

Marisa Ferreira Martins

Avaliação da eficácia de desinfetantes e produtos de limpeza  
de superfícies usados em restaurantes em Portugal  
em biofilmes de *Salmonella enterica*

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pela Professora Doutora Gabriela da Silva  
e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Julho 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## **Agradecimentos**

A realização deste trabalho marca o fim de uma importante etapa da minha vida. Na impossibilidade de agradecer particularmente a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a sua concretização, agradeço àqueles que considero terem especial importância.

Em primeiro lugar, à minha orientadora, Professora Doutora Gabriela da Silva pela disponibilidade manifestada para orientar este trabalho, pela paciência constante, acessibilidade e disponibilidade para todas as questões, pelos oportunos conselhos, permanente estímulo e pelo saber que transmitiu.

A toda a equipa do laboratório de microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, em especial ao Doutor Nuno Mendonça e à Mestre Catarina Mendes, pela paciência, companheirismo e boa disposição mesmo nos momentos de maior “aflição”.

Aos meus colegas de Licenciatura e de mestrado pelos bons momentos que me proporcionaram, em especial à Soraia pelo seu apoio neste último ano, pelos ataques de pânico em conjunto e pela sua amizade e disponibilidade.

A todos os meus amigos pelo carinho e amizade demonstrados, em especial à Joana pela companhia nas tardes de estudo e momentos de lazer. E ao Ricardo pela ajuda, apoio e preocupação.

À minha família, em especial às minhas primas Cristina e Isabel pelo exemplo, amizade e apoio. E, principalmente aos meus pais que me proporcionaram todas as condições para que pudesse prosseguir os meus estudos, pela sua compreensão e estímulo nas alturas de desânimo. Obrigada por acreditarem sempre em mim e naquilo que faço e por tudo o que me ensinam!

A todos o meu mais sentido obrigado!

## Resumo

*Salmonella enterica* é um microrganismo patogénico com grande expressão a nível mundial, tanto em países em desenvolvimento como industrializados. É responsável por inúmeros surtos de infeções intestinais, e é transmitido através de alimentos, especialmente de origem animal. O intestino de animais constitui o principal reservatório. *S. enterica* possui a capacidade de formar biofilmes, que lhe permite sobreviver a ambientes adversos.

Os biofilmes podem ser encontrados na maioria dos ambientes, inclusivamente nos ambientes de processamento de alimentos, aumentando a probabilidade de contaminação dos mesmos e prejudicando a segurança dos produtos. Além disso, podem provocar outros problemas como bloqueios nas tubagens e degradação dos materiais. Devido à adesão às superfícies, são resistentes face a produtos antimicrobianos, dificultando o processo de limpeza e desinfeção e constituindo uma contínua fonte de contaminação dos alimentos.

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a formação de biofilmes de diferentes serotipos de salmonela e diferentes isolados do serotipo Typhimurium, e determinar a sua resistência a desinfetantes, nomeadamente etanol 70 % e hipoclorito 12-16 %, e dois produtos de limpeza de superfícies usados em Portugal em restaurantes, designadamente o DMP-30 e o DLL-B ambos diluídos para 5 % em água estéril.

A formação de biofilme foi avaliada recorrendo ao método de cristal de violeta em microplacas de 96 poços, e a relação genética dos isolados de *S. Typhimurium* foi determinada por electroforese em gel de campo pulsado (PFGE).

Os resultados mostraram que a capacidade de formação de biofilme varia não só entre os diferentes serotipos estudados, mas também entre isolados do mesmo serotipo. Quanto à resistência aos produtos testados, observou-se que na generalidade o produto mais eficaz é o hipoclorito 12-16 % e o menos eficaz é o etanol 70 %, embora haja variações consoante as estirpes da bactéria. Além disso, a idade dos biofilmes influencia a eficácia dos desinfetantes. Os biofilmes com maior idade (48 h) parecem apresentar uma maior resistência aos produtos aplicados. O tempo de atuação do desinfetante revelou-se importante, quer com biofilmes de 24 h quer de 48 h. Os produtos foram mais eficazes quando aplicados durante mais tempo (30 min versus 5 min).

Os resultados sugerem a necessidade de otimizar um protocolo de avaliação da atuação de desinfetantes em biofilmes de *S. enterica*.

## Abstract

*Salmonella enterica* is a pathogen with high expression in the world, both in developing and industrialized countries. It is responsible for several outbreaks of intestinal infections, and is transmitted through food, especially of animal origin. The intestine of animals is the main reservoir. *S. enterica* has the ability to form biofilms, which allows it to survive in adverse environments.

Biofilms can be found in most environments, including in food processing environments, increasing the possibility of food contamination and reducing product safety. Moreover, they can cause other problems such as blockages in pipes and degradation of materials. Due to its adherence to surfaces, they are resistant against antimicrobial products, making more difficult the process of cleaning and disinfection and constituting a continuous source of food contamination.

The main objective of this study was to evaluate the ability of biofilm formation of different serotypes and diverse isolates from *Salmonella* serotype Typhimurium, and measure their resistance to disinfectants, namely to ethanol 70% and hypochlorite 12-16%, and two cleaning surfaces products used in Portuguese restaurants, DMP-30 and DLL- B both diluted to 5 % in sterile water.

The biofilm formation was evaluated using the crystal violet assay in a 96-well microtiter plate and genetic relationship of *S. Typhimurium* strains was determined by pulsed field gel electrophoresis (PFGE).

The results showed that the ability to form biofilm varies not only between the different serotypes used in the study, but also between isolates from the same serotype. Regarding the resistance to the products, it was observed that generally the most effective product is sodium hypochlorite 12-16% while ethanol 70% is the less effective, although there are variations depending on bacteria strains. Also, the age of the biofilm influences the effectiveness of disinfectants. Biofilms with higher age (48 h) appear to have greater resistance to the applied products. The operating time of the disinfectant is also important, either with biofilms of 24 h or 48 h. The products were more effective when applied for longer time (30 min vs 5 min).

The results suggest the need to optimize a protocol for evaluating the performance of disinfectants on biofilms of *S. enterica*.

## **Abreviaturas**

ADN- Ácido desoxirribonucleico;

BM- Banho-maria;

CV- Cristal violeta;

DO- Densidade ótica;

EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético;

EFSA- Autoridade de Segurança Alimentar Europeia;

EPS- Substâncias poliméricas extracelulares;

PFGE- Electroforese em gel em campo pulsado (“Pulse Field Gel Eletrophoresis”);

S.- *Salmonella*;

TBE- Tampão Tris/Borato/EDTA;

TF- Tampão Fosfato;

TSA- Agar de tripticase de soja;

TSB- Caldo de tripticase de soja;

UE- União Europeia;

UFC- Unidade formadora de colónias;

Tampão EC- Tampão de lise no PFGE;

TE- Tampão Tris- EDTA.

## Índice de figuras

Figura 1- Representação da invasão celular por <i>S. enterica</i> (adaptado de Giannella, 1996).....	4
Figura 2 - Fases do desenvolvimento do biofilme: 1, adesão; 2, formação; 3, desenvolvimento de microcolónias; 4, maturação; 5, dispersão (adaptado de Srey, Jahid e Ha, 2013).....	10
Figura 3 -Avaliação da formação de biofilme dos diferentes serotipos às 24 e 48 h..	35
Figura 4- Avaliação da formação de biofilme dos isolados de <i>S. Typhimurium</i> após 24 e 48 h..	36
Figura 5-Aplicação de desinfetantes e produtos de limpeza durante 5 min em biofilmes de serotipos diferentes de <i>S. enterica</i> .....	39
Figura 6- Aplicação de desinfetantes e produtos de limpeza durante 5 min a biofilmes de 48 h de serotipos diferentes de <i>S. enterica</i> .....	40
Figura 7- Aplicação de desinfetantes e produtos de limpeza durante 5 min a biofilmes de 24 h do serotipo <i>Typhimurium</i> .....	41
Figura 8 - Aplicação de desinfetantes durante 5 min a biofilmes de 48 h do serotipo <i>Typhimurium</i> .....	42
Figura 9- Aplicação de desinfetantes durante 30 min a biofilmes de 24 h de diferentes serotipos.....	44
Figura 10- Aplicação de desinfetantes durante 30 min a biofilmes de 48 h de diferentes serotipos de <i>S. enterica</i> .....	45
Figura 11- Aplicação de desinfetantes durante 30 min a biofilmes de 24 h do serotipo <i>Typhimurium</i> .....	46
Figura 12- Aplicação de desinfetantes durante 30 min a biofilmes de 48 h do serotipo <i>Typhimurium</i> .....	47
Figura 13- Aplicação de DMP-30 5% às células planctónicas.....	49
Figura 14-Gel de PFGE dos isolados em estudo.....	51

## Índice de tabelas

Tabela 1- Características das estirpes de <i>Salmonella enterica</i> estudadas .....	25
Tabela 2 - Desinfetantes utilizados no estudo e suas diluições.....	28
Tabela 3- Avaliação da formação de biofilme às 6, 24, 48 e 72 h.....	34
Tabela 4- Aplicação de diferentes desinfetantes em quatro dos isolados em estudo.....	38
Tabela 5- Aplicação de desinfetantes durante diferentes tempos.....	43
Tabela 6- Avaliação da suscetibilidade dos isolados pelo método de Kirby-Bauer.....	48
Tabela 7- Aplicação dos vários desinfetantes nas células planctónicas.....	49

## Conteúdo

I.Introdução.....	2
I.1.Patogénese, tratamento e epidemiologia .....	3
I.1.1.Salmonelose não tifoide.....	4
I.2.Prevalência e prevenção da contaminação de alimentos .....	6
I.3.Biofilmes.....	9
I.3.1.Formação de biofilmes.....	10
I.3.2.Contaminação de ambientes de processamento .....	14
I.3.3.Consequências da presença de biofilmes .....	15
I.3.4.Estratégias de redução da formação de biofilmes .....	17
I.4.Desinfetantes.....	18
I.4.1.Diminuição da eficácia de desinfecção .....	20
I.4.2.Mecanismos de resistência dos biofilmes .....	20
I.5.Objetivos do estudo.....	22
2. Materiais e Métodos .....	24
2.1.Estirpes bacterianas .....	24
2.2.Avaliação da formação de biofilme pelo método de cristal de violeta .....	24
2.3.Desinfetantes e produtos de limpeza de superfícies testados.....	27
2.4.Avaliação da resistência do biofilme aos desinfetantes e produtos de limpeza.....	28
2.5.Avaliação da suscetibilidade dos isolados em estudo aos desinfetantes baseada no método de Kirby- Bauer .....	29
2.6.Avaliação da ação dos desinfetantes nas células planctónicas .....	29
2.7.Avaliação da relação genética dos isolados de S. Typhimurium por electroforese em gel em campo pulsado (PFGE) .....	30
3.Resultados .....	34
3.1. Avaliação da formação de biofilme em diferentes tempos.....	34

3.1.1. Avaliação da formação de biofilme dos diferentes serotipos .....	34
3.1.2. Avaliação da formação de biofilme dos isolados do serótipo S. Typhimurium .....	36
3.2. Avaliação da resistência do biofilme a desinfetantes e produtos de limpeza durante 5 min.....	37
3.2.1. Avaliação da resistência do biofilme de diferentes serotipos aos desinfetantes e produtos de limpeza com tempo de contacto de 5 min .....	38
3.2.2. Avaliação da resistência do biofilme de diferentes isolados de S. Typhimurium aos desinfetantes e produtos de limpeza com tempo de contacto de 5 min.....	40
3.3. Avaliação da resistência do biofilme aos desinfetantes e produtos de limpeza com tempo de contacto de 30 min .....	42
3.3.1. Avaliação da resistência do biofilme de diferentes serotipos aos desinfetantes e produtos de limpeza com tempo de contacto de 30 min .....	44
3.3.2. Avaliação da resistência do biofilme de diferentes isolados de S. Typhimurium aos desinfetantes e produtos de limpeza com tempo de contacto de 30 min .....	45
3.4. Avaliação da suscetibilidade dos isolados em estudo aos desinfetantes baseada no método de Kirby- Bauer .....	47
3.5. Avaliação da ação dos desinfetantes nas células planctónicas .....	48
3.6. Electroforese em gel de campo pulsado (PFGE) .....	50
4. Discussão .....	53
5. Bibliografia.....	xi
6. Anexos.....	xxv
Anexo 1-Teste de suscetibilidade a antibióticos .....	xxv
Anexo 2-Composição dos tampões e soluções de PFGE.....	xxvii

# I. INTRODUÇÃO

## I. Introdução

A salmonelose é conhecida como uma das principais infeções gastrointestinais transmitidas pelo consumo de alimentos contaminados por *Salmonella enterica*, sendo reportados mais de 100 000 casos por ano na União Europeia (UE) (EFSA e ECDC, 2012; Mukhopadhyay e Ramaswamy, 2012). Esta infeção tem uma expressão tão grande que a Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) estima que a carga económica associada à salmonelose humana pode atingir os 3 biliões de euros por ano (EFSA e ECDC, 2012). A maioria dos serotipos de salmonela são patogénicos para o Homem, no entanto as características e severidade das doenças infecciosas que originam são variáveis (Coburn, Grassl e Finlay, 2007).

O género *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, e é constituído por bactérias Gram-negativo flageladas e, por isso, móveis, e anaeróbias facultativas. São mesófilicas e têm crescimento ótimo entre os 35 e os 37 °C, são destruídas pela pasteurização, e são sensíveis a pH ácido (Amagliani, Brandi e Schiavano, 2012; Dougan *et al.*, 2011).

A sua nomenclatura tem gerado grande controvérsia entre a comunidade científica, sendo que, atualmente está dividido em duas espécies *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* (EFSA e ECDC, 2012; Jong, de *et al.*, 2012). Estas duas espécies são posteriormente subdivididas. *S. enterica* é dividida em seis subespécies (ou serotipos), sendo que a *Salmonella* com maior potencial zoonótico, isto é, com maior potencial para ser transmitida direta ou indiretamente entre animais e humanos, pertence a *S. enterica* subespécie *enterica* (EFSA e ECDC, 2012; EFSA, 2012). Existem mais de 2600 serotipos de salmonela com potencial zoonótico e a sua prevalência é variável (EFSA e ECDC, 2012).

No caso deste género, não são seguidas as regras de nomenclatura aplicadas a outras bactérias, continuando a utilizar-se o nome do serotipo após o nome da espécie (em itálico), por exemplo *S. enterica* serotipo Typhimurium (ASAE, 2012; EFSA e ECDC, 2012). O serotipo é definido com base na caracterização dos principais antigénios: O (ou somático), H (ou flagelar) e Vi que existe apenas nos serotipos Paratyphi, Typhi e Dublin e está associado com a virulência (ASAE, 2012; Fox, 2011; Giannella, 1996; Jong, de *et al.*, 2012; López *et al.*, 2012; Stevens, Humphrey e Maskell, 2009; Tessari *et al.*, 2009). Em linguagem comum, por ser mais conveniente, continua a usar-se o género seguido do serotipo, por exemplo. *S. Typhimurium*, o que indica *Salmonella enterica* subespécie *enterica* serotipo Typhimurium. Neste documento usar-se-á a nomenclatura simplificada quando houver referência a um serotipo.

As bactérias deste género habitam no trato intestinal de animais de sangue quente e frio, podendo ser encontradas também no trato intestinal de aves e mamíferos saudáveis sendo este o seu principal reservatório (Dougan et al., 2011; EFSA, 2012b). Devido à sua presença no trato intestinal, tanto humanos como animais, podem excretar salmonela quer quando estão doentes, quer após doença caso se tornem portadores assintomáticos (Todar, 2012). Por isso, as bactérias deste género estão disseminadas no ambiente (água, solo e plantas) e, embora pareçam não se multiplicar significativamente fora do trato digestivo, podem sobreviver várias semanas em água e vários anos no solo se as condições de temperatura, humidade e pH forem favoráveis (Dougan et al., 2011).

