênica ou pelas características bioquímicas. Neste gênero, a *Salmonella enterica* subespécie *enterica* é a mais comumente encontrada, podendo atingir uma frequência de isolamento de 99,5% (GRIMONT; WEILL, 2007). As subespécies de *Salmonella* podem ser divididas ainda em 50 sorogrupos, classificados com base no antígeno O (POPOFF; LE MINOR, 1997). Os dois principais sorogrupos são o B e o D₁ (POPOFF, 2001). No grupo B estão sorovares como *S. Typhimurium* e *S. Heidelberg* e no grupo D₁ se destaca a *S. Enteritidis*. Atualmente, já foram identificados mais de 2.500 sorovares dentro do gênero *Salmonella*, sendo que cerca de 60% deles pertencem à subespécie *enterica* (GRIMONT; WEILL, 2007; LIBBY *et al.*, 2008).

2.2 Infecção nas aves

Nas aves, a *Salmonella* spp. pode causar três doenças: Pulorose, Tifo e Paratifo Aviário. Adaptados às aves, os sorovares da Pulorose (*S. Pullorum*) e do Tifo (*S. Gallinarum*) foram praticamente erradicados dos plantéis avícolas industrializados devido ao aumento das medidas de controle e biosseguridade nos últimos anos (SILVA; DUARTE, 2002; BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009), apesar do recente aumento do

número de casos de Tifo Aviários (dados não publicados). Estes dois sorovares representam um grande problema para a indústria avícola, pois ocasionam perdas econômicas nos plantéis avícolas devido à diminuição do ganho de peso, às condenações ao abate, ao aumento da mortalidade e aos abates de lotes (SILVA; DUARTE, 2002; BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009). O Paratifo Aviário é causado pelos sorovares que não são adaptados às aves, como *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (GAST, 2008; BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009). Estes sorovares são mais importantes em questões de saúde pública do que pelo impacto econômico que causam em plantéis acometidos (CHARLTON *et al.*, 2006), pois podem permanecer no trato digestivo das aves até o período de abate, contaminando o produto final, ou no trato reprodutor das aves poedeiras, contaminando os ovos produzidos. São considerados os principais sorovares responsáveis pelas infecções alimentares em humanos (CHARLTON *et al.*, 2006; GAST, 2008; BERCHIERI JÚNIOR; FREITAS NETO, 2009).

2.3 Infecção no Homem

Em geral, a ocorrência da salmonelose em humanos está relacionada com o consumo de alimentos contaminados, principalmente carnes e ovos. O período de incubação pode variar de 6 até 48 horas (DARWIN; MILLER, 1999; FORSHELL; WIERUP, 2006). Os sinais clínicos geralmente incluem diarreia, náusea, dor abdominal e febre, mas também podem ocorrer vômitos, anorexia, prostração e dores de cabeça. Os pacientes normalmente se recuperam em até uma semana (FORSHELL; WIERUP, 2006). A severidade da doença depende do sorovar e da imunidade do hospedeiro. Pacientes imunologicamente debilitados podem apresentar quadros clínicos mais severos, enquanto que em adultos saudáveis a enterite é geralmente auto limitante (WALLIS; GALYOV, 2000).

2.4 A importância de *Salmonella* spp. em saúde pública

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO), *Salmonella* spp. é o mais comum agente causador de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) em todo o mundo

(WHO, 2013). Apesar de o número exato de casos clínicos não ser conhecido devido à subnotificação, sua distribuição ocorre em praticamente todos os países (CDC, 2012). Nos EUA, pesquisas realizadas pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) estimam que, a cada novo ano, a *Salmonella* spp. acomete mais de 1 milhão de pessoas, resultando em, aproximadamente, 23.000 hospitalizações e 450 mortes (CDC, 2015).

No Brasil, a *Salmonella* spp. é o agente etiológico mais isolado em surtos de DTAs, sendo responsável por mais de 1.564 casos de DTA entre os anos 2000 e 2014. Em 2013, o Ministério da Saúde registrou 800 surtos de DTAs e 14.640 pessoas doentes no Brasil. Entre os meses de janeiro e agosto de 2014, foram registrados somente quatro surtos de DTAs relacionados à *Salmonella* spp., enquanto que no mesmo período de 2013 ocorreram 27 casos (FOOD SAFETY BRAZIL, 2015). Porém, é importante ressaltar que o número real de casos não é conhecido devido às subnotificações, pois os microrganismos patogênicos presentes nos alimentos em geral causam sintomas brandos e as pessoas acometidas acabam não procurando o auxílio médico. Sabe-se que as residências são os principais locais de ocorrência dos surtos, seguidos dos serviços de alimentação, tais como padarias e restaurantes (FOOD SAFETY BRAZIL, 2015). As regiões sul e sudeste concentram o maior número de casos de salmonelose (FOOD SAFETY BRAZIL, 2015). Contudo, este dado pode ser resultado de uma vigilância mais ativa e de uma maior notificação dos surtos por estas regiões.

Segundo dados epidemiológicos da Secretária Estadual da Saúde do Rio Grande do Sul (SES/RS), o estado teve 132 surtos notificados e 1.150 pessoas doentes devido à ingestão de comidas ou bebidas contaminadas por microrganismos patogênicos em 2012. Entre os alimentos que apresentaram maior incidência e suscetibilidade à contaminação estão a maionese e os produtos à base de ovos, que correspondem a cerca de 570 surtos contabilizados desde 2000 (SES, 2015). No período entre 2003 e 2011, no município de Porto Alegre, a Equipe de Vigilância de Alimentos (EVA) da Coordenadoria Geral de Vigilância em Saúde da Secretaria Municipal da Saúde (CGVS/SMS) investigou 163 surtos de DTA, sendo que destes, 14% foram causados por *Salmonella* spp. (NASCIMENTO, 2013).