Alguns dos serotipos são ubíquos, e podem infetar tanto homens como animais, como por exemplo os serotipos Dublin, Typhimurium e Choleraesuis, causando diferentes síndromes nos diferentes hospedeiros (Boyle et al., 2007; Coburn, Grassl e Finlay, 2007). Existem ainda serotipos que estão especificamente adaptados a um hospedeiro em particular, como por exemplo os serotipos Typhi e Paratyphi que são muito restritos a seres humanos (Coburn, Grassl e Finlay, 2007).

## **1.1. Patogénese, tratamento e epidemiologia**

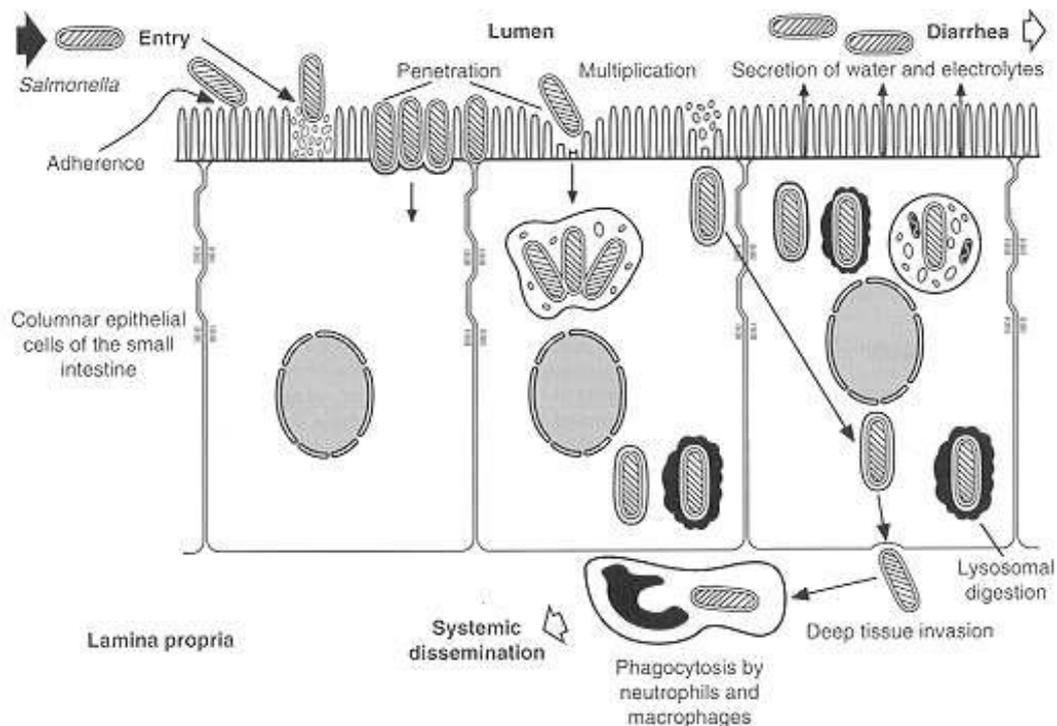
Devido à sua presença ubíqua no ambiente, estas bactérias podem ser transmitidas aos seres humanos, normalmente, através de alimentos contaminados por excreções de animais e as infeções que causam podem ser assintomáticas ou apresentar um quadro clínico grave (Jones et al., 2008; Sánchez-Vargas, Abu-El-Haija e Gómez-Duarte, 2011). Nos seres humanos, *S. enterica* pode causar vários tipos de doença: febre entérica (ou tifoide), enterocolite ou salmonelose e bacteriémia, dependendo os sintomas manifestados tanto da suscetibilidade do hospedeiro, como do serotipo de *S. enterica*. As doenças mais comuns associadas à *S. enterica* são febre tifoide, provocada pela infeção por *S. enterica* Typhi ou Paratyphi, e a salmonelose não tifoide provocada pelos outros serotipos (Dougan et al., 2011). Além disso podem ainda ser transmitidas ao homem sem que ele apresente sintomas de infeção, estes indivíduos designam-se portadores assintomáticos.

### I.1.1. Salmonelose não tifoide

A salmonelose não tifoide é uma doença cosmopolita de seres humanos e de animais, e é causada por serotipos ubíquos (Giannella, 1996; Todar, 2012). Esta infecção pode ter origem alimentar, e tanto o homem como os animais (principalmente estes) funcionam como reservatório (Giannella, 1996; Stevens, Humphrey e Maskell, 2009).

A doença no homem normalmente surge após a ingestão de um alimento ou água contaminados com este microrganismo entre  $2,0 \times 10^2$  a  $1,0 \times 10^6$  UFC/g ou mL, dependendo do serotipo, sendo a dose infecciosa importante no desenvolvimento da gastroenterite (Coburn, Grassl e Finlay, 2007; Stevens, Humphrey e Maskell, 2009). Após ingestão de um serotipo virulento de *S. enterica* e sobrevivência do mesmo às condições adversas encontradas no estômago do Homem (pH ácido e presença de vários ácidos orgânicos), à elevada osmolaridade, baixa tensão de oxigênio e competição com as bactérias comensais do intestino, ocorre a colonização do mesmo (intestino delgado, cólon e cego) (Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2011). Aí, as bactérias aderem ao epitélio apical, induzem a invasão celular através de vários fatores de virulência e provocam alterações inflamatórias significativas, incluindo abscessos das criptas, necrose epitelial, edema e secreção de fluidos (Figura 1) (Coburn, Grassl e Finlay, 2007; Foley e Lynne, 2008).

**Figura 1** - Representação da invasão celular por *S. enterica* (adaptado de Giannella, 1996)



A adesão intestinal é mediada pelos *pili* ou pelas fímbrias presentes na superfície da célula bacteriana que se ligam a diferentes estruturas do tecido intestinal, sendo esse passo importante para a colonização das células intestinais (Foley e Lynne, 2008; López *et al.*, 2012).

Depois da adesão às células do intestino, este microrganismo pode expressar o sistema de secreção tipo III que facilita a invasão da célula intestinal e a sua inflamação, este sistema é composto por um conjunto de proteínas que permite a transferência de fatores de virulência para as células do hospedeiro através de um canal que atravessa tanto a membrana da bactéria como a da célula do hospedeiro (Foley e Lynne, 2008; Garai, Gnanadhas e Chakravorty, 2012; Sánchez-Vargas, Abu-El-Haija e Gómez-Duarte, 2011; Thiennimitr, Winter e Bäumler, 2012).

Os fatores de virulência, como os flagelos, adesinas, polissacarídeos de superfície e, neste caso toxinas, e os sistemas de secreção tipo III são codificados por regiões do ADN cromossomal ou plasmídico denominadas ilhas de patogenicidade. Estas são normalmente ladeadas por sequências repetidas e têm uma composição em citosina e guanina, bastante diferente do genoma que as ladeia (Foley e Lynne, 2008; Foley, Lynne e Nayak, 2008; Jong, *et al.*, 2012; López *et al.*, 2012; Thiennimitr, Winter e Bäumler, 2012). Por exemplo, o sistema de secreção tipo III é codificado pelas ilhas de patogenicidade 1 e 2 (Garai, Gnanadhas e Chakravorty, 2012).

Os fatores transferidos para a célula interagem com as proteínas da mesma de modo a ativar as vias de transdução de sinal e rearranjar o citoesqueleto de actina, sendo estes processos indispensáveis à sobrevivência intracelular da bactéria e sua colonização (Sánchez-Vargas, Abu-El-Haija e Gómez-Duarte, 2011; Thiennimitr, Winter e Bäumler, 2012).

Após a invasão das células do hospedeiro, a salmonela fica numa espécie de vacúolo que a bactéria remodela de modo a poder sobreviver e multiplicar-se (Figura 1). A capacidade que alguns serotipos têm para evitar a fusão destes vacúolos com os lisossomas da célula é provavelmente a responsável pela sua sobrevivência (López *et al.*, 2012; Sánchez-Vargas, Abu-El-Haija e Gómez-Duarte, 2011). Por fim, a invasão do tecido é detetada pelo sistema imunitário do hospedeiro, que leva a uma rápida indução da inflamação intestinal, responsável pelos sinais da doença (Thiennimitr, Winter e Bäumler, 2012).

A capacidade que este microrganismo tem para infetar hospedeiros tanto de sangue quente como de sangue frio reflete a sua capacidade para se adaptar a vários ambientes, incluindo o interior dos macrófagos (Sánchez-Vargas, Abu-El-Haija e Gómez-Duarte, 2011).

Os sintomas aparecem entre 6 e 72 horas após a ingestão de água ou alimentos contaminados, iniciam-se de forma aguda e incluem cólicas, dores abdominais, diarreia com

ou sem sangue e febre e, normalmente são auto-limitantes, ou seja, desaparecem após 2 a 7 dias (Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2011; Foley e Lynne, 2008; Sánchez-Vargas, Abu-El-Haija e Gómez-Duarte, 2011; Thu *et al.*, 2012).

A reidratação por via oral ou intravenosa com fluidos e eletrólitos é necessária quando a perda de fluidos é substancial. Em alguns pacientes, a infecção pode ser mais severa, por exemplo, em crianças, adultos com idade superior a 50 anos, imunodeprimidos e grávidas, podendo requerer terapia antimicrobiana (Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2011; Foley e Lynne, 2008). Além disso em casos mais graves, se associada a desidratação, pode ser fatal (EFSA e ECDC, 2012). Numa pequena percentagem de casos, pode ocorrer septicémia e infeções dos órgãos e tecidos levando a doenças como osteomielite, pneumonia e meningite (Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2011).

## **1.2. Prevalência e prevenção da contaminação de alimentos**

A salmonela pode estar associada a todos os tipos de alimentos, e estes podem ser contaminados em diferentes partes da cadeia alimentar (EFSA, 2012c). Uma vez que estas bactérias são habitantes comuns do intestino de animais domésticos e selvagens, podem, conseqüentemente, contaminar (contaminação fecal) uma grande variedade de alimentos de origem animal e vegetal tanto direta (contacto direto com os animais ou humanos infetados) como indiretamente (ambientes contaminados fecalmente) (Alvarez-Ordóñez *et al.*, 2011; EFSA e ECDC, 2012; Shen e Fang, 2012). Nos estados-membro da União Europeia, *S. Enteritidis* (principalmente através de carne de aves domésticas e ovos) e *S. Typhimurium* (associado à carne de porco, aves domésticas e bovino) são os serótipos mais frequentemente associados à doença humana (Coburn, Grassl e Finlay, 2007).

A contaminação da carne (por exemplo de porco, cabra e galinha) normalmente resulta da contaminação com o conteúdo intestinal durante a evisceração, lavagem e transporte das carcaças, assim como, o contacto com a pele e pêlos dos mesmos (EFSA, 2012c; Todar, 2012). A contaminação da superfície da carne normalmente não traz grandes conseqüências, uma vez que a cozedura adequada irá eliminá-la (Todar, 2012). Porém, o manuseamento de carne contaminada pode resultar na contaminação das mãos, mesas, toalhas, utensílios de cozinha e outros alimentos (EFSA, 2012c; Todar, 2012). Além disso, quando a carne contaminada é moída, a multiplicação da *Salmonella* pode ocorrer no seu interior e, se a sua cocção for apenas superficial, a ingestão de este alimento altamente contaminado pode provocar uma infecção (Todar, 2012).

A transmissão também pode ocorrer quando os microrganismos são introduzidos nas áreas de preparação dos alimentos e existem condições para a sua multiplicação, por exemplo por armazenamento a temperaturas inadequadas, cozedura inadequada ou contaminação de alimentos prontos a comer (EFSA e ECDC, 2012; EFSA, 2012; Gómez-aldapa *et al.*, 2010). Os vegetais e frutas podem também ser um meio de transmissão de salmonela quando contaminados com fertilizantes de origem fecal ou se lavados com água contaminada (Todar, 2012).

A prevenção baseia-se em evitar a contaminação, melhorando a higiene; prevenindo a multiplicação de microrganismos nos alimentos através do armazenamento a temperatura adequada (4 °C); a utilização de leite e derivados, esterilizados e pasteurizados; manipulação segura da carne e outros géneros alimentares crus e cocção completa dos alimentos (EFSA, 2012c; Todar, 2012).

Segundo o relatório sumário da UE, sobre tendência e origem das zoonoses, agentes zoonóticos e surtos de origem alimentar, foram reportados dados sobre contaminação por *Salmonella* numa grande variedade de alimentos no ano de 2010. As maiores proporções de casos positivos eram em ovos e seus subprodutos, carne fresca de frango e peru, sucedendo-se a carne de porco e, por fim a de bovino (EFSA e ECDC, 2012).

Nesse ano, a salmonelose foi a segunda doença zoonótica mais reportada em humanos na UE, sendo apenas ultrapassada pela campilobacteriose. No entanto, enquanto a taxa de casos de campilobacteriose tem aumentado, a taxa de salmonelose tem diminuído. E, embora os serótipos *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* continuem a ser os mais frequentemente reportados em casos humanos, o serotipo que mais contribuiu para a diminuição global de casos de salmonelose foi o *Enteritidis*. Foi também registada uma diminuição dos casos de infeção por *S. Typhimurium*, no entanto, não na mesma extensão do serotipo anteriormente referido. Este facto deve-se principalmente à diminuição de surtos provocados por ovos e seus subprodutos, que possivelmente se deve ao aumento da vacinação das galinhas poedeiras (voluntária e compulsiva), a medidas de controlo no âmbito da higiene, impulsionadas pelas consequências económicas das restrições aos ovos e da exigência de tratamento térmico para os lotes de ovos contaminados (EFSA e ECDC, 2012).

De acordo com o mesmo relatório, em 2009, nos 27 países membros da UE, as autoridades de saúde reportaram um total de 108614 casos confirmados de salmonelose humana, com uma prevalência de 23,7 casos/100000 indivíduos. Se este valor for comparado com os equivalentes de 2005, podemos verificar que os casos de salmonelose humana desceram consideravelmente, aproximadamente 13 % (Sheffield e Crippen, 2012).

Também têm diminuído o número de surtos de infeções alimentares de origem alimentar provocadas por *Salmonella* na UE, assim como os surtos desta infeção alimentar provocadas por ovos e produtos derivados. Todavia, estes continuam a ser a causa mais importante de surtos de salmonelose, havendo ainda outras fontes importantes como refeições de *buffet*, carne de frango, porco e bovino (EFSA e ECDC, 2012).

Em Portugal, segundo um estudo desenvolvido pelo Laboratório Nacional de Referência de Infeções Gastrointestinais do Departamento de Doenças Infecciosas do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, foram analisadas 6366 estirpes de *Salmonella* de doentes portugueses no período de 2000 a 2012, sendo os serótipos determinados de acordo com o esquema de classificação de Kauffmann-White-de Minor segundo a ISSO/TR6579-3. Os serotipos mais comuns, foram *S. Enteritidis* (68,0 %), *S. Typhimurium* (19,5 %) e *S. 4,5:i* (4,5 %). Este último é uma estirpe de *Salmonella* do mesmo grupo clonal de *S. Typhimurium* mas que não apresenta antígenos da segunda fase flagelar e que apresenta perfis de resistência a antibióticos frequentemente utilizados na produção animal. Estes serotipos apresentam frequências idênticas às da maioria dos países europeus e norte americanos. Além disso, outros serotipos menos frequentes, como *S. Typhi* (0,6 %), *S. Derby* (0,5 %) apresentam uma frequência idêntica à frequência mundial (Silveira, Marques e Machado, 2013).

É referido ainda que a partir de 2005 se verificou uma diminuição acentuada do número de *S. enteritidis* e conseqüente diminuição do número total de estirpes de salmonela, dado como possível causa o maior controlo sanitário ao nível dos aviários e cadeias de produção, causa também apontada pelo relatório europeu acima citado. É referido ainda que apesar de se verificar uma diminuição do número total de *S. Typhimurium*, a sua percentagem tem vindo a aumentar, ultrapassando a percentagem de *S. enteritidis* nos anos de 2010 e 2011. Além disso, desde o fim da década de 90 que tem aumentado o número de infeções causadas por *S. 4,5:i*, sendo que em 2012, o seu número foi superior ao de *S. Typhimurium* (Silveira, Marques e Machado, 2013).