Em 2008, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), os cinco sorovares mais frequentemente isolados de carcaças de frango e aves vivas no Brasil foram:

S. Enteritidis, *S. Infantis*, *S. Typhimurium*, *S. Heidelberg* e *S. Mbandaka* (ANVISA, 2008). Em um estudo mais recente realizado em três estados brasileiros, 15 sorovares de *Salmonella* spp. foram isolados de carcaças de frango, sendo os mais comuns: *S. Minnesota*, *S. Infantis*, *S. Heidelberg*, *S. Senftenberg* e *S. Mbandaka* (VOSS-RECH *et al.*, 2015).

2.5 *Salmonella* spp. e a produção de biofilmes

Os alimentos podem servir de veículo para microrganismos patogênicos, representando um risco à saúde do consumidor. Para garantir a qualidade microbiológica do produto final, a higiene correta no processamento e manipulação desses alimentos é extremamente importante em todos os estágios de produção (DIEZ- GARCIA *et al.*, 2012). Quando ocorrem falhas no processo de higienização, os resíduos podem ficar aderidos aos equipamentos e às superfícies, transformando-se em potenciais fontes de contaminação na indústria de alimentos. Ao aderirem-se às superfícies, os microrganismos interagem com estes resíduos e formam estruturas conhecidas como biofilmes (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Os biofilmes são comunidades celulares sésseis que se aderem a uma superfície e que estão envoltos por uma matriz extracelular formada por exopolissacarídeos (DONLAN; COSTERTON, 2002). Eles se estabelecem quando a massa bacteriana é espessa o bastante para agregar nutrientes, resíduos e outros organismos (ZOTTOLA; SASAHARA, 1994). A associação dos organismos em biofilmes constitui uma forma de proteção ao seu desenvolvimento, favorecendo relações simbióticas e permitindo a sobrevivência em ambientes hostis (ARAÚJO, 2007). As bactérias que fazem parte de um biofilme apresentam características diferentes daqueles que estão em sua forma livre, sendo mais resistentes às defesas do hospedeiro e aos antimicrobianos, além de terem uma maior capacidade de compartilhar material genético (JOHNSTON; JONES, 1995).

A formação do biofilme inicia-se com a adesão bacteriana à superfície do material. Inicialmente, há uma interação entre a bactéria e o substrato que envolve forças eletrostáticas e de Van der Waals, assim como interações hidrofóbicas, sendo esta fase conhecida como aderência reversível (COSTERTON *et al.*, 1995). A aderência torna-se irreversível quando o microrganismo está ancorado por apêndices ou por produção de polímeros extracelulares. Os microrganismos aderem mais facilmente às superfícies

hidrofóbicas (poliestireno e PVC) do que às hidrofílicas (vidro e aço inox) (SINDE; CARBALLO, 2000). Diferentes sinais ambientais, como osmolaridade, temperatura, concentração de O₂ e CO₂, pH, compostos nitrogenados e disponibilidade de nutrientes geraram respostas nas regulações gênicas das bactérias, como por exemplo na formação do biofilme (GUINEY, 1995).

A eliminação do biofilme das instalações de processamento de alimentos é um grande desafio, uma vez que a matriz de polissacarídeos pode atuar como um substrato para outros microrganismos patogênicos que são menos propensos à formação de biofilme (LAPIDOT; ROMLING; YARON, 2006). O tempo de formação do biofilme depende da frequência de limpeza e dos regimes de desinfecção. A limpeza imprópria e a desinfecção ineficaz dos equipamentos estão entre as principais causas da formação dos biofilmes (JESSENS; LAMMERT, 2003). Uma vez que o biofilme microbiano tem o potencial de atuar como fonte crônica de contaminação por patógenos, poderá comprometer a qualidade do alimento e representar graves riscos à saúde do consumidor (LAPIDOT; ROMLING; YARON, 2006).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os equipamentos utilizados pertencem ao laboratório e à Universidade.

3.1 Cepas de *Salmonella*

Foram analisadas 119 cepas de *Salmonella* spp., sendo 70 pertencentes ao sorovar *S. Enteritidis* e 49 ao sorovar *S. Heidelberg*, todas isoladas de fontes avícolas. Todos os isolados estavam estocados a -80°C em caldo cérebro coração (*Brain Heart Infusion* – BHI) com glicerol. A reativação foi feita através da inoculação de uma alíquota do estoque em caldo BHI e posterior semeadura em ágar xilose lisina desoxicolato (XLD) para confirmação da pureza das cepas.