### **1.3. Biofilmes**

A capacidade dos microrganismos para aderirem a superfícies é necessária para a sobrevivência dos mesmos no ambiente e para terem algum controlo sobre o meio envolvente, quer a nível nutricional, quer como proteção contra o stress ambiental (Nguyen e Yuk, 2013). Esta adesão apresenta várias vantagens para as bactérias, uma vez que estas dependem da difusão de nutrientes e desperdícios para a sua sobrevivência, e que estas superfícies tendem a acumular e concentrar nutrientes através de ligações iónicas e interações hidrofóbicas, permitindo assim uma exposição a nutrientes mais concentrados (Kim, Park e Chung, 2012; Sheffield e Crippen, 2012). A adesão dos microrganismos permite a formação de biofilmes, e este é um dos mecanismos mais comuns, utilizados pelos microrganismos, para sobreviver no ambiente (Meira *et al.*, 2012; Nguyen e Yuk, 2013).

Em ambientes naturais, 95% a 99% dos microrganismos existem sob forma de biofilmes, que podem ser encontrados em quase todos os substratos, desde que possuam um nível de humidade suficiente para sustentar o seu crescimento. Assim, a forma de vida bacteriana livre ou planctónica pode ser observada, simplesmente, como um mecanismo de translocação entre superfícies (Oliveira, Brugnera e Piccoli, 2010).

Os biofilmes são comunidades organizadas de microrganismos viáveis e inviáveis na sua forma sésil, aderidos às superfícies ou entre eles, e envolvidos por uma matriz polimérica e extracelular produzida pelos mesmos (Meira *et al.*, 2012; Stepanovic *et al.*, 2003). Ocorrem naturalmente e, normalmente, são constituídos por uma mistura simbiótica de diferentes espécies. E são considerados como uma potencial fonte de contaminação recorrente ou contínua dos locais de processamento de alimentos. (Ali, Khambaty e Diachenko, 2006; Joseph, Otta e Karunasagar, 2001). Podem existir como agregados mais ou menos compactos, em camadas únicas ou com estruturas tridimensionais e, se assim constituídos, apresentam canais que permitem o fluxo de líquidos e gases, a dispersão de nutrientes e a eliminação de componentes (Oliveira, Brugnera e Piccoli, 2010).

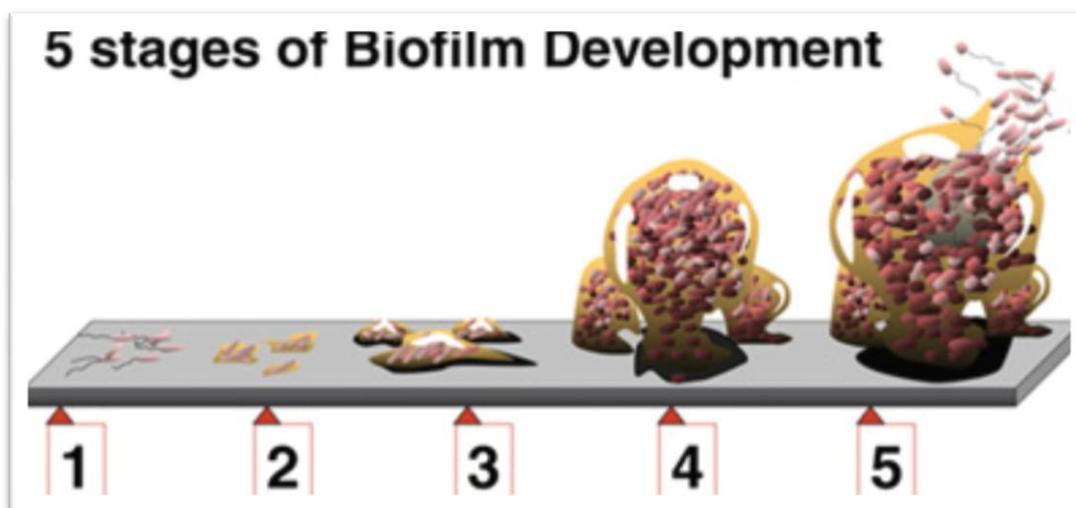
Apesar dos vários anos de pesquisa do mecanismo de ligação bacteriano, ainda existem vários passos do processo de formação de biofilmes desconhecidos (Sheffield e Crippen, 2012).

### 1.3.1. Formação de biofilmes

Há uma variedade de mecanismos pelos quais várias espécies microbianas são capazes de estabelecer um contacto mais próximo com a superfície, aderir firmemente, promover interacções célula-célula e crescer como uma estrutura complexa (Simões, Simões e Vieira, 2010). A formação de biofilmes compreende uma sequência de passos, entre eles a ligação de microrganismos em suspensão à superfície e sua ancoragem através da produção de um exopolímero num processo variado que leva a uma alteração completa do estilo de vida das bactérias envolvidas. Este processo é influenciado por interacções electrostáticas e hidrofóbicas, forças iónicas, osmolaridade e pH (Oliveira, Brugnera e Piccoli, 2010; Rivera, Estela e Alejandro, 2012; Simões, Simões e Vieira, 2010; Tenke *et al.*, 2011).

O modelo geral da formação de biofilmes inclui cinco fases principais: adesão, formação, desenvolvimento de microcolónias, maturação e dispersão do biofilme (Figura2) (Srey, Jahid e Ha, 2013).

**Figura 2** - Fases do desenvolvimento do biofilme: 1, adesão; 2, formação; 3, desenvolvimento de microcolónias; 4, maturação; 5, dispersão (adaptado de Srey, Jahid e Ha, 2013)



Numa primeira fase, reversível, os microrganismos da mesma espécie ou de espécies diferentes, no estado planctónico, recebem um estímulo e aderem levemente às superfícies (Oliveira, Brugnera e Piccoli, 2010; Rivera, Estela e Alejandro, 2012). Neste momento há uma interacção fraca da bactéria com a superfície através de forças de Van der Waals, forças electrostáticas e forças de interacção hidrofóbicas e as bactérias ainda exibem movimentos Brownianos (Kaplan, 2010). Nesta etapa as células são facilmente removidas pela aplicação de forças fracas. Este passo, assim como o seguinte (adesão irreversível), é favorecido por

vários componentes bacterianos nele envolvidos como os *pili*, flagelos, polímeros de superfície como os lipopolissacarídeos nas bactérias Gram-negativas, fímbrias, ácido lipoteicoico, cápsula e adesinas que contrariam as forças repulsivas da superfície (Wood, Hong e Ma, 2011). As estruturas acima referidas podem ser diferentes dependendo do ambiente e assim, alterar a formação do biofilme (Rivera, Estela e Alejandro, 2012; Sheffield e Crippen, 2012). Por exemplo, o flagelo, embora tenha funções de mobilidade, é possível que por si só forme uma ligação adesiva com a superfície, no entanto a sua principal função na formação de biofilmes é o transporte e a interacção inicial entre a superfície e a célula. Também os *pili* e as fímbrias não estão envolvidos na mobilidade da célula, e normalmente a sua função é tornar a célula mais adesiva, pois podem aderir a outras células e partículas inorgânicas (Simões, Simões e Vieira, 2010). Embora seja necessário aprofundar o conhecimento sobre este processo, sabe-se que alguns factores que o podem influenciar são: pH, concentração e biodisponibilidade de nutrientes, autoindutores de *quorum sensing*, presença de compostos orgânicos e inorgânicos e a temperatura (Oliveira, Brugnera e Piccoli, 2010).

O *quorum sensing* é um mecanismo que permite que as células bacterianas comuniquem entre si, através da produção de moléculas sinalizadoras (metabólitos secundários), quanto maior é a densidade de células, maior a concentração destas moléculas sinalizadoras (Kim, Park e Chung, 2012). A presença destas moléculas permite que as células microbianas detetem que se atingiu um número crítico de células bacterianas (*quorum*) num espaço limitado do ambiente, neste caso, após a deteção deste “*quorum*” as células começam a aderir à superfície, formando um biofilme. Este mecanismo possibilita a coesão de funções que beneficia toda a população, e permite que a comunidade funcione como um sistema vivo (Rivera, Estela e Alejandro, 2012; Sheffield e Crippen, 2012). Além dos factores descritos anteriormente, a adesão reversível ocorre preferencialmente em superfícies mais rugosas, hidrofóbicas não polarizadas como por exemplo o Teflon, e revestidas por uma película condicionante. A película condicionante é formada por constituintes do meio envolvente como electrólitos, água e material orgânico que mais tarde poderão funcionar como nutrientes para os microrganismos. Estes compostos neutralizam a carga da superfície e iniciam o processo de adesão (Rivera, Estela e Alejandro, 2012; Simões, Simões e Vieira, 2010; Srey, Jahid e Ha, 2013).

Na adesão irreversível há uma alteração/reforço da interacção entre a célula bacteriana e a superfície, passando de uma interacção fraca a uma ligação permanente com a presença de substâncias poliméricas extracelulares (EPS). As EPS são constituídas principalmente por polissacáridos, proteínas, fosfolípidos, ácidos nucleicos e teicóicos.

Contêm ainda outras substâncias poliméricas hidratadas, com cerca de 85 a 95% de água, que são responsáveis pela morfologia, estrutura, coesão e integridade funcional do biofilme (Speranza, Corbo e Sinigaglia, 2011; Srey, Jahid e Ha, 2013). Além da presença das EPS há ou pode haver a produção e ancoragem de componentes adesivos como *pili* e fímbrias, formando um biofilme permanente (Oliveira, Brugnera e Piccoli, 2010). A célula bacteriana perde mobilidade através da remoção dos flagelos por acção da protease e estes, são substituídos por uma saliência em forma de gancho composta por oligómeros de N-acetilglucosamina. Este polissacarídeo é fortemente adesivo e garante uma ligação firme à superfície (Sheffield e Crippen, 2012). Este passo está associado à formação de uma monocamada através da regulação positiva dos genes responsáveis pela formação da matriz extracelular, composta por exopolissacarídeos e ADN extracelular, e ocorre, normalmente, após pouco tempo de contacto, podendo iniciar-se após 20 minutos de contacto até no máximo 4 horas a temperaturas entre 4 e 20 °C (Oliveira, Brugnera e Piccoli, 2010; Sheffield e Crippen, 2012).

A matriz que envolve os microrganismos é constituída pelas EPS que fornecem protecção aos microrganismos presentes no biofilme, uma vez que concentram os nutrientes, impedem o acesso de agentes antimicrobianos, sequestram metais e toxinas e previnem a dessecação. Além destas substâncias, os biofilmes presentes na indústria alimentar podem também conter conteúdos elevados de alimentos e minerais provenientes dos produtos e águas do processo (Chmielewski e Frank, 2003).

Quando a adesão irreversível é alcançada, as células dividem-se, colonizam a superfície, e quando a concentração de sinalizadores químicos produzidos pelo metabolismo microbiano atinge um nível limite, sugerindo que a densidade da população microbiana atingiu um mínimo, estes determinam o início de alterações fenotípicas na comunidade (Rivera, Estela e Alejandro, 2012). Após este processo, a remoção dos microrganismos torna-se muito mais difícil, sendo necessárias forças de cisalhamento fortes (forças aplicadas na mesma direcção mas em sentidos diferentes) ou a ruptura química das forças de adesão por: enzimas, detergentes, surfactantes ou desinfectantes e/ou calor para a remoção do biofilme (Srey, Jahid e Ha, 2013).

A expansão do biofilme inicia-se com a mobilização de células para as microcolónias e, dependendo das espécies envolvidas, as microcolónias podem ser compostas por 10 a 25 % de células e 75 a 90 % de matriz EPS (Sheffield e Crippen, 2012; Tenke *et al.*, 2011). Estas podem apresentar várias formas que são definidas pelas forças provocadas pela passagem de fluidos sobre os biofilmes, podendo apresentar a forma de torre ou cogumelo se as forças forem fracas, ou alongadas, permitindo oscilação rápida se a força for elevada.

As microcolónias desenvolvem-se através de uma variedade de mecanismos. Por exemplo, *Escherichia coli* utiliza as fimbrias, flagelos e *pili* para se redistribuir sobre a superfície (Sheffield e Crippen, 2012).

Numa quarta fase, ocorre a maturação do biofilme iniciada pelo *quorum sensing* (Rivera, Estela e Alejandro, 2012). A presença das moléculas sinalizadoras resulta na autoindução da síntese de matriz extracelular ou exopolissacarídeo, levando à maturação do biofilme e posterior formação de uma estrutura tridimensional, gerada pelos canais de água. Estes têm como função fazer a circulação de nutrientes essenciais, moléculas e oxigênio, necessários para o crescimento das células e a remoção de metabolitos, atuando como uma espécie de sistema circulatório. Este sistema permite o acesso de nutrientes e água às células do interior do biofilme (Kaplan, 2010; Rivera, Estela e Alejandro, 2012; Sheffield e Crippen, 2012; Tenke *et al.*, 2011; Venkataramaiah e Biradar, 2011). Estas estruturas, combinadas com as fortes propriedades adesivas e a comunicação célula-célula sofisticada tornam os biofilmes mais resistentes (Sheffield e Crippen, 2012; Tenke *et al.*, 2011). A matriz permite a interligação das células imobilizadas e atua como um sistema digestivo que mantém as enzimas extracelulares externas perto das células permitindo-lhes metabolizar os bio-polímeros e os sólidos coloidais nos biofilmes maduros. Nesta fase a divisão celular não é comum e a energia é utilizada, principalmente para produzir exopolissacarídeos (Rivera, Estela e Alejandro, 2012).

Na quinta e última fase, as células destacam-se, facilitando a dispersão e a formação de novos biofilmes semelhantes em locais mais favoráveis (Kaplan, 2010; Rivera, Estela e Alejandro, 2012; Sheffield e Crippen, 2012). Esta fase pode ser ou não alcançada dependendo das condições ambientais, como por exemplo a disponibilidade de nutrientes, oxigenação e pH uma vez que a elevada densidade de células pode resultar em grandes gradientes dinâmicos de nutrientes e subprodutos metabólicos tóxicos (Rivera, Estela e Alejandro, 2012). O crescimento e o destacamento são interdependentes, estando demonstrado que a taxa de destacamento aumenta com o aumento da taxa de crescimento (Sheffield e Crippen, 2012).

Como todos os aspetos do ciclo de vida de um biofilme, os processos envolvidos no destacamento das células e posterior dispersão não são bem conhecidos, envolvendo uma grande variedade de estímulos ambientais e fisiológicos e vias de transdução de sinal (Sheffield e Crippen, 2012). No entanto, sabe-se que pode resultar de vários fatores como forças mecânicas, por exemplo erosão, descamação, raspagem (Rivera, Estela e Alejandro, 2012; Wood, Hong e Ma, 2011). Pode também ser influenciado por fatores bioquímicos tais como o fim da produção de exopolissacarídeos e fatores de dispersão como enzimas ou

surfatantes que destroem a matriz, produção de enzimas que degradem as EPS, expressão de fosfodiesterases, e sinalizadores de *quorum sensing*. E também fatores físicos como bolhas de gás produzidas pelos microrganismos, presença de ligações cruzadas de catiões, limitação de nutrientes, acumulação de metabolitos, alterações na osmolaridade, grande aumento da densidade celular e fatores relacionados com forças de cisalhamento (Rivera, Estela e Alejandro, 2012; Sheffield e Crippen, 2012). Durante este processo, fragmentos do biofilme com células viáveis podem dispersar-se em líquidos ou aerossóis promovendo a colonização de novos locais e fornecendo novos recursos, importantes para a sobrevivência a longo prazo (Rivera, Estela e Alejandro, 2012; Sheffield e Crippen, 2012). Este processo possibilita a disseminação dos microrganismos e, por conseguinte, a transmissão de agentes infecciosos (Kaplan, 2010).

### **1.3.2. Contaminação de ambientes de processamento**

A nível mundial existe uma grande preocupação com o impacto das doenças microbianas de origem alimentar, sendo reconhecida a importância das superfícies contaminadas na disseminação de microrganismos através dos alimentos tanto na indústria alimentar, como serviço de *catering* e ambiente doméstico (Lebert, Leroy e Talon, 2007; Meira *et al.*, 2012).

Os resíduos que aderem aos equipamentos e utensílios devido a falhas no procedimento de higienização (limpeza e desinfecção) são potenciais fontes de contaminação (Bae, Baek e Lee, 2012; Carrasco, Morales-Rueda e García-Gimeno, 2012; Møretro *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013). Estes, na presença de água, promovem a formação de biofilmes bacterianos que podem incluir microrganismos patogénicos, sendo este um dos fatores que contribui para a ocorrência de surtos de doenças de origem alimentar, principalmente as que envolvem *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* (Chmielewski e Frank, 2003). No entanto, está também demonstrada a presença na indústria alimentar de biofilmes de microrganismos patogénicos como a *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* sp., *Staphylococcus* sp. e *Escherichia coli* O157:H7 (Joseph, Otta e Karunasagar, 2001; Simões, Simões e Vieira, 2010).

Há também a possibilidade de algumas células permanecerem aderidas mesmo após o processo de higienização, sendo essa uma das principais razões para a formação de biofilmes em superfícies que entram em contato com alimentos (Chaturongkasumrit *et al.*, 2011).

Além disso, os resíduos proteicos, lipídicos e de hidratos de carbono, provenientes de produtos derivados do leite ou de carnes, são elementos importantes na formação da camada condicionante nas indústrias alimentares que irá fomentar a formação de biofilmes (Oliveira, Brugnera e Piccoli, 2010).

Também alguns locais da linha de processamento, como juntas, extremidades, bombas não são de fácil acesso, impedindo atuação correta dos agentes de limpeza e desinfecção, diminuindo a possibilidade de remoção de sujidade e eliminação de microrganismos, potenciando a formação de biofilmes (Chmielewski e Frank, 2003).

O tipo e topografia da superfície também têm um papel importante na possibilidade de contaminação destes locais uma vez que podem impossibilitar uma limpeza correta devido à presença de irregularidades na superfície. Estas, sendo próprias da superfície, ou provocadas pelo desgaste da mesma levam a um aumento da adesão de microrganismos e funcionam como proteção contra a sua remoção e também da remoção da sujidade, podendo promover a formação de biofilmes (Chaturongkasumrit *et al.*, 2011; Chmielewski e Frank, 2003). Segundo Chaturongkasumrit *et al.* (2011) a rugosidade da superfície influencia, não só a capacidade da *Listeria monocytogenes* formar biofilmes como também a sua suscetibilidade aos agentes de limpeza e desinfecção utilizados no estudo.

### **1.3.3. Consequências da presença de biofilmes**

A presença de biofilmes na indústria alimentar pode ser prejudicial e indesejável, apresentando consequências não só ao nível da saúde pública (microrganismos patogénicos), como também a nível económico (microrganismos deteriorantes) (Bayoumi *et al.*, 2012; Díez-García, Capita e Alonso-Calleja, 2012; Nguyen e Yuk, 2013; Oliveira, Brugnera e Piccoli, 2010; Rode *et al.*, 2007; Speranza, Corbo e Sinigaglia, 2011).

No que respeita ao primeiro ponto, o desenvolvimento de biofilmes nestes locais leva a um aumento de oportunidades de contaminação microbiana pois podem funcionar como uma fonte contínua ou recorrente de contaminação (Ali, Khambaty e Diachenko, 2006; Joseph, Otta e Karunasagar, 2001; Speranza, Corbo e Sinigaglia, 2011). Uma vez que os microrganismos no interior do biofilme estão protegidos da ação dos desinfetantes, e que as EPS associadas aos biofilmes não são removidas pela limpeza, a probabilidade de sobrevivência, e consequente contaminação dos alimentos aumenta. Além disso, as EPS

remanescentes fornecem um local de ligação e também nutrientes para os microrganismos recém-chegados ao sistema limpo (Chmielewski e Frank, 2003; Shi e Zhu, 2009).

A passagem dos alimentos pelas superfícies contaminadas ou a exposição a aerossóis com origem nessas superfícies leva à contaminação cruzada, sendo este um dos maiores problemas dos produtos prontos a comer uma vez que, se esta ocorre após o tratamento térmico, não há possibilidade de eliminar o microrganismo que provocou a contaminação (Bae, Baek e Lee, 2012; Chaturongkasumrit *et al.*, 2011; Chmielewski e Frank, 2003).

A presença de microrganismos, principalmente envolvidos pela matriz do biofilme, pode levar à contaminação cruzada, ou seja a contaminação de um alimento através do contacto com as superfícies ou utensílios contaminados. Esta pode causar surtos de toxinfecções alimentares, uma vez que os alimentos contaminados podem transmitir o agente infeccioso ao Homem (Ali, Khambaty e Diachenko, 2006; Møretreth *et al.*, 2012).

A contaminação dos produtos alimentares diminui também o tempo de vida útil dos produtos perecíveis e aumenta o risco de deterioração de alimentos (Burgos *et al.*, 2012; Chmielewski e Frank, 2003; Speranza, Corbo e Sinigaglia, 2011; Stepanovic *et al.*, 2003). Além disso, foi demonstrado que as bactérias patogénicas presentes nos biofilmes são a principal fonte de contaminação de alimentos. Por exemplo, a percentagem de amostras de aves contaminadas com salmonela aumenta significativamente ao longo do seu processamento, como consequência da presença de bactérias nas superfícies com as quais os alimentos entram em contacto (Díez-García, Capita e Alonso-Calleja, 2012).

Relativamente aos prejuízos económicos, os biofilmes podem atuar como camadas isolantes e provocar corrosão microbiologicamente induzida (Shakeri *et al.*, 2007; Shi e Zhu, 2009; Stepanovic *et al.*, 2003). Esta corrosão prejudica a transferência de calor entre as superfícies, que pode também ser afetada pela presença de biofilmes espessos nas placas de permutadores de calor (Bayoumi *et al.*, 2012; Shi e Zhu, 2009). Podem ainda reduzir a eficácia de produção, produzir odores desagradáveis, bloquear tubagens, provocar falhas no equipamento e nos sistemas de água e torres arrefecimento (Nguyen e Yuk, 2013; Shi e Zhu, 2009; Speranza, Corbo e Sinigaglia, 2011). Estes fatores têm como consequência a redução da vida útil dos equipamentos, perdas ou maior consumo de energia, maiores despesas de manutenção e perda de qualidade do produto, levando a maiores perdas económicas (Díez-García, Capita e Alonso-Calleja, 2012; Oliveira, Brugnera e Piccoli, 2010).

### **1.3.4. Estratégias de redução da formação de biofilmes**

A prevenção da formação de biofilmes é uma melhor opção do que o seu posterior tratamento, no entanto não há nenhuma técnica que permita prevenir com sucesso a formação de biofilmes sem efeitos secundários adversos. Por isso, a melhor estratégia é a limpeza e desinfecção regulares de modo a prevenir a adesão de microrganismos (Møretre et al., 2012; Simões, Simões e Vieira, 2010).

A limitação de nutrientes e água, a melhoria do *design* do equipamento e o controlo da temperatura são também importantes no controlo dos biofilmes, no entanto na maioria dos casos não é possível alterar estas condições (Chmielewski e Frank, 2003). A implantação de sistemas de gestão de qualidade nas indústrias alimentares e aplicação efetiva de agentes de limpeza e desinfetantes é importante na indústria alimentar. Sem estes, os microrganismos e resíduos podem não ser completamente removidos das superfícies e instalações que estão em contacto com os alimentos resultando na formação de biofilmes (Oliveira, Brugnera e Piccoli, 2010; Stepanovic et al., 2003).

Nas indústrias alimentares a higienização divide-se em duas etapas distintas: a limpeza e a desinfecção (Oliveira, Brugnera e Piccoli, 2010). A primeira é a limpeza que tem como objetivo a remoção de resíduos orgânicos e inorgânicos aderidos às superfícies, constituídos principalmente por proteínas, hidratos de carbono, gorduras e sais minerais (Oliveira, Brugnera e Piccoli, 2010). Já a desinfecção, tem como objetivo diminuir o número de células viáveis presentes na superfície (Simões, Simões e Vieira, 2010).

Um procedimento de limpeza eficaz deve remover efetivamente os restos de alimentos e outra sujidade que possam conter microrganismos e promover o crescimento microbiano. No entanto, a presença de biofilmes dificulta este processo devido à presença das EPS. Assim, um procedimento eficaz deve também se capaz de remover estas substâncias, permitindo o contacto eficaz dos desinfetantes com as células presentes no interior do biofilme (Carrasco, Morales-Rueda e García-Gimeno, 2012; Chmielewski e Frank, 2003; Simões, Simões e Vieira, 2010). Neste procedimento podem ser utilizados apenas produtos químicos ou a combinação de produtos químicos e força física (turbulência da água ou esfregando), e ainda a utilização de temperaturas elevadas, que podem reduzir a necessidade da força física. Estes suspendem e dissolvem os resíduos de alimentos por diminuição da tensão de superfície, emulsificam das gorduras e peptizam das proteínas (Chmielewski e Frank, 2003; Simões, Simões e Vieira, 2010). Este procedimento pode remover cerca de 90 % dos microrganismos presentes na superfície mas não os mata

podendo estes posteriormente depositar-se noutros locais e se tiverem as condições necessárias, formam biofilme. Além disso, podem formar-se aerossóis contendo microrganismos viáveis promovendo a sua dispersão no meio envolvente contaminando outras superfícies (Chmielewski e Frank, 2003; Oliveira, Brugnera e Piccoli, 2010; Simões, Simões e Vieira, 2010).

Por estes motivos, torna-se necessária uma segunda etapa de desinfecção, utilizando agentes antimicrobianos para matar os microrganismos (Simões, Simões e Vieira, 2010). Este processo, ao diminuir o número de células viáveis presentes na superfície, quebra a cadeia de infeção (por exemplo por *Salmonella*) através da redução do risco de contaminação cruzada (Møretrø *et al.*, 2012; Simões, Simões e Vieira, 2010).

#### **1.4. Desinfetantes**

Os desinfetantes são definidos como formulações que têm na sua composição substâncias biocidas, que atuam de forma não específica em vários componentes da célula. Estas formulações reduzem, para uma quantidade considerada adequada para a sua utilização, o número de microrganismos viáveis na superfície (Bridier *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2010).

Um desinfetante ideal para a preparação de alimentos ou ambientes de produção deve ser seguro (toxicidade, inflamabilidade e ao nível dos alergénios), não ter um impacto negativo nos materiais das superfícies (corrosividade, coloração e reatividade). Deve também ser estável durante o armazenamento e numa ampla gama de valores de pH e temperatura e ser robusto em relação aos fatores ambientais (sujidade, dureza da água e diluição). Além disso deve ter um largo espectro de atividade, ser rentável e amigo do ambiente e ser fácil de utilizar não alterando as propriedades do produto final (Møretrø *et al.*, 2012; Simões, Simões e Vieira, 2010). No entanto, não há nenhuma formulação que satisfaça todos estes critérios, por isso é necessário ter em atenção quais os mais importantes dependendo do tipo de aplicação (Trond Møretrø *et al.*, 2012). Assim, a escolha do agente desinfetante depende, principalmente, do tipo de microrganismo a ser eliminado, assim como da natureza do equipamento a ser desinfetado (Oliveira, Brugnera e Piccoli, 2010).

A maioria dos desinfetantes utilizados na indústria alimentar são, halogéneos, compostos de peróxigénio (como peróxido de hidrogénio, perborato de sódio, percarbonato de sódio) e compostos de amónio quaternário (Ali, Khambaty e Diachenko, 2006; Chmielewski e Frank, 2003; Møretrø *et al.*, 2012). Podem também ser utilizados álcoois e compostos orgânicos e inorgânicos que libertam cloro, contudo todos têm

diferentes propriedades e âmbitos de utilização (Møretrø *et al.*, 2012; Oliveira, Brugnera e Piccoli, 2010).

Os compostos que libertam cloro, como o hipoclorito, além de muito utilizados na indústria alimentar, são também utilizados em ambiente doméstico devido ao seu poder desinfetante e oxidante (Chmielewski e Frank, 2003; Møretrø *et al.*, 2012; Srey, Jahid e Ha, 2013). Este composto apresenta como vantagens: um largo espectro de atividade, atuação rápida e ser barato. Normalmente é mais eficiente a valores de pH baixos, mas devido à formação de gases tóxicos contendo cloro, e ao aumento da corrosão é normalmente, utilizado a valores de pH alcalinos (Trond Møretrø *et al.*, 2012).

Os desinfetantes contendo peróxido de hidrogénio ou ácido peracético (resultante da reação do peróxido de hidrogénio e do ácido acético ou da oxidação do acetaldeído) (Srey, Jahid e Ha, 2013) são considerados amigos do ambiente uma vez que se degradam em oxigénio e água (ou ácido acético), têm também um largo espectro de atividade e atuam rapidamente. Este tipo de desinfetantes são também muitas vezes utilizados devido à sua atividade a baixas temperaturas. O ácido peracético é o mais utilizado desta classe de desinfetantes. É um biocida mais forte do que o peróxido de hidrogénio e é geralmente mais eficaz que o cloro uma vez que mantém a sua atividade mesmo na presença de matéria orgânica. (Chmielewski e Frank, 2003; Møretrø *et al.*, 2012). Além disso, a utilização do peróxido de hidrogénio apresenta algumas limitações como: decomposição a temperaturas elevadas e o efeito adverso da matéria orgânica na sua atividade (Trond Møretrø *et al.*, 2012). No entanto, geralmente é considerado seguro para desinfeção de equipamento de processamento de alimentos (Ali, Khambaty e Diachenko, 2006; Srey, Jahid e Ha, 2013).

Estes desinfetantes, comparativamente com o hipoclorito, foram considerados mais eficazes contra *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* sp. na matriz de biofilme. Além disso, o ácido peracético é eficaz contra biofilmes bacterianos, sendo a sua utilização vantajosa em biofilmes contendo resíduos de alimentos (Chmielewski e Frank, 2003).

Os desinfetantes à base de agentes tensioativos como os compostos de amónio quaternário são ativos contra uma vasta gama de bactérias em estado vegetativo e podem ser usados numa ampla gama de temperaturas (Trond Møretrø *et al.*, 2012). Além da sua ação desinfetante, têm também uma ação de limpeza, podendo ser aplicados como espuma, aumentando o tempo de contacto, comparado com a solução aquosa, em tubos, paredes e tetos (Chmielewski e Frank, 2003). Têm ação contra microrganismos bolores, leveduras, Gram-positivos e Gram-negativos, no entanto são mais efetivos contra Gram-positivos do que Gram-negativos (Ali, Khambaty e Diachenko, 2006; Chmielewski e Frank, 2003). Normalmente, não são utilizados na limpeza no local de processamento devido à formação

de espuma e à redução da sua atividade na presença de água dura (Trond Møretro et al., 2012). Além disso, a sua degradação no ambiente é lenta e os seus resíduos podem levar ao desenvolvimento de resistência nas bactérias (Trond Møretro et al., 2012). Contudo, não são corrosivos nem irritantes e a sua atividade não é afetada pela quantidade de material orgânico (Chmielewski e Frank, 2003).

Relativamente aos desinfetantes à base de álcool, são eficazes contra uma variedade de microrganismos e relativamente robustos na presença de matéria orgânica. No entanto, o seu uso é limitado devido a razões de segurança (saúde e inflamabilidade) e ao seu preço relativamente alto. Por isso, os álcoois são maioritariamente utilizados na desinfeção das mãos e de equipamento que não resista ao contacto com água (Trond Møretro et al., 2012).