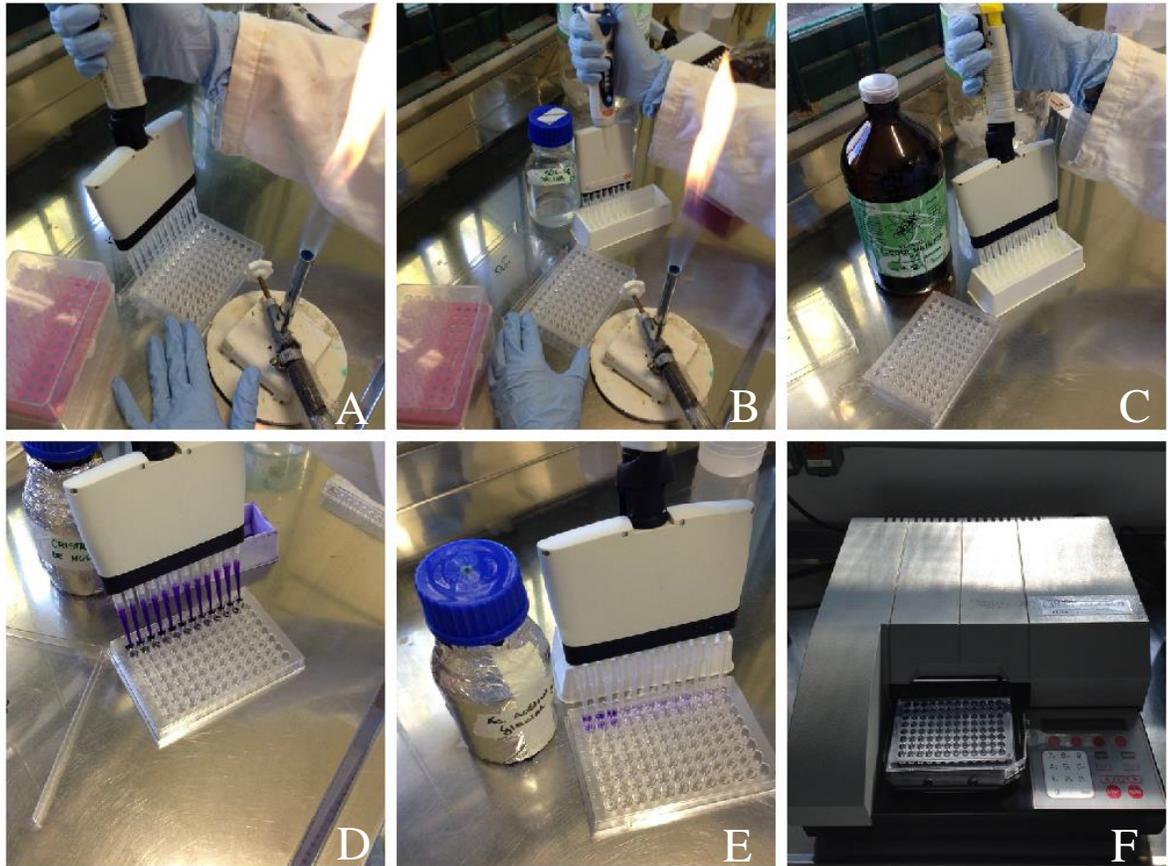
3.2 Teste para avaliar a capacidade de produção de biofilme

A metodologia foi adaptada a partir dos trabalhos de Stepanović *et al.* (2000) e de Rodrigues *et al.* (2009). Para este experimento, as cepas foram testadas em três diferentes temperaturas de incubação: 37°C (temperatura ótima de crescimento), 15°C (temperatura média da sala de cortes de um matadouro-frigorífico) e 3°C (temperatura média de uma geladeira comum).

As cepas foram inoculadas em ágar tripticase de soja sem glicose (*Tryptic Soy Agar* – TSA) e incubadas a 37°C por 18-24 horas em estufa bacteriológica. Posteriormente, foram inoculadas em caldo tripticase de soja sem glicose (*Tryptic Soy Broth* – TSB) e foram novamente incubadas a 37°C por 18-24 horas em estufa bacteriológica. Em seguida, alíquotas do caldo cultivado *overnight* foram diluídas em 2mL de caldo TSB não inoculado até que correspondesse a escala 1 de McFarland. Foram inoculados 200µL da suspensão bacteriana preparada para cada cepa, em triplicata, em placas de poliestireno de 96 poços com fundo chato. Para a primeira parte do trabalho, as cepas foram incubadas apenas a 37°C por 18-24 horas em estufa bacteriológica. O controle negativo de cada placa foi o caldo TSB não inoculado, também adicionado em triplicata na microplaca. Foi utilizada

uma cepa padrão de *S. Enteritidis* (ATCC 13076) e duas cepas de *S. Enteritidis* pertencentes à bacterioteca do laboratório como controles positivos dos testes. Após a incubação, a suspensão bacteriana de cada poço foi removida (Figura 1A). As placas foram lavadas três vezes com 250µL de solução de cloreto de sódio a 0,9% (Figura 1B) e foram levemente secas. A fixação das células bacterianas aderidas foi feita com 200µL de metanol por 15 minutos (Figura 1C). As placas foram coradas com 200µL de cristal violeta de Hucker a 2% durante 5 minutos (Figura 1D). Em seguida as placas foram lavadas em água corrente e secas à temperatura ambiente. Antes da leitura, foram adicionados 200µL de ácido acético glacial 33% (Figura 1E). A densidade óptica foi medida em leitor de ELISA com filtro 550nm (Figura 1F). O valor da densidade óptica de cada cepa (DO_a) foi obtido através da média aritmética dos valores dos três poços. Esse valor foi comparado com a média da densidade óptica do controle negativo (DO). Para determinar o grau de produção de biofilme das cepas foi utilizada a seguinte classificação: não produtora ($DO_a \leq DO$), fracamente produtora ($DO < DO_a \leq 2.DO$), moderadamente produtora ($2.DO < DO_a \leq 4.DO$) ou fortemente produtora ($4.DO < DO_a$) de biofilmes. As cepas classificadas como não produtoras ou como fortemente produtoras a 37°C foram selecionadas para avaliação do seu comportamento frente às temperaturas de 3°C e 15°C.

Figura 1 – Etapas do teste de avaliação da capacidade de produção de biofilme



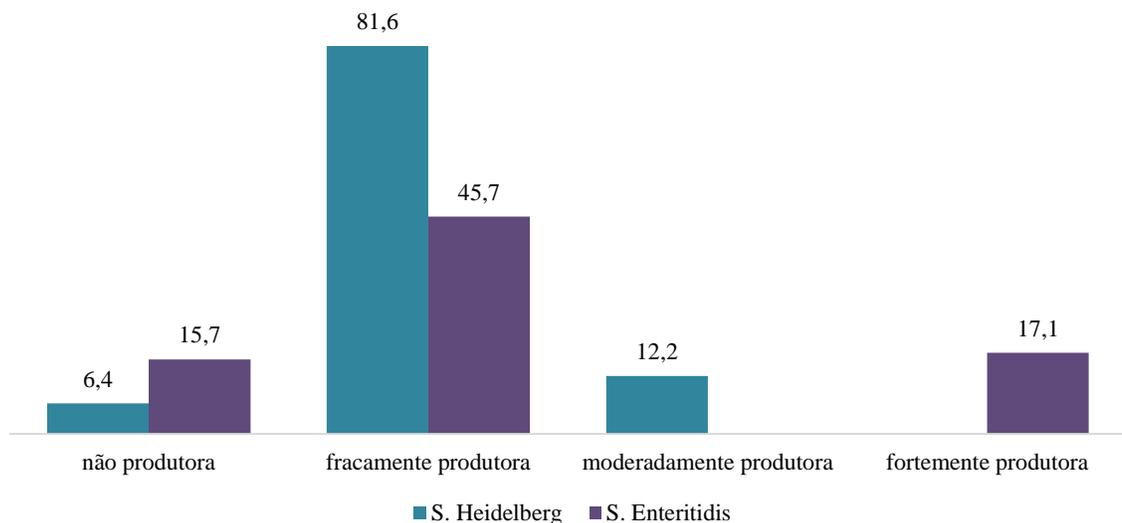
Legenda: Sequência do teste de avaliação de biofilme após o período de incubação: remoção da suspensão bacteriana incubada (A), lavagem das placas com solução de cloreto de sódio a 0,9% (B), fixação com metanol das células aderidas (C), coloração das células fixadas com cristal violeta de Hucker a 2% (D), adição de ácido acético glacial 33% (E) e leitura da densidade óptica em leitor de ELISA (F).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a temperatura de 37°C, os isolados foram classificados conforme a capacidade de formação de biofilme. A classificação para cada uma das cepas está descrita no APÊNDICE A, mostrando que 88,2% (105/119) das cepas avaliadas foram capazes de produzir biofilme a 37°C. Entretanto, apenas 27,7% do total avaliado se aderiram de forma moderada ou forte à superfície. Estudos anteriores têm demonstrado uma relação entre a capacidade de formação de biofilmes *in vitro* através da utilização de placas de poliestireno e a capacidade de *Salmonella* spp. em aderir às superfícies das instalações de indústrias alimentícias (PATEL; SHARMA, 2010). Já foi demonstrado que as bactérias deste gênero aderem mais fortemente às superfícies hidrofóbicas (borracha e plástico) do que às superfícies hidrofílicas (aço inoxidável e vidro). Esta pode ser uma explicação para os resultados encontrados, levando-se em consideração que a adesão é o primeiro passo no processo de formação do biofilme (TONDO *et al.*, 2010; STEENACHERS *et al.*, 2012).

Para observar a relação do sorovar com a capacidade da cepa em produzir biofilmes, foram comparadas as classificações dos sorovares *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg*. Na Figura 2 está representada a classificação das cepas de *S. Heidelberg* e de *S. Enteritidis* quando incubadas a 37°C.

Figura 2 – Classificação das cepas (%) de *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg* quanto à capacidade de formação de biofilmes a 37°C



Entre as amostras testadas, 84,3% das cepas de *S. Enteritidis* e 93,9% de *S. Heidelberg* foram capazes de produzir biofilme a 37°C. Apesar de um maior número de cepas de *S. Heidelberg* ser capaz de produzir biofilmes, a maioria delas só se adere fracamente à superfície de poliestireno. Apenas os isolados de *S. Enteritidis* foram capazes de se aderir fortemente a esta superfície. Não existem muitos estudos que comparam os sorovares de *Salmonella* spp. quanto à formação de biofilmes. Alguns deles relatam que a capacidade de formação de biofilmes não está relacionada com os sorovares, pois esta formação é altamente cepa-dependente (LIANOU; KOUTSOUMANIS, 2012). Entretanto, outros autores indicam que o sorovar pode influenciar na capacidade de adesão de *Salmonella* spp. (AGARWAL *et al.*, 2011; DÍEZ-GARCÍA *et al.*; 2012). Schonewille *et al.* (2012) observou que a capacidade de formação de biofilmes é altamente dependente do sorovar. Segundo os autores, os sorovares fortemente capazes de produzir biofilmes são *S. Enteritidis*, *S. Livingstone*, *S. Paratyphi B*, *S. Virchow*, *S. Saintpaul*, e *S. Infantis*.

Para o teste com as temperaturas de incubação de 3°C e 15°C, foram selecionados apenas os isolados classificados como não produtores ou como fortemente produtores de biofilmes a 37°C. No total, foram avaliadas 12 cepas fortemente produtoras (todas pertencentes ao sorovar *S. Enteritidis*) e 17 não produtoras (14 de *S. Enteritidis* e três de *S. Heidelberg*). Nas Figuras 3 e 4 está demonstrado o comportamento das cepas classificadas como fortemente produtoras e como não produtoras de biofilme a 37°C frente às temperaturas de incubação de 3°C e 15°C.