#### **1.4.1. Diminuição da eficácia de desinfeção**

Uma menor eficácia do processo de desinfeção pode dever-se a quatro principais fatores: tempo de contato, temperatura, concentração e presença de matéria orgânica (por exemplo: hidratos de carbono e gorduras) (Cerf, Carpentier e Sanders, 2010; Ramesh, Joseph e Carr, 2002; Srey, Jahid e Ha, 2013). Além destes fatores, a eficácia do desinfetante pode ainda ser diminuída pela dureza da água, possibilidade de contacto com os microrganismos sobreviventes, sensibilidade e tipo de microrganismos alvo, tipo de superfície e meio a ser desinfetado (Chmielewski e Frank, 2003; Møretro et al., 2012; Simões, Simões e Vieira, 2010).

Deve ter-se em atenção a escolha do desinfetante tendo em conta a probabilidade da presença de biofilme e carga microbiana associada a este (Chmielewski e Frank, 2003). Uma vez que nos métodos que testam a eficácia dos desinfetantes são utilizadas células planctónicas, estes resultados não refletem a eficácia dos desinfetantes na presença de biofilmes maduros (Ali, Khambaty e Diachenko, 2006).

#### **1.4.2. Mecanismos de resistência dos biofilmes**

Os biofilmes aumentam a resistência microbiana a agentes químicos, físicos e biológicos, pois protegem as bactérias do *stress* ambiental (Bae, Baek e Lee, 2012; Bridier et al., 2011; Díez-García, Capita e Alonso-Calleja, 2012). Por isso, a capacidade para formar

biofilmes foi identificada como um fator importante na persistência de bactérias nas instalações de processamento de alimentos, além disso, a fase de crescimento bacteriano irá influenciar a suscetibilidade das bactérias aos desinfetantes. Por exemplo, as bactérias em fase exponencial são mais sensíveis aos desinfetantes do que na fase estacionária (Díez-García, Capita e Alonso-Calleja, 2012; Møretrø *et al.*, 2012). Um estudo comprovou que as células sésseis são mais difíceis de remover mecanicamente das superfícies de contacto com alimentos, e são mais resistentes a desinfetantes quando comparados com células planctónicas (Gilbert, McBain e Rickard, 2003). Ou seja, as bactérias envolvidas por biofilme apresentam uma maior resistência aos desinfetantes relativamente às culturas planctónicas do mesmo microrganismo (Ali, Khambaty e Diachenko, 2006; Burgos *et al.*, 2012; Díez-García, Capita e Alonso-Calleja, 2012; Oliveira, Brugnera e Piccoli, 2010; Stepanovic *et al.*, 2003). Além da resistência aos agentes desinfetantes, apresentam também maior resistência aos antibióticos (Pitts, Hamilton, Zilver, & Stewart, 2003).

Esta resistência é atribuída a várias propriedades associadas aos biofilmes como por exemplo a difusão reduzida devido à matriz de EPS que diminui a penetração (atua como uma barreira difusora) de agente antimicrobiano e atua como um absorvente, reduzindo a quantidade de agente antimicrobiano disponível ou impedindo que este atinja as células do biofilme (Bridier *et al.*, 2011; Kaplan, 2010; Nguyen e Yuk, 2013; Wood, Hong e Ma, 2011); mudanças fisiológicas devido a menores taxas de crescimento, principalmente bactérias que se encontram nas camadas mais internas do biofilme (Nguyen e Yuk, 2013; Oliveira, Brugnera e Piccoli, 2010). E ainda, a produção de enzimas que degradam as substâncias antimicrobianas; e diferenças fisiológicas nas células sésseis, que as tornam distintas das planctónicas por expressão de fatores de proteção específicos como por exemplo bombas de efluxo (Nguyen e Yuk, 2013; Oliveira, Brugnera e Piccoli, 2010).

A matriz pode ainda reagir com os desinfetantes levando à sua inativação, uma vez que alguns, como referido anteriormente, podem ver reduzida ou eliminada a sua ação na presença de compostos orgânicos (proteínas, polissacarídeos e lípidos (Oliveira, Brugnera e Piccoli, 2010).

A incorreta aplicação de detergentes e desinfetantes pode também levar ao aparecimento de resistências devido à utilização de doses sub-letais de agentes antimicrobianos em células de biofilmes, assim como, a maior densidade microbiana no interior do biofilme pode levar ao aumento da resistência (Oliveira, Brugnera e Piccoli, 2010). E ainda os microrganismos patogénicos presentes nos ambientes de processamento de alimentos estão normalmente expostos a *stress* ambiental sub-letais durante o processo,

o que pode levar a respostas adaptativas e resistência aumentada, diminuindo eficácia das técnicas de desinfecção (Nguyen e Yuk, 2013).

A resistência pode ser aumentada por outros fatores, como por exemplo, a idade do biofilme, as condições de crescimento e a ligação à superfície, o pH, a atividade da água, composição nutricional e temperatura (Nguyen e Yuk, 2013). Além disso, os biofilmes formados por várias espécies, encontrados nas indústrias alimentares apresentam um maior risco uma vez que as diferentes espécies se podem proteger durante a aplicação dos agentes químicos devido às diferenças na resistência aos agentes químicos entre espécies (Oliveira, Brugnera e Piccoli, 2010).

## **1.5. Objetivos do estudo**

As infeções provocadas por *S. enterica* são veiculadas principalmente através dos alimentos e estão reconhecidas como um dos maiores problemas de saúde pública tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento, causando doença tanto no homem como nos animais e ainda perdas financeiras significativas em todo o mundo (Díez-García, Capita e Alonso-Calleja, 2012).

Este microrganismo tem a capacidade de formar biofilmes e estes, por isso, quando presente em locais de processamento de alimentos, e se reunidas as condições necessárias, pode formá-los. A presença de biofilmes por sua vez irá levar à contaminação de alimentos e a dificuldades no processo de limpeza e desinfecção.

Embora não haja muitos estudos sobre biofilmes de salmonela, sabe-se que, geralmente os biofilmes são mais resistentes aos agentes desinfetantes do que as células planctónicas. Assim, os principais objetivos do presente trabalho foram:

1. Montagem de uma técnica, baseada na absorvância do cristal violeta, que permita avaliar a formação de biofilme, tendo em conta os fatores que a podem influenciar, como por exemplo, o ajustamento do inóculo;
2. Avaliação da variação da formação de biofilme entre serotipos;
3. Avaliação da variação da formação de biofilme entre estirpes do mesmo serotipo;
4. Avaliação da eficácia de desinfetantes e produtos de limpeza de superfícies usados em restaurantes em Portugal em biofilmes de *S. enterica*.

# **II. MATERIAIS E MÉTODOS**

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Estirpes bacterianas**

Os isolados de *Salmonella enterica* usados neste estudo pertencem à coleção da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC). Foram isoladas de amostras animais de porco, bovino e aves, identificadas segundo a norma ISO 6579/A1, e serotipadas de acordo com o método de White-Kauffmann/Le Minor (Grimont e Weill, 2007) pelo laboratório ControlVet, Tondela, Portugal.

As estirpes foram selecionadas tendo em conta a sua origem (exploração), o tipo de amostra, o animal de onde foram isoladas (tabela 1) e os resultados dos testes de suscetibilidade aos antibióticos (ver anexo I).

Inicialmente, foram testados sete serotipos diferentes para avaliar diferenças na formação de biofilme e, posteriormente foram testados 15 isolados de *S. Typhimurium*, uma vez que se verificou uma diferença na capacidade de formação de biofilme entre os dois isolados deste serotipo testados, e também pela sua importância a nível epidemiológico.

### **2.2. Avaliação da formação de biofilme pelo método de cristal de violeta**

Os métodos de quantificação de biofilme em placas de microdiluição são dos mais utilizados na investigação, e têm sido usadas várias versões para a avaliação da formação de biofilmes *in vitro* (Agarwal, Singh, Bhilegaonkar, & Singh, 2011). A técnica utilizada baseou-se no método descrito por Stepanović *et al.*(2000) com algumas modificações.

As bactérias guardadas a -80 °C foram cultivadas em agar tripticase de soja (TSA) (Liofilchem Diagnostici, Liofilchem, Itália) e incubadas a 37 °C durante 18-24h. Após incubação, foram repicadas para tubos com cerca de 5 mL de caldo de tripticase de soja (TSB) (Liofilchem Diagnostici, Liofilchem, Itália), e incubadas a 37 °C/18-24h com agitação moderada (120 rpm).

**Tabela I-** Características das estirpes de *Salmonella enterica* estudadas

Estirpe	Serotipo	Produto biológico	Animal de origem	Loc. Geográfica <sup>a</sup>	Exploração <sup>b</sup>
<b>S.NTCC 12023</b>	S. Typhimurium	NC	NC <sup>c</sup>	NC	NC
<b>S. 23</b>	S. Typhimurium	Almôndegas	Suíno	NC	M3
<b>S. 25</b>	S. Typhimurium	Hambúrguer	Suíno	NC	M3
<b>S. 29</b>	S. Infantis	Hambúrguer	Bovino	NC	M7
<b>S. 44</b>	S. Agona	Fezes	Poedeiras	Lisboa	A24
<b>S. 50</b>	S. Typhimurium	Frango Temperado	Frango	NC	M11
<b>S. 55</b>	S. Typhimurium	Pele pescoço	Frango	NC	M16
<b>S. 58</b>	S. Typhimurium	Carcaça	Suíno	NC	M2
<b>S. 73</b>	S. Typhimurium	Salsicha fresca	Suíno	NC	M18
<b>S. 86</b>	S. Virchow	Fezes	Frango	Aveiro	A43
<b>S. 89</b>	S. Enteritidis	Hambúrguer	Frango	NC	M22
<b>S. 90</b>	S. Typhimurium	Espetadas	Peru	NC	M23
<b>S. 105</b>	S. Typhimurium	Salsicha fresca	Suíno	NC	D2
<b>S. 136</b>	S. Typhimurium	Salsicha fresca	Aves	Viseu	M32
<b>S. 145</b>	S. Typhimurium	Frango temperado	Aves	NC	M4
<b>S. 159</b>	S. Derby	Fezes	Peru	Lisboa	A75
<b>S. 160</b>	S. Havana	Fezes	Frango	Viseu	A76
<b>S. 273</b>	S. Typhimurium	Rolo carne	Suíno	NC	M3
<b>S. 394</b>	S. Typhimurium	Salsicha fresca	Suíno	NC	D2
<b>S. 398</b>	S. Typhimurium	Salsicha fresca	Suíno	NC	D2
<b>S. 423</b>	S. Typhimurium	Alheira	NC	NC	D13

<sup>a</sup>-Loc. Geográfica- Localização geográfica

<sup>b</sup>-A - Aves, M - Matadouro/transformação; D – Distribuição

<sup>c</sup>- Não conhecido

Numa primeira fase, e de modo a aferir a concentração do inóculo inicial adequada para a quantificação do biofilme formado, após o período de incubação, foram transferidas pequenas amostras da suspensão bacteriana de cada tubo para um tubo *Eppendorf*, e esta suspensão foi posteriormente diluída em TSB (1:10). Desta diluição foram retirados 20 µL e colocados no primeiro poço de uma placa de microdiluição de 96 poços (Sterilin Limited, Reino Unido) previamente preenchido com 180 µL de TSB. Deste primeiro poço foram retirados 20 µL para o segundo poço, contendo 180 µL de TSB, e foram feitas diluições sucessivas ( $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) até se obter a diluição  $10^{-4}$  no quarto poço.

Depois da inoculação das placas foi lida a densidade ótica (DO) da suspensão bacteriana e da diluição feita para inocular as placas, num espectrofotómetro (Genesys 10 UV-Vis, Thermo Scientific, Estados Unidos da América) a 570 nm. Esta medição tinha como

objetivo averiguar se havia diferenças no crescimento bacteriano entre os diferentes isolados e também se a quantidade de células que se inoculava era idêntica para cada ensaio.

A diluição aferida foi a de 1:100, uma vez que foi esta que, para as estirpes que se utilizaram para aferição (S. NTCC 12023 e S. 25; ver tabela 1), a formação de biofilme era mais elevada. A utilização das outras diluições poderia levar a que, num isolado com menor capacidade de formação de biofilme, este não fosse detetado através deste método.

Depois de aferida a diluição, foi avaliada a sua turbidez na escala de McFarland através de um densitómetro (DEN-1B, Biosan, Letónia). A turbidez da solução correspondeu ao valor de 0,1 da escala de McFarland (que corresponde a cerca de  $3,00 \times 10^8$  células/mL) e, a partir deste momento, em vez do crescimento em TSB durante 18 a 24h passou-se a suspender algumas colónias isoladas de uma cultura de 18-24 h em TSA num tubo de vidro com TSB até se obter uma turbidez de 0,1. Este procedimento permite com maior facilidade e menor manipulação, garantir que o número de células inoculadas em cada poço é igual para cada ensaio.

Assim sendo, a formação de biofilme foi avaliada do seguinte modo: após o descongelamento das estirpes e da sua passagem para uma nova caixa de TSA, foram retiradas algumas colónias da cultura, e suspensas num tubo contendo aproximadamente 9 mL de TSB até obter uma turbidez de 0,1 da escala de McFarland. De seguida, foram adicionados 200  $\mu$ L desta suspensão em cada poço de uma placa de microdiluição de 96 poços estéril de fundo cónico, inoculando 3 poços por estirpe (ensaio em triplicado) e, por cada uma, foi feito um controlo negativo, contendo apenas 200  $\mu$ L TSB. As placas foram incubadas a 30 °C (Burgos et al., 2012; Furukawa, Akiyoshi, O'Toole, Ogihara, & Morinaga, 2010; Shakeri et al., 2007) com agitação de 120 rpm, num agitador orbital (PSU-2T, Biosan, Letónia) durante 6, 24, 48 e 72 h. Após o período de incubação procedeu-se à contagem de células planctónicas (não aderentes) e à avaliação da formação do biofilme.

Para a contagem de células, foi retirada uma amostra do conteúdo dos poços e foram feitas diluições seriadas entre  $10^{-8}$  a  $10^{-11}$ , dependendo do isolado e do tempo de incubação. Foram retirados 10  $\mu$ L das últimas diluições, e inoculados por espalhamento em placas de TSA. Estas placas foram incubadas a 37 °C durante 18-24 h, tempo após o qual foram contadas as unidades formadoras de colónias (UFC) das placas com o número de colónias entre 30 a 300 e registados os resultados.

Para avaliar a formação de biofilme, o conteúdo dos poços foi completamente removido com o auxílio de uma pipeta e estes foram lavados três vezes com 200  $\mu$ L de água Mili-Q estéril. No final da última lavagem, foi removido o excesso de água invertendo a placa sobre um pouco de papel absorvente, e esta foi colocada a secar durante 5 minutos a 37 °C.

Depois da secagem, as células aderidas foram fixadas com 200  $\mu$ L de etanol 98%, em cada poço, durante 15 minutos a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Esta solução foi preparada através da diluição de etanol absoluto (Fisher Scientific, Reino Unido) em água Mili-Q estéril. De seguida, foi retirado o etanol com uma pipeta e a placa foi invertida sobre o papel absorvente de modo a remover o excedente. Seguidamente foram adicionados 200  $\mu$ L de Cristal Violeta (CV) (Liofilchem Diagnostici, Liofilchem, Itália) em cada poço durante 5 minutos, tempo após o qual foi removido, e os poços lavados três vezes (ou até a água retirada se apresentar transparente), com 220  $\mu$ L de água Mili-Q estéril. Depois a placa foi invertida sobre papel absorvente e colocada a secar a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos. De seguida, o CV incorporado nas células aderentes foi solubilizado através da adição de 200  $\mu$ L de ácido acético a 33 % (v/v) por poço, solução previamente preparada através da diluição de ácido acético glacial (Merck, Alemanha) em água Mili-Q estéril.

Finalmente, a placa foi agitada num agitador orbital durante 1 minuto, o seu conteúdo foi transferido para uma nova placa de 96 poços de fundo plano (Sterilin Limited, Reino Unido), uma vez que o fundo cónico pode alterar o valor dado pelo leitor, e foi lida a absorvância a 570 nm, num leitor de placas (Synergy HT, BioTek, Estados Unidos da América).

### **2.3. Desinfetantes e produtos de limpeza de superfícies testados**

Os desinfetantes e produtos de limpeza utilizados no estudo apresentam-se na tabela 2. O hipoclorito 12-16 % de cloro livre (Riedel-de Haën, Alemanha), o etanol 70 % (preparado por diluição de etanol absoluto), Glutaraldeído 25 % (TAAB Laboratories Equipment, Reino Unido) e o Triton-X 5 %, preparado por diluição de Triton-X 100 (AMRESCO, Estados Unidos da América) em água Mili-Q estéril foram selecionados após revisão bibliográfica, e tendo em conta os reagentes disponíveis no laboratório. O Glutaraldeído e o Triton-X 5 % foram testados apenas inicialmente, e não em todos os isolados, devido aos resultados que apresentaram.

O DLL-B (Mistolin, Portugal) e o DMP-30 (Mistolin, Portugal) foram escolhidos após uma pequena prospeção em alguns restaurantes da zona centro sobre produtos de limpeza utilizados nos processos de higienização. O primeiro é um detergente para lavagem de louça manual, desinfetante e bactericida, composto por 5 a 15 % de tensioativos aniónicos, menos de 5 % de tensioativos anfotéricos e contendo como agentes bactericidas 2- hidroxifenil éter e o formaldeído. O segundo é um detergente desinfetante bactericida usado na limpeza de

frigoríficos e bancas e é constituído por mais de 30 % de tensoativos aniónicos, menos de 5 % de tensoativos não aniónicos e 5 a 15 % de álcool etílico, ambos foram diluídos em água segundo as instruções do fabricante, sendo utilizada água estéril, devido ao objetivo da sua utilização. Na avaliação da resistência dos biofilmes foram testados na concentração de 5 % por ser a diluição sugerida pelo fabricante para a sua utilização.

**Tabela 2** - Desinfetantes utilizados no estudo e suas diluições

<b>Desinfetante</b>	<b>Diluição utilizada para remoção do biofilme</b>	<b>Diluição utilizada para avaliação da suscetibilidade dos isolados pelo método de Kirby-Bauer</b>
<b>Hipoclorito 12-16 %</b>	Sem diluição; 10 %	Sem diluição
<b>Glutaraldeído 25 %</b>	Sem diluição	Sem diluição
<b>Etanol</b>	70 %	70 %
<b>Triton - X 100</b>	5 %	5 %
<b>DMP-30</b>	5 %	1 %; 2,5 %; 5 %; 10 %; 20 %
<b>DLL-B</b>	5 %	1 %; 2,5 %; 5 %; 10 %; 20 %

#### **2.4. Avaliação da resistência do biofilme aos desinfetantes e produtos de limpeza**

Para a avaliação da resistência do biofilme aos desinfetantes e produtos de limpeza, procedeu-se da forma descrita no subcapítulo 2.2 até ao final da lavagem do biofilme para remoção das células planctónicas. Após a terceira lavagem, apenas foi retirado o excesso de água invertendo a placa sobre o papel absorvente e, de seguida, foram adicionados 200 µL do desinfetante ou produto de limpeza a testar aos poços selecionados (ensaio em triplicado) com as diluições indicadas na tabela 2. Foram avaliados dois tempos de contacto com o biofilme: 5 e 30 min. Foi ainda testada a aplicação de desinfetantes durante 20, 25 e 35 min mas apenas para os isolados *S. Typhimurium* NTCC 12023, 25, 145 e 273 (tabela 1). No final do tempo de contacto, foi removido o desinfetante e os poços foram lavados três vezes, com 200 µL de água Mili-Q estéril, foi retirada a água remanescente, conforme descrito anteriormente, e a placa foi colocada a secar durante 5 min a 37 °C. Depois da secagem, o procedimento é igual ao descrito no subcapítulo 2.2.

## **2.5. Avaliação da suscetibilidade dos isolados em estudo aos desinfetantes baseada no método de Kirby- Bauer**

De modo a aferir a suscetibilidade dos isolados bacterianos aos desinfetantes em estudo, foi utilizado um método baseado na técnica de Kirby-Bauer (ou método de difusão em disco). Com uma ansa estéril, suspenderam-se algumas colónias isoladas de uma cultura de 18-24 h em meio sólido num tubo com cerca de 5 mL água estéril, ajustando a turbidez a 0,5 da escala de McFarland. De seguida, foi introduzida uma zaragatoa estéril na suspensão bacteriana, removido o excesso de suspensão pressionando a zaragatoa contra o tubo e foram semeadas de agar Muller- Hinton (Liofilchem, Itália) em toalha de modo homogéneo, passando a zaragatoa em, pelo menos, três direções diferentes.

Depois do inóculo estar seco (cerca de 5 min), com o auxílio de uma pinça, foram colocados discos de papel de filtro previamente esterilizados, e devidamente separados sobre a gelose (cerca de 2 cm entre si e dos extremos das placas). Foram adicionados 10 µL de solução de desinfetante (ver tabela 2) a cada um dos discos, exceto um que funciona como controlo de crescimento bacteriano.

Antes de inverter a placa, esperou-se que o desinfetante fosse absorvido e, por fim, a placa foi colocada a incubar 37 °C durante 18-24 h. Após o tempo de incubação, foi medido o diâmetro do halo de inibição de crescimento em milímetros, e resultados foram registados.

## **2.6. Avaliação da ação dos desinfetantes nas células planctónicas**

Para determinar a ação dos desinfetantes em células planctónicas aplicou-se 100 µL da solução de desinfetante diretamente em 100 µL de uma cultura de células planctónicas após 24 h de incubação a 30 °C. A suspensão bacteriana foi retirada dos 3 primeiros poços da linha cada isolado, colocada num tubo *Eppendorf* e depois homogenizada. Após a adição do desinfetante foi feito um ligeiro vórtex, e, após 5 min foi feito novamente. De seguida, foi inoculada uma caixa de TSA com 10 µL desta suspensão, por espalhamento, e incubada a 37 °C/18-24 h. Após incubação, foi contado e registado o número de UFC, sendo este comparado com o número de células planctónicas diluídas 1:2 de modo a avaliar o número de UFC eliminadas pela ação do desinfetante.

## **2.7. Avaliação da relação genética dos isolados de *S. Typhimurium* por electroforese em gel em campo pulsado (PFGE)**

A tipagem de microrganismos patogénicos ou a identificação de clones e estirpes é especialmente importante no diagnóstico, tratamento e vigilância epidemiológica de infeções bacterianas, principalmente aquelas causadas por microrganismos que apresentam elevados níveis de resistência a antibióticos ou virulência, e ainda, os microrganismos envolvidos em infeções pandémicas e/ou nosocomiais (Wolska e Szweda, 2012).

Todos os isolados em estudo foram testados por electroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Os isolados de *S. Typhimurium*, onde se incluíam os isolados que formaram maior biofilme, foram estudados em maior detalhe com o objetivo de avaliar a sua relação genética. E ainda, se pertencendo ao mesmo serotipo, isolados relacionados geneticamente relacionados, formam quantidades idênticas de biofilme e se a aplicação de desinfetante tem efeito idêntico.

Os isolados foram cultivados em TSA e incubados a 37 °C durante 18-24 h. Depois deste tempo, algumas colónias foram suspensas em 800 µL de tampão fosfato (TF) 50 mM pH 8 num *Eppendorf* e foi feito vórtex até se obter uma suspensão homogénea. Esta suspensão foi depois transferida para uma cuvete para leitura da densidade ótica (DO) a 650 nm, utilizando como branco, 1 mL de TF à temperatura ambiente. A DO deveria situar-se entre 1,2 e 1,4. Se fosse menor que 1,2 eram acrescentadas mais colónias e se fosse maior que 1,4 era adicionado TF sem retirar a cuvete do espectrofotómetro até se obter um valor aceitável. De seguida, foram retirados 300 µL desta suspensão e transferidos para novos tubos *Eppendorf's* identificados, que eram colocados em banho-maria (BM) durante 5 min a 41 °C.

Posteriormente foi preparado o gel para obtenção dos discos de agarose com o ADN bacteriano. A concentração do gel é de 1,5 % assim, num Erlenmyer pequeno contendo 10 mL de TF, foi adicionado 0,15 g de SeaKem Gold Agarose para PFGE (Lonza, Rocklandan ME, Estados Unidos) indo ao microndas até dissolver a agarose, com cuidado para não ferver e concentrar. A agarose foi depois colocada no BM, onde se colocaram as amostras, para que não polimerize. Aos 300 µL de suspensão bacteriana foi adicionado o mesmo volume de agarose, fazendo-se vórtex e distribuindo-se a suspensão, com cuidado para não formar bolhas, por três moldes (por cada isolado) previamente identificados, e com a parte de baixo protegida com parafilme. Após a preparação de todos os moldes, estes

foram colocados no congelador a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 4 minutos precisos para que o gel não congele, e de seguida foram colocados durante pelo menos 10 min à temperatura ambiente.

Depois, com o auxílio de uma ansa, os discos foram retirados do molde e colocados em tubos Falcon de 15 mL (um tubo para cada isolado) de modo a ficarem emersos em 1 mL de tampão de lise (tampão EC) (A composição das soluções e tampões utilizadas neste método são apresentadas no anexo 2), e foram incubados a  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 3 h. Foi então preparada a solução de lise com proteinase K (20 mg/mL) (Smart Molecular Solutions, BIORON GmbH, Germany). Após o tempo de incubação, com o auxílio de uma pipeta, foi retirado, o tampão EC, tanto quanto possível, e adicionado 1 mL de solução de lise com proteinase K a cada tubo, confirmando a imersão dos discos e os tubos foram colocados em BM a  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  com agitação durante 18 h.

Após a incubação *overnight*, a solução foi rejeitada com a ajuda de pipetas de vidro de 10 mL, e foram adicionados 5 mL de água destilada estéril, ficando 5 min à temperatura ambiente. De seguida, foi rejeitada a água, e foram adicionados 7,5 mL de Tampão Tris-EDTA (TE) 0,5x, que estava em gelo. Os tubos foram agitados durante 30 minutos num agitador orbital a 20 ver/s, sendo este passo repetido por duas vezes. Este tinha como objetivo remover os restos das células e as proteases uma vez que estas se difundem na agarose mais facilmente do que as moléculas de ADN grandes e têm um efeito negativo na ação das enzimas de restrição (Wolska e Szweda, 2012).

Depois da terceira lavagem, foi rejeitada a solução e os discos foram colocados em *Eppendorffs* previamente identificados havendo 2 *Eppendorffs* para cada amostra. Um deles contendo 0,5 mL de TE 1x onde foi colocado apenas um disco que ia ser preparado para o gel e outro com 1 mL de TE 1x para *stock*, guardado a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

O passo seguinte é a digestão enzimática, que necessita que os discos sejam anteriormente equilibrados, isto é, o tampão é inicialmente incorporado para que a enzima possa atuar de forma mais eficaz. Para isso, é preparado um tampão de restrição (TR). Com o auxílio de uma pipeta de 1 mL, foi retirado o TE do tubo que conservou o disco e foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de TR a cada tubo. Os tubos foram posteriormente incubados em BM durante 10 min a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

De seguida foi preparada a mistura de restrição para um volume final por tubo de 100  $\mu\text{L}$ . Após incubação a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  e rejeição do tampão, com o auxílio de uma pipeta, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  a solução de restrição a cada um dos *Eppendorffs*, que foram depois incubados em BM a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 16 h, após as quais foram colocados a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  de modo a parar a reação enzimática.

Para a corrida do gel, foram preparados 3 L de Tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) 0,5x, preparado, através da diluição 150 mL de TBE 10x em 2850 mL de água estéril. De seguida foi programado o aparelho (CHEF-DR III System, BioRad) com os parâmetros 11 °C, 6 v/cm, 24 h, 120°, e foi colocado TBE até cobrir o fundo, ligada a bomba e o refrigerador. Antes de montar o berço, foi colocada a *frame* (placa preta onde se encaixa o gel) na cama do aparelho. De seguida, foi montado o molde para o gel com o pente colocado tendo cuidado de calibrar a mesa. Depois, foi preparado o gel de agarose SeaKem LE Agarose, Cambrex (BioScience Rockland Inc., Rockland ME, Estados Unidos da América) para um volume final de 150 mL a 1,2 %. Esta solução foi aquecida no micro-ondas até dissolver, depois foi colocada a arrefecer até aproximadamente 60 °C, e foi vertida na parte inferior do pente, guardando um pouco (a 60 °C, para não polimerizar) para posteriormente lacrar os poços. Após a polimerização do gel (cerca de 20 min), com o auxílio de ansas descartáveis, os discos foram colocados sobre a face posterior dos poços para que todos tenham o mesmo alinhamento e, utilizando uma pipeta, os poços foram lacrados com a agarose que restou. De seguida, retiraram-se os moldes do gel e os seus excessos e este foi colocado na cama, verificando se ficava coberto pelo tampão, e iniciou-se o programa.

Após o tempo de corrida (24h), o gel foi colocado num recipiente com TBE 0,5x com brometo de etídio (1 L de TBE 0,5x e 50 µL de Brometo de Etídio 1% [AppliChem GmbH, Alemanha]), durante 20 min, e fotografado em seguida, depois foi lavado com água destilada durante pelo menos 18 horas, e fotografado em seguida para análise. Finalmente a cama foi lavada com água destilada que circulou pela tubagem para retirar o TE restante, o TE foi retirado da cama e esta foi seca com o auxílio de papel absorvente.

# **III. RESULTADOS**

### 3. Resultados

#### 3.1. Avaliação da formação de biofilme em diferentes tempos

Inicialmente, a formação de biofilme foi avaliada às 6, 24, 48 e 72 h nos isolados referidos na Tabela 3. No entanto às 6 h, o único isolado que apresentou formação de biofilme, foi *S. Typhimurium* NTCC I2023, apresentando um valor de absorvância a 570 nm muito reduzido (0,065). Relativamente à avaliação da formação de biofilme às 72 h, verificou-se um aumento do biofilme formado nos isolados de *S. Typhimurium* 25; *S. Infantis* 29; e *S. Enteritidis* 44, que apresentavam menor formação de biofilme nas leituras anteriores. É uma diminuição da formação de biofilme no isolado que apresentava maior formação de biofilme nas leituras anteriores, *S. Typhimurium* NTCC I2023.

Deste modo, uma vez que às 6 h, não haveria grande possibilidade de detetar formação de biofilme e uma vez que às 72h, embora houvesse algum aumento na formação de biofilme, poderia ocorrer o esgotamento de nutrientes no poço, optou-se por avaliar a formação de biofilme apenas às 24 e 48 h.

**Tabela 3-** Avaliação da formação de biofilme às 6, 24, 48 e 72 h. Os valores apresentados são valores de absorvância medida a 570 nm e resultantes de ensaios efectuados em triplicado.