Figura 3 - Classificação das cepas fortemente produtoras de biofilmes a 37°C, quando testadas com temperaturas de incubação de 15°C e de 3°C (n=12)

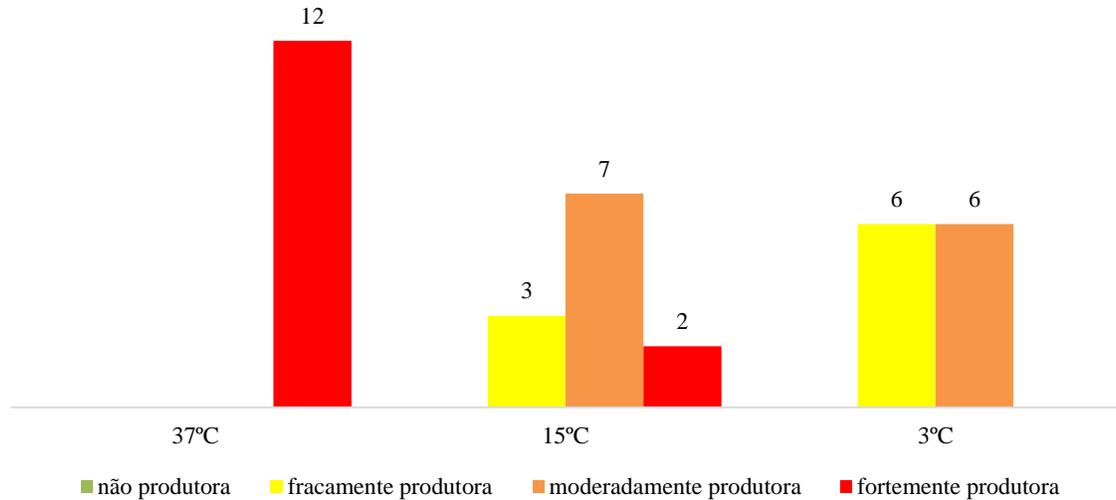
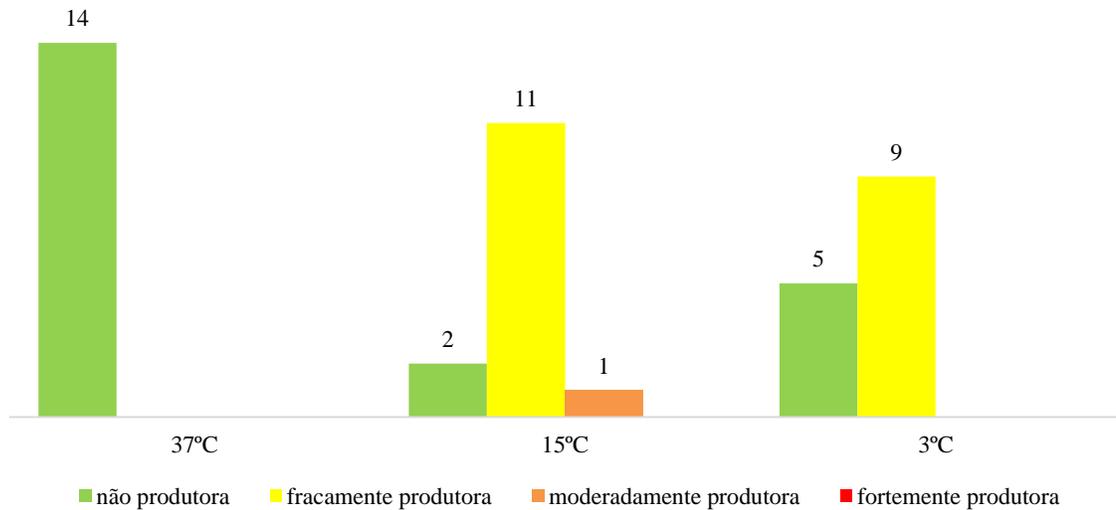


Figura 4 - Classificação das cepas não produtoras de biofilmes a 37°C, quando testadas com temperaturas de incubação de 15°C e de 3°C (n=17)

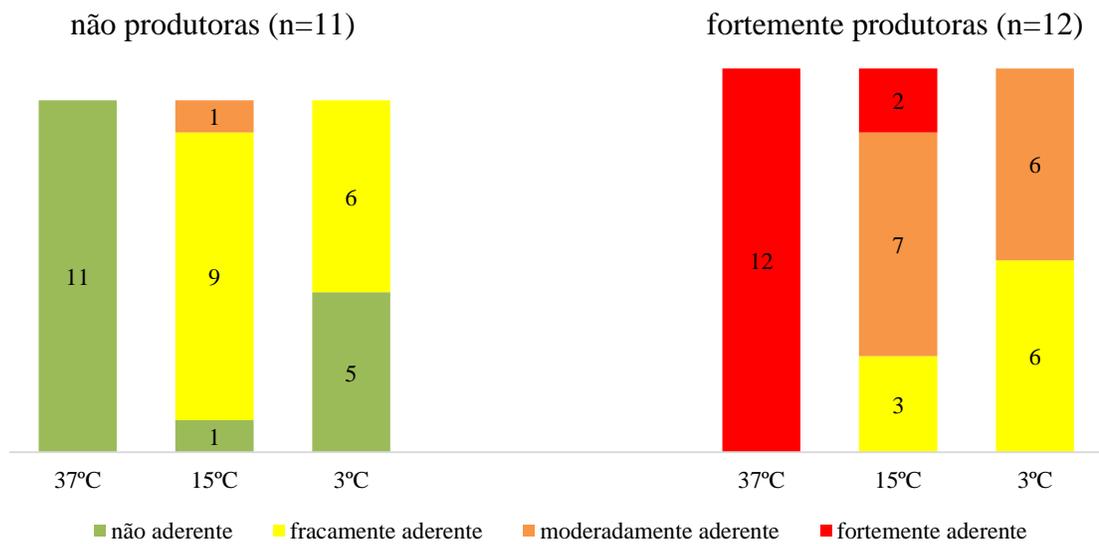


Nenhuma das cepas classificadas como fortemente produtoras de biofilmes a 37°C foi classificada como não produtora quando incubadas a 15°C e a 3°C. Por outro lado, o número de isolados que se aderiram fortemente à superfície diminuiu nas duas temperaturas testadas. Enquanto nenhuma cepa se aderiu de maneira forte a 3°C, apenas duas cepas se aderiram fortemente à superfície a 15°C. Também se observou que a maioria das cepas