Isolado <sup>a</sup>	F. de biofilme <sup>b</sup> (6 h)	DP <sup>c</sup>	F. de biofilme (24 h)	DP	F. de biofilme (48 h)	DP	F. de biofilme (72 h)	DP
<b>S.NTCC I2023</b>	0,065	0,010	0,457	0,079	1,335	0,078	1,070	0,231
<b>S. 25</b>	0,000	0,026	0,478	0,607	0,597	0,160	1,038	0,250
<b>S.29</b>	0,000	0,021	0,244	0,034	0,638	0,126	0,916	0,209
<b>S. 44</b>	0,000	0,049	0,296	0,047	0,723	0,090	0,756	0,280

<sup>a</sup>- S. NTCC I2023- *S. Typhimurium*; S. 25- *S. Typhimurium*; S. 29- *S. Infantis*; S.44- *S. Enteritidis*

<sup>b</sup> -Formação de biofilme

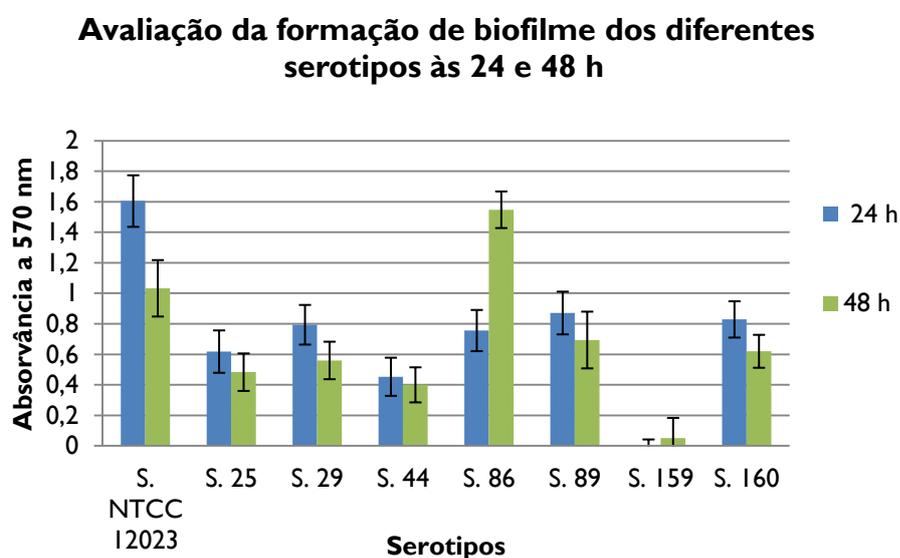
<sup>c</sup> -Desvio-padrão

##### 3.1.1. Avaliação da formação de biofilme dos diferentes serotipos

Relativamente à formação de biofilme dos diferentes serotipos às 24 h (ver Figura 3) foi possível verificar que *S. Derby* 159, não apresenta formação de biofilme e que o serótipo que apresenta maior formação de biofilme é o *Typhimurium*, mas apenas num dos isolados

testados NTCC 12023. O outro isolado testado, o *S. Typhimurium* 25 apresenta muito menor formação de biofilme. No que diz respeito à formação de biofilme após 48 h (ver Figura 3), *S. Typhimurium* NTCC 12023 continua a exibir uma elevada formação de biofilme, no entanto é ultrapassada pela *S. Agona* 86 que, após 48 h, apresenta maior formação de biofilme. A *S. Typhimurium* 25, apresenta novamente reduzida formação de biofilme havendo apenas dois serótipos que formam menos biofilme que este: *S. enteritidis* 44 e a *S. Derby* 159 .

**Figura 3** -Avaliação da formação de biofilme dos diferentes serotipos às 24 e 48 h. Os valores apresentados resultam de ensaios efectuados em triplicado.



S. NTCC 12023 -*S. Typhimurium* NTCC 12023

S. 86- *S. Agona* 86

S. 25- *S. Typhimurium* 25

S. 89- *S. Virchow* 89

S. 29-*S. Infantis* 29

S. 159- *S. Derby* 159

S. 44- *S. Enteritidis* 44

S. 160- *S. Havana* 16

Pode ainda verificar-se que, após 48 h de incubação, a quantidade de biofilme formado é menor em praticamente todos os serotipos testados, excepto no caso da *S. Agona* 86 e da *S. Derby* 159, sendo que esta última não apresentava formação de biofilme na avaliação anterior, e a formação que agora apresenta é muito fraca, apresentando apenas a absorvância de 0,050. O maior aumento ocorreu no isolado *S. Agona* 86 e a maior diminuição no *S. Typhimurium* NTCC 12023.

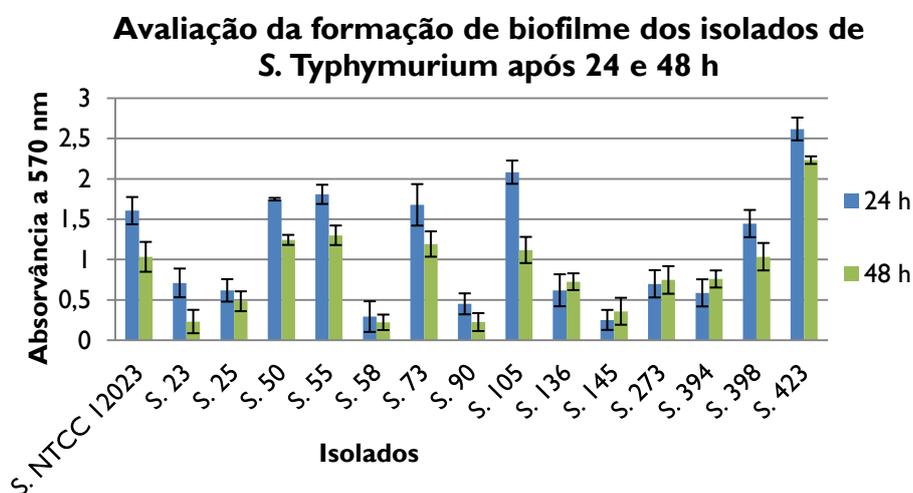
### 3.1.2. Avaliação da formação de biofilme dos isolados do serótipo *S. Typhimurium*

Foram testados 15 isolados do serótipo *Typhimurium* (Figura 4), o serotipo que revelou maior formação de biofilme no teste anterior. Assim, após 24 h de incubação, pode verificar-se que o isolado com maior formação de biofilme é o S. 423, apresentando um valor de absorvância de 2,617, e, em sentido inverso, o com menor formação de biofilme é o S. 145 que apresenta um valor de absorvância de 0,252, evidenciando uma grande heterogeneidade na capacidade de formação de biofilme deste serotipo.

Os isolados S. 423, 105, 55, 50, 73, NTCC 12023 e 398 (por ordem decrescente) são os que apresentam maior formação de biofilme, exibindo valores de absorvância entre os 2,617 e os 1,445. Os restantes isolados S. 23, 273, 136, 25, 394, 90, 58 e 145 (por ordem decrescente) apresentam menor formação de biofilme, apresentando valores de absorvância entre o 0,710 e os 0,252.

Quanto à formação de biofilme após 48 h de incubação, o grupo de isolados que apresenta maior formação de biofilme, assim como, o que apresenta menor formação de biofilme são constituídos pelos mesmos isolados, embora com algumas alterações na sua ordem. No que concerne ao grupo que apresenta maior formação de biofilme o isolado S. 423 (absorvância de 2,231) continua a ser o isolado que apresenta maior formação de biofilme. No entanto o isolado que, dentro deste grupo apresenta menor formação de biofilme é o S. NTCC 12023 apresentando um valor de absorvância de 1,033 ao contrário da avaliação anterior (24 h) na qual o isolado S. 398 ocupava esta posição.

**Figura 4-** Avaliação da formação de biofilme dos isolados de *S. Typhimurium* após 24 e 48 h. Os valores apresentados resultam de ensaios efetuados em triplicado.



No grupo de isolados que apresentam menor formação de biofilme, o isolado que apresenta maior formação de biofilme é o 394 apresentando o valor de absorvância de 0,759 ao contrário da avaliação anterior em que esta posição era ocupada pelo isolado 23. O isolado que apresenta menor formação de biofilme é o 58, ao contrário da avaliação anterior em que o isolado que apresentava menor formação de biofilme era o 145.

Assim como na avaliação da formação de biofilme dos diferentes serotipos, na maioria dos isolados ocorreu uma diminuição do biofilme formado após 48 h de incubação. Exceto no caso dos isolados 394, 273, 136 e 145, nos quais ocorreu um aumento do biofilme formado. A maior diminuição do biofilme ocorreu no isolado 105 e o maior aumento no isolado 394.

### **3.2. Avaliação da resistência do biofilme a desinfetantes e produtos de limpeza durante 5 min**

Aquando a otimização do método e seleção dos desinfetantes e produtos de limpeza a testar, além dos dois desinfetantes e dois produtos de limpeza selecionados (hipoclorito 12-16 %, etanol 70 %, DLL-B e DMP-30), foram também testados, durante 5 min, o Glutaraldeído 25%; o hipoclorito 12- 16 %, diluído 1:10 em água Mili-Q estéril, e o Triton-X 100, diluído para 5 % em água MiliQ- estéril. Os resultados obtidos com estes três últimos, apresentados na tabela 4, quando comparados com os resultados da aplicação dos desinfetantes e produtos de limpeza selecionados, durante 5 min, demonstraram uma menor eficácia. Por isso, não foram testados em todos os isolados, e foram seleccionados os primeiros quatro para os testes seguintes.

**Tabela 4-** Aplicação de diferentes desinfetantes em quatro dos isolados em estudo (24 e 48 h). Os valores apresentados resultam de ensaios efetuados em triplicado.

Isolado <sup>a</sup>	F. de biofilme <sup>b</sup> (24 h)	DP <sup>c</sup>	Glutaraldeído 25 %	DP	Hipoclorito 1:10	DP	Triton 5%	DP
S. NTCC 12023	1,605	0,169	0,708	0,166	0,677	0,023	0,658	0,031
S. 25	0,618	0,139	0,452	0,096	0,501	0,059	0,344	0,070
S. 29	0,794	0,130	0,354	0,179	0,347	0,007	0,414	0,095
S. 44	0,453	0,125	0,338	0,200	0,229	0,052	0,383	0,021
Isolado	F. de biofilme (48 h)	DP	Glutaraldeído 25 %	DP	Hipoclorito 1:10	DP	Triton 5%	DP
S. NTCC 12023	1,033	0,185	0,623	0,247	0,303	0,152	0,533	0,071
S. 25	0,483	0,123	0,462	0,066	0,105	0,014	0,407	0,127
S. 29	0,560	0,123	0,355	0,087	0,220	0,089	0,248	0,092
S. 44	0,400	0,115	0,388	0,045	0,194	0,027	0,347	0,027

<sup>a</sup>-S.NTCC 12023- S. Typhimurium NTCC 12023; S.25- S. Typhimurium 25; S. 29- S. Infantis 29; S. 44- S. Enteritidis 44

<sup>b</sup>- Formação de biofilme

<sup>c</sup>- Desvio-padrão

### **3.2.1. Avaliação da resistência do biofilme de diferentes serotipos aos desinfetantes e produtos de limpeza com tempo de contacto de 5 min**

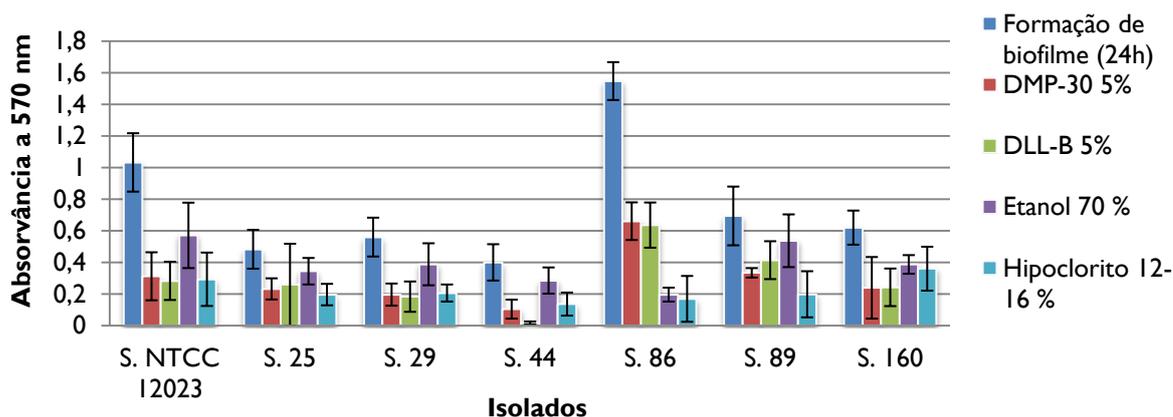
De modo a avaliar a resistência dos biofilmes aos desinfetantes em estudo, hipoclorito 12-16 %, etanol 70 %, DLL-B e DMP-30 foram aplicados durante 5 min e, noutro ensaios, durante 30 min (resultados apresentados em secções seguintes).

No que respeita à aplicação durante 5 min em biofilmes de 24 h de isolados de serotipos diferentes, cujos resultados são apresentados na figura 5, pode verificar-se que o desinfetante mais eficaz é o hipoclorito 12 a 16 %, excepto no caso da S. Agona 86 em que o desinfetante mais eficaz é o etanol 70 %. O desinfetante que apresentou menor eficácia foi o etanol 70 % excepto nos casos da S. Enteritidis 44 e da S. Virchow 89 em que o produto menos eficaz foi o DLL-B 5 % e da S. Agona 86 em que o menos eficaz foi o hipoclorito 12 - 16 %.

Uma vez que a *S. Derby* 159 não apresentou formação de biofilme após 24 h, não foi testada neste ensaio, assim como no ensaio após 48 h uma vez que não haveria termo de comparação.

**Figura 5-**Aplicação de desinfetantes e produtos de limpeza durante 5 min em biofilmes de serotipos diferentes de *S. enterica*. Os valores apresentados resultam de ensaios efetuados em triplicado.

### Aplicação de desinfetantes e produtos de limpeza durante 5 min a biofilmes de 24 h de serotipos diferentes



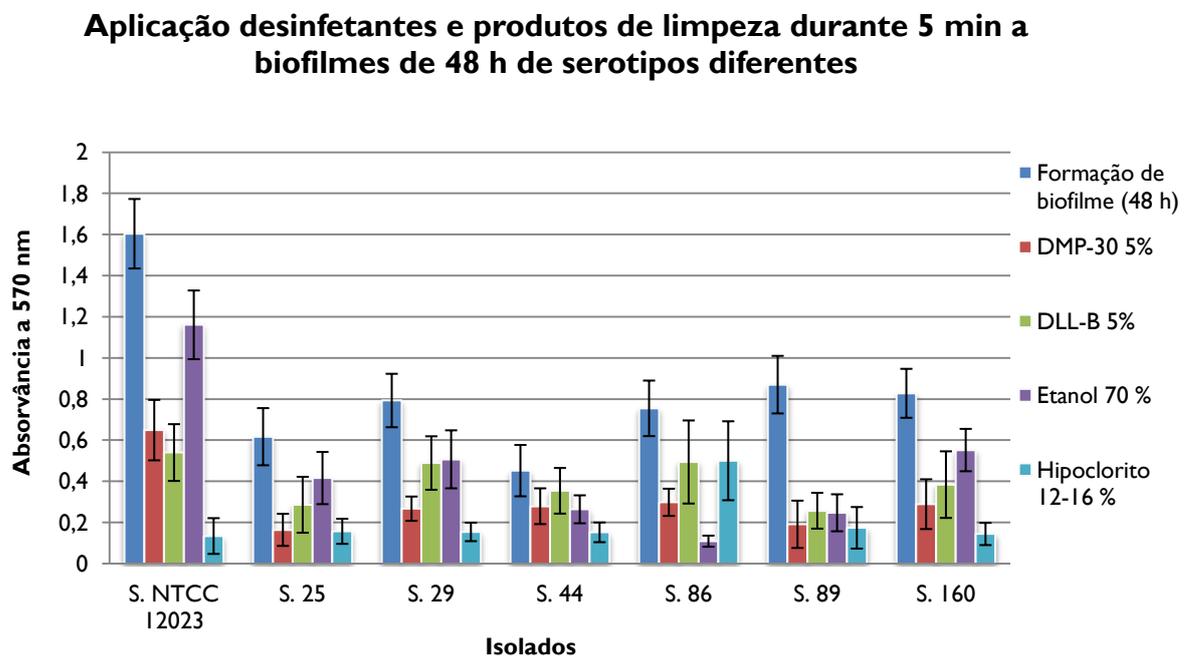
S. NTCC 12023- *S. Typhimurium* NTCC 12023  
 S. 25- *S. Typhimurium* 25  
 S. 29- *S. Infantis* 29  
 S. 44- *S. Enteritidis* 44

S. 86- *S. Agona* 86  
 S. 89- *S. Virchow* 89  
 S. 159- *S. Derby* 159  
 S. 160- *S. Havana* 160

Na aplicação de desinfetantes após 48 h de incubação (Figura 6) pode-se verificar que, o etanol 70 % continua a ser o desinfetante menos eficaz, excepto no caso da *S. Virchow* 89 em que o produto menos eficaz é o DMP-30 5%.