ficou aderida de forma moderada à superfície estudada em ambas as temperaturas. Em relação às cepas classificadas como não produtoras a 37°C, observou-se que este número diminuiu, ou seja, em temperaturas menores de incubação, algumas cepas adquiriram a capacidade de produzir biofilme e de se aderirem à superfície de poliestireno. Contudo, nenhuma cepa foi capaz de se aderir fortemente à superfície e apenas uma se aderiu de forma moderada a 15°C. Todas as demais cepas foram classificadas como fracamente produtoras de biofilme em ambas as temperaturas avaliadas. Estudos anteriores testaram os parâmetros ambientais com relevância para a indústria de alimentos e demonstraram que a temperatura de incubação pode afetar a capacidade de formação de biofilmes por *Salmonella* spp. (SCHONEWILLE *et al.*, 2012; STEENACHERS *et al.*, 2012). A variabilidade de formação de biofilme tende a aumentar à medida que as condições ambientais relacionadas à temperatura tornam-se menos favoráveis para o microrganismo (LIANOU; KOUTSOUMANIS, 2012; SCHONEWILLE *et al.*, 2012).

Foi feita a análise individual dos sorovares a fim de observar as variações entre eles. A Figura 5 demonstra o comportamento das 23 cepas de *S. Enteritidis* (12 fortemente produtoras e 11 não produtoras) testadas frente a diferentes temperaturas de incubação.

Figura 5 – Comportamento das cepas de *S. Enteritidis* classificadas como não produtoras ou como fortemente produtoras de biofilme a 37°C, frente às temperaturas de incubação de 15°C e 3°C



Quando as temperaturas testadas foram de 15°C e 3°C, observou-se que as cepas de *S. Enteritidis* alteraram seu padrão de produção de biofilmes. Apesar de as temperaturas de incubação serem menos favoráveis a 3°C, o que poderia favorecer a formação de biofilmes para as cepas não produtoras a 37°C (LIANOU; KOUTSOUMANIS, 2012; SCHONEWILLE *et al.*, 2012), não se observou aumento da capacidade de produção quando comparado à temperatura de 15°C. Independente da temperatura testada, observa-se que o sorovar *S. Enteritidis* possui uma alta capacidade de formação de biofilmes em superfícies de poliestireno.

Os resultados obtidos neste trabalho são preocupantes, uma vez que os materiais plásticos são frequentemente utilizados nos matadouros frigoríficos, nas indústrias de processamento de alimentos, nas cozinhas e em instrumentos de corte (STEPANOVIĆ *et al.*, 2004; STEENACHERS *et al.*, 2012). Além disto, os biofilmes formados por *Salmonella* spp. podem servir de substrato para outros microrganismos patogênicos que possuem menor capacidade de formação de biofilme (LAPIDOT; ROMLING; YARON, 2006). A eliminação do biofilme das instalações de processamento de alimentos é um grande desafio, por isto a indústria deve promover processos eficazes de higienização de sua instalação. É necessário, também, que haja um controle rígido frente às diferentes temperaturas de incubação dos produtos, desde o campo até o momento do consumo, diminuindo os riscos potenciais à saúde do consumidor.

5 CONCLUSÕES

Foi demonstrado que as bactérias do gênero *Salmonella* são capazes de se aderirem de forma eficaz às placas de poliestireno. Foram observadas diferenças entre os sorovares, sendo *S. Enteritidis* capaz de se aderir mais fortemente do que as cepas de *S. Heidelberg*. A temperatura de incubação possui influência na formação de biofilmes, podendo indicar que esta seja uma maneira de adaptação aos diferentes ambientes.

Desta forma, é importante que haja um controle rígido da sanidade animal em toda a cadeia avícola, de modo a prevenir o aparecimento de *Salmonella* spp. bem como a sua permanência nos ambientes de produção de alimentos através da formação de biofilmes. A indústria deve promover processos eficazes de higienização de sua instalação. Além disso, o controle das temperaturas a que são submetidos os produtos de origem avícola é essencial.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, R.K. *et al.* Optimization of microtiter plate assay for the testing of biofilm formation ability in different *Salmonella* serotypes. **International Food Research Journal**, v.18, p. 1493–1498, 2011.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frangos. Brasília, DF, 2008.
- ARAÚJO, F. **Adesão de isolados clínicos e alimentares de *Salmonella Enteritidis* a superfícies de processamento de alimentos**. 2007.76 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade de Minho, Braga, 2007.
- BERCHIERI, J.A.; FREITAS, N. O. C. Salmoneloses. *In*: BERCHIERI JR., Angelo. *et al.* (Ed.). **Doenças das Aves**, 2. ed., São Paulo: Editora FACTA, 2009. cap.4, p. 435–450.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 2015. **Salmonella. Technical Information**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/salmonella/general/technical.html>>. Acesso em: 15 maio 2015.
- CHARLTON, B.R. *et al.* Salmonellosis. *In*: CHARLTON, Bruce. *et al.* (Ed.). **Avian Disease Manual**, 6.ed., Georgia: Editora AAAP, 2006. p. 106-114.
- COSTERTON, J.W. *et al.* Microbial biofilms. **Annual Review Microbiology**, v. 49, p. 711-745, 1995.
- DARWIN, K.H.; MILLER, L.V. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 3, p. 405–428, July 1999.
- DIEZ- GARCIA, M.; CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C. Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. **Food Microbiology**, v. 31, p. 173–180, Apr. 2012.
- DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.M. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Review**, v. 15, p. 167-193, Apr. 2002.
- FOOD SAFETY BRAZIL, 2015. Surtos alimentares no Brasil- dados atualizados em 2014. **Food Safety**. Disponível em: <<http://www.foodsafetybrazil.org/surtos-alimentares-no-brasil-dados-atualizados-em-2014>>. Acesso em: 15 maio 2015.
- FORSHELL, P.L.; WIERUP, M. *Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal food products. **Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties**, v. 25, p. 541-554, Aug. 2006.
- GAST, R.K. Detecting infections of chicken with recent *Salmonella Pullorum* isolates using standard serological methods. **Poultry Science**, v. 76, p. 17-23, Jan. 1997.

GAST, R. K. Paratyphoid infections. *In*: SAIF, Y.M. *et al.* (Ed.). **Disease of Poultry**, 12. ed., Iowa: Editora Blackwell Publishing Professional, 2008. p. 636-665.

GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F.X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. **WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*-Institut Pasteur**, Paris, 2007.

GUINEY, D. G. *et al.* Biology and clinical significance of virulence plasmids in *Salmonella* serovars. **Clinical Infectious Diseases**, v. 21, p. 146–151, Oct. 1995.

JOHNSTON JESSENS, B.; LAMMERT, L. Biofilm and disinfection in meat processing plants. **International Biodeterioration e Biodegradation**, v. 51, p. 265-269, 2003.

JOHNSTON, M.D.; JONES, M.V. Disinfection tests with intact biofilms: combined use of de Modified Robbins Device with impedance detections. **Journal of Microbiological Methods**, v. 21, p. 15–26, 1995.

LAPIDOT, A.; ROMLING, U.; YARON, S. Biofilm formation and the survival of *Salmonella* Typhimurium on parsley. **International Journal of Food Microbiology**, v. 109(3), p. 229–233, June 2006.

LIANOU, A.; KOUTSOUMANIS, P.K. Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.160, p. 171–178, 7 Oct. 2012.

LIBBY, S.J. *et al.* *Salmonella*. *In*: GYLES., Carlton. *et al.* (Ed.). **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**, 3.ed. Iowa: Blackwell Publishing Professional, 2008. cap.14, p. 143-167.

NASCIMENTO, C.B. **Surtos de toxinfecção alimentar notificados e investigados no município de Porto Alegre no período de 2003 a 2011**. 2013. 36 f. Monografia (Especialização em Produção, Higiene e Tecnologia de Produtos de Origem Animal), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

OLIVEIRA, K. *et al.* Comparison of the adhesion ability of different *Salmonella* Enteritidis serotypes to materials used in kitchens. **Journal of Food Protection**, v. 69, p. 2352–2356, Oct. 2006.

PATEL, J.; SHARMA, M. Differences in attachment of *Salmonella enterica* serovars to cabbage and lettuce leaves. **International Journal of Food Microbiology**, v. 139 (1–2), p. 41–47, Apr. 2010.

POPOFF, M.Y. Formules antigeniques des serovars de *Salmonella*. **WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*-Institut Pasteur**, Paris, 2001.

POPOFF, M.Y.; LE MINOR, L. Antigenic formulas of *Salmonella* serovars. **WHO Collaborating Center for Reference and Research on Salmonella-Institut Pasteur**, Paris, 1997.

RODRIGUES, L.B. *et al.* Avaliação da hidrofobicidade e da formação de biofilme em poliestireno por *Salmonella* Heidelberg isoladas de abatedouro avícola. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, p. 225-230, 2009.

SCHONEWILLE, W. *et al.* Biofilm building capacity of *Salmonella* enterica strains from the poultry farm environment. **Federation of European Microbiological**, v. 65, p. 360-365, 12 May 2012.

SES (Secretaria Estadual da Saúde), 2015. Campanha alerta para o cuidado com os alimentos. Disponível em: <http://www.saude.rs.gov.br/conteudo/7356/?Campanha_alerta_para_o_cuidado_com_os_alimentos>. Acesso em: 15 mai 2015.

SILVA, E.M.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis em aves: retrospectiva no Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, p. 85-100, 2002.

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. 439-47, 2000.

STEENACKERS, H. *et al.* *Salmonella* biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication. **Foods Research International**, v. 45, p. 502-531, 2012.

STEPANOVIĆ, S. *et al.* A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, p. 175–179, Apr. 2000.

STEPANOVIĆ, S. *et al.* Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. **Letters in Applied Microbiology**, v. 38, p. 428–432, 2004.

TONDO, E.C. *et al.* Adhesion and biocides inactivation of *Salmonella* on stainless steel and polyethylene. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 1027-1037, Oct. 2010.

UBABEF (União Brasileira De Avicultura), 2015. Relatório Anual 2013. **Publicações**. Disponível em:< <http://www.ubabef.com.br/publicacoes?m=75&date=2013-06>>. Acesso em 16 maio 2015.

VOSS-RECH, D. *et al.* A temporal study of *Salmonella enterica* serotypes from broiler farms in Brazil. **Poultry Science**, v. 94, p. 433-441, Mar. 2015.

WALLIS, T.S.; GALYOV, E.E. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. **Molecular Microbiology**, v. 36, p. 997-1005, June 2000.

WHO (World Health Organization), 2015. *Salmonella*. **Factsheets**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en>>. Acesso em 16 maio. 2015

ZOTTOLA, E.A.; SASAHARA, K.C. Microbial biofilms in the food-processing industry – should they be a concern. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, p. 125–148, Oct. 1994.

APÊNDICE A – Classificação das cepas conforme a produção de biofilme

Tabela 1 - Classificação das cepas de *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg* quanto à capacidade de formação de biofilmes a 37°C, 15°C e 3°C

(continua)

Identificação	Sorovar	37°C	15°C	3°C
1	<i>S. Enteritidis</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
2	<i>S. Enteritidis</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
3	<i>S. Enteritidis</i>	forte	moderada	fraca
4	<i>S. Enteritidis</i>	não aderente	fraca	fraca
5	<i>S. Enteritidis</i>	não aderente	fraca	fraca
6	<i>S. Enteritidis</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
7	<i>S. Enteritidis</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
8	<i>S. Enteritidis</i>	moderada	não avaliada	não avaliada
9	<i>S. Enteritidis</i>	não aderente	fraca	fraca
10	<i>S. Enteritidis</i>	moderada	não avaliada	não avaliada
11	<i>S. Enteritidis</i>	forte	fraca	fraca
12	<i>S. Enteritidis</i>	não aderente	fraca	fraca
13	<i>S. Enteritidis</i>	não aderente	fraca	não aderente
14	<i>S. Enteritidis</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
15	<i>S. Enteritidis</i>	não aderente	fraca	não aderente
16	<i>S. Enteritidis</i>	forte	moderada	moderada
17	<i>S. Enteritidis</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
18	<i>S. Enteritidis</i>	moderada	não avaliada	não avaliada
19	<i>S. Enteritidis</i>	moderada	não avaliada	não avaliada
20	<i>S. Enteritidis</i>	não aderente	fraca	não aderente
21	<i>S. Enteritidis</i>	moderada	não avaliada	não avaliada
22	<i>S. Enteritidis</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
23	<i>S. Enteritidis</i>	moderada	não avaliada	não avaliada
24	<i>S. Enteritidis</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
25	<i>S. Enteritidis</i>	forte	forte	moderada
26	<i>S. Enteritidis</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
27	<i>S. Enteritidis</i>	moderada	não avaliada	não avaliada
28	<i>S. Enteritidis</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
29	<i>S. Enteritidis</i>	não aderente	não aderente	não aderente
30	<i>S. Enteritidis</i>	não aderente	fraca	fraca
31	<i>S. Enteritidis</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
32	<i>S. Enteritidis</i>	forte	forte	moderada
33	<i>S. Enteritidis</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
34	<i>S. Enteritidis</i>	fraca	não avaliada	não avaliada

Tabela 1 - Classificação das cepas de *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg* quanto à capacidade de formação de biofilmes a 37°C, 15°C e 3°C

(continuação)				
Identificação	Sorovar	37°C	15°C	3°C
35	<i>S. Enteritidis</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
36	<i>S. Enteritidis</i>	moderada	não avaliada	não avaliada
37	<i>S. Enteritidis</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
38	<i>S. Enteritidis</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
39	<i>S. Enteritidis</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
40	<i>S. Enteritidis</i>	moderada	não avaliada	não avaliada
41	<i>S. Enteritidis</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
42	<i>S. Enteritidis</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
43	<i>S. Enteritidis</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
44	<i>S. Enteritidis</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
45	<i>S. Enteritidis</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
46	<i>S. Enteritidis</i>	moderada	não avaliada	não avaliada
47	<i>S. Enteritidis</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
48	<i>S. Enteritidis</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
49	<i>S. Enteritidis</i>	forte	moderada	fraca
50	<i>S. Enteritidis</i>	forte	moderada	moderada
51	<i>S. Enteritidis</i>	forte	moderada	moderada
52	<i>S. Enteritidis</i>	forte	moderada	moderada
53	<i>S. Enteritidis</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
54	<i>S. Enteritidis</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
55	<i>S. Enteritidis</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
56	<i>S. Enteritidis</i>	não aderente	fraca	não aderente
57	<i>S. Enteritidis</i>	forte	fraca	fraca
58	<i>S. Enteritidis</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
59	<i>S. Enteritidis</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
60	<i>S. Enteritidis</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
61	<i>S. Enteritidis</i>	não aderente	moderada	fraca
62	<i>S. Enteritidis</i>	moderada	não avaliada	não avaliada
63	<i>S. Enteritidis</i>	moderada	não avaliada	não avaliada
64	<i>S. Enteritidis</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
65	<i>S. Enteritidis</i>	forte	fraca	fraca
66	<i>S. Enteritidis</i>	forte	moderada	fraca
67	<i>S. Enteritidis</i>	moderada	não avaliada	não avaliada
68	<i>S. Enteritidis</i>	moderada	não avaliada	não avaliada
69	<i>S. Enteritidis</i>	moderada	não avaliada	não avaliada
70	<i>S. Enteritidis</i>	fraca	não avaliada	não avaliada

Tabela 1 - Classificação das cepas de *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg* quanto à capacidade de formação de biofilmes a 37°C, 15°C e 3°C

(continuação)				
Identificação	Sorovar	37°C	15°C	3°C
71	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
72	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
73	<i>S. Heidelberg</i>	não aderente	fraca	fraca
74	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
75	<i>S. Heidelberg</i>	não aderente	fraca	fraca
76	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
77	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
78	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
79	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
80	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
81	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
82	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
83	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
84	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
85	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
86	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
87	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
88	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
89	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
90	<i>S. Heidelberg</i>	moderada	não avaliada	não avaliada
91	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
92	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
93	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
94	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
95	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
96	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
97	<i>S. Heidelberg</i>	moderada	não avaliada	não avaliada
98	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
99	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
100	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
101	<i>S. Heidelberg</i>	moderada	não avaliada	não avaliada
102	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
103	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
104	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
105	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
106	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada

Tabela 1 - Classificação das cepas de *S. Enteritidis* e *S. Heidelberg* quanto à capacidade de formação de biofilmes a 37°C, 15°C e 3°C

(conclusão)				
Identificação	Sorovar	37°C	15°C	3°C
107	<i>S. Heidelberg</i>	moderada	não avaliada	não avaliada
108	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
109	<i>S. Heidelberg</i>	moderada	não avaliada	não avaliada
110	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
111	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
112	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
113	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
114	<i>S. Heidelberg</i>	moderada	não avaliada	não avaliada
115	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
116	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
117	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada
118	<i>S. Heidelberg</i>	não aderente	não aderente	fraca
119	<i>S. Heidelberg</i>	fraca	não avaliada	não avaliada