Quanto à maior eficácia, não há nenhum desinfetante que se destaque uma vez que para três serótipos *S. Typhimurium* 25, *S. Agona* 86 e *S. Virchow* 89 o desinfetante mais eficaz é o hipoclorito 12-16 %. Para outros isolados três *S. Typhimurium* NTCC 12023, *S. Infantis* 29 e *S. Enteritidis* 44 o produto mais eficaz é o DLL-B 5 % e para um dos serótipos *S. Havana* 160 o desinfetante mais eficaz é o DMP-30 5%.

**Figura 6-** Aplicação de desinfetantes e produtos de limpeza durante 5 min a biofilmes de 48 h de serotipos diferentes de *S. enterica*. Os valores apresentados resultam de ensaios efetuados em triplicado.



S. NTCC 12023- *S. Typhimurium* NTCC 12023

S. 25- *S. Typhimurium* 25

S. 29- *S. Infantis* 29

S. 44- *S. Enteritidis* 44

S. 86- *S. Agona* 86

S. 89- *S. Virchow* 89

S. 159- *S. Derby* 159

S. 160- *S. Havana* 160

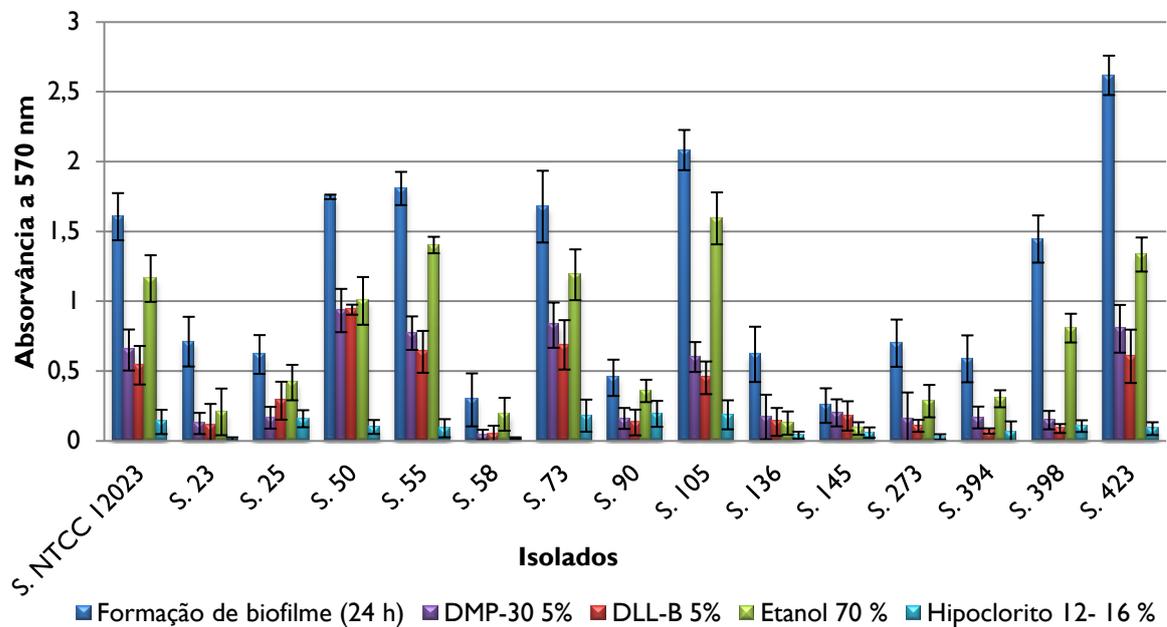
### 3.2.2. Avaliação da resistência do biofilme de diferentes isolados de *S. Typhimurium* aos desinfetantes e produtos de limpeza com tempo de contacto de 5 min

Relativamente à aplicação de desinfetantes aos isolados de *S. Typhimurium* após 24h de incubação é possível verificar, após análise dos dados dos gráficos da figura 7 que o hipoclorito 12-16 % continua a ser o desinfetante com maior eficácia exceto no caso dos isolados 90 e 398 em que o produto mais eficaz é o DLL-B 5%.

O desinfetante que apresenta menor eficácia é também o etanol 70 % exceto no caso dos isolados 136 e 145 nos quais o desinfetante menos eficaz é o DMP-30 5%.

**Figura 7-** Aplicação de desinfetantes e produtos de limpeza durante 5 min a biofilmes de 24 h do serotipo Typhimurium. Os valores apresentados resultam de ensaios efetuados em triplicado.

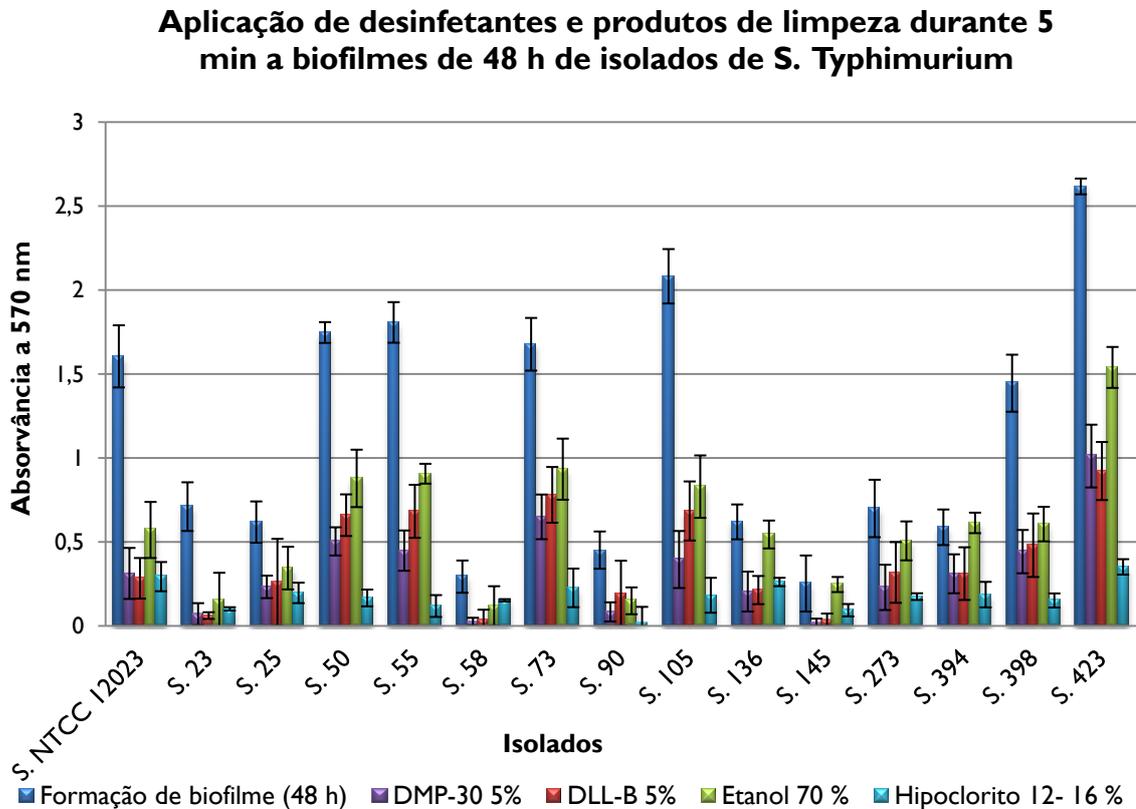
**Aplicação de desinfetantes e produtos de limpeza durante 5 min a biofilmes de 24 h de isolados de *S. Typhimurium***



Na avaliação da resistência dos mesmos isolados após 48h de incubação (ver Figura 8) o desinfetante mais eficaz é novamente o hipoclorito 12-16 % exceto no caso dos isolados 58, 136 e 145 em que o desinfetante mais eficaz é o DMP-30 5 % e do isolado NTCC 12023 em que o produto mais eficaz é o DLL-B 5%.

O desinfetante menos eficaz é mais uma vez o etanol, 70 % exceto no caso dos isolados 58 e 90 em que os desinfetantes menos eficazes são o hipoclorito 12-16 % e o DLL-B 5%.

**Figura 8** - Aplicação de desinfetantes durante 5 min a biofilmes de 48 h do serotipo Typhimurium. Os valores apresentados resultam de ensaios efetuados em triplicado.



### 3.3. Avaliação da resistência do biofilme aos desinfetantes e produtos de limpeza com tempo de contacto de 30 min

Uma vez que, com a aplicação dos desinfetantes durante 5 minutos, não foi possível remover todo o biofilme foram testados tempos de contacto superiores (20, 24, 30 e 35 min) para tentar remover todo o biofilme.

Os resultados obtidos, apresentados na Tabela 5, permitiram determinar o melhor tempo de contacto para remoção do biofilme, que foi estabelecido como 30 min uma vez que aos 35 min, em alguns isolados o valor de absorvância obtido era inferior ao valor do branco.

Neste ensaio não foram testados todos os isolados, foram selecionados isolados com diferentes capacidades de formação de biofilme.

**Tabela 5-** Aplicação de desinfetantes durante diferentes tempos. Os valores apresentados resultam de ensaios efetuados em triplicado

Isolado <sup>a</sup>	F. de biofilme <sup>b</sup> (24 h)	DP <sup>c</sup>	Etanol 70 %	DP	Hipoclorito 12- 16 %	DP	DLL-B 5%	DP	DMP- 30 5%	DP	Obs. <sup>d</sup>
<b>S. NTCC 12023</b>	0,760	0,078	0,928	0,348	0,669	0,078	0,328	0,366	0,107	0,124	20 min
<b>S. 25</b>	0,638	0,011	0,922	0,026	1,028	0,011	0,508	0,023	0,263	0,059	
<b>S. 145</b>	0,362	0,322	0,346	0,017	0,295	0,039	0,171	0,167	0,208	0,043	
<b>S.273</b>	0,535	0,105	0,751	0,245	0,621	0,011	0,366	0,332	0,253	0,110	
<b>S. NTCC 12023</b>	0,760	0,078	0,346	0,216	0,262	0,189	0,346	0,114	0,073	0,072	25 min
<b>S. 25</b>	0,638	0,011	0,445	0,200	0,321	0,424	0,445	0,048	0,221	0,066	
<b>S. 145</b>	0,362	0,322	0,087	0,057	0,130	0,052	0,087	0,052	0,163	0,059	
<b>S.273</b>	0,535	0,105	0,153	0,129	0,038	0,013	0,153	0,047	0,316	0,134	
<b>S. NTCC 12023</b>	0,760	0,078	0,660	0,345	0,383	0,132	0,203	0,155	0,126	0,076	30 min
<b>S. 25</b>	0,638	0,011	0,869	0,359	0,065	0,031	0,424	0,011	0,181	0,045	
<b>S. 145</b>	0,362	0,322	0,672	0,336	0,275	0,199	0,203	0,197	0,209	0,104	
<b>S.273</b>	0,535	0,105	0,774	0,326	0,057	0,066	0,181	0,129	0,232	0,110	
<b>S. NTCC 12023</b>	0,760	0,078	0,763	0,113	0,016	0,057	0,000	0,000	0,000	0,001	35 min
<b>S. 25</b>	0,638	0,011	0,768	0,228	0,018	0,064	0,000	0,001	0,000	0,001	
<b>S. 145</b>	0,362	0,322	0,517	0,098	0,379	0,062	0,000	0,002	0,000	0,000	
<b>S. 273</b>	0,535	0,105	0,704	0,423	0,095	0,087	0,000	0,004	0,000	0,001	

<sup>a</sup>- S. NTCC 12023- S. Typhimurium NTCC 12023; S. 25- S. Typhimurium 25; S.145- S. Typhimurium 145;

S. 273- S. Typhimurium 273

<sup>b</sup>- Formação de biofilme

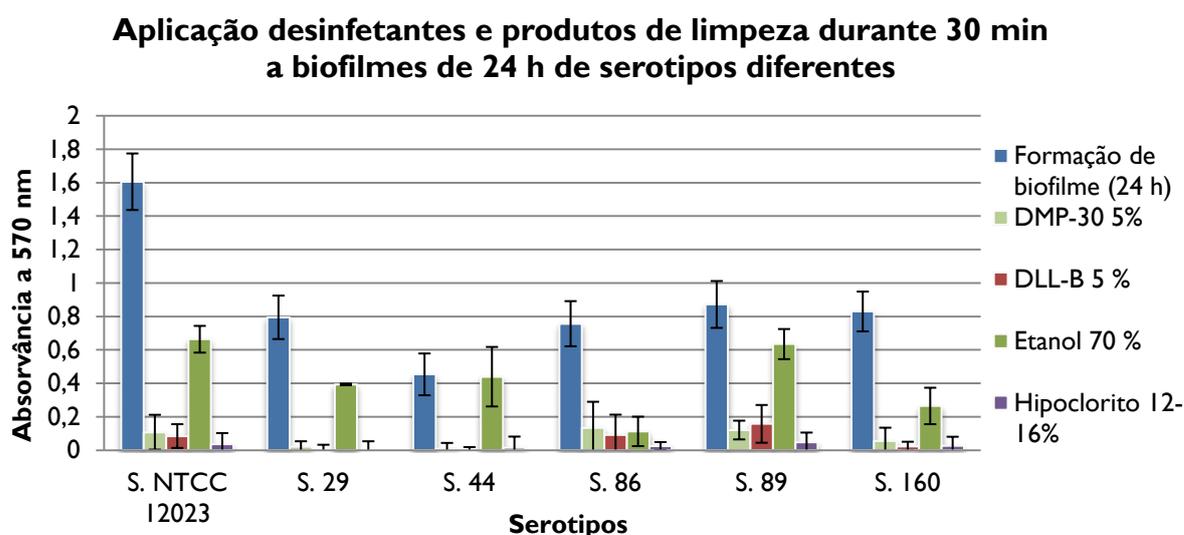
<sup>c</sup>- Desvio- Padrão

<sup>d</sup>- Observações

### 3.3.1. Avaliação da resistência do biofilme de diferentes serotipos aos desinfetantes e produtos de limpeza com tempo de contacto de 30 min

Na aplicação dos desinfetantes durante 30 min em biofilmes de 24 h (Figura 9) pode-se verificar que o hipoclorito 12-16 % continua a ser o mais eficaz mas apenas em quatro serotipos: *S. Typhimurium* NTCC 12023, *S. Infantis* 29, *S. Agona* 86 e *S. Virchow* 89, nos outros três serotipos testados, o produto mais eficaz é o DLL-B 5 %. Além disso pode observar-se a remoção total do biofilme por acção do hipoclorito 12-16 % e do DLL-B 5 % no *S. Infantis* 29 e também no *S. Enteritidis* 44 por ação do DLL-B 5 %. O desinfetante menos eficaz continua a ser o etanol 70 % exceto no caso da *S. agona* 86 em que o produto menos eficaz é o DMP-30 5%.

**Figura 9-** Aplicação de desinfetantes durante 30 min a biofilmes de 24 h de diferentes serotipos. Os valores apresentados resultam de ensaios efetuados em triplicado.



S. NTCC 12023- *S. Typhimurium* NTCC 12023

S. 86- *S. Agona* 86

S. 29- *S. Infantis* 29

S. 89- *S. Virchow* 89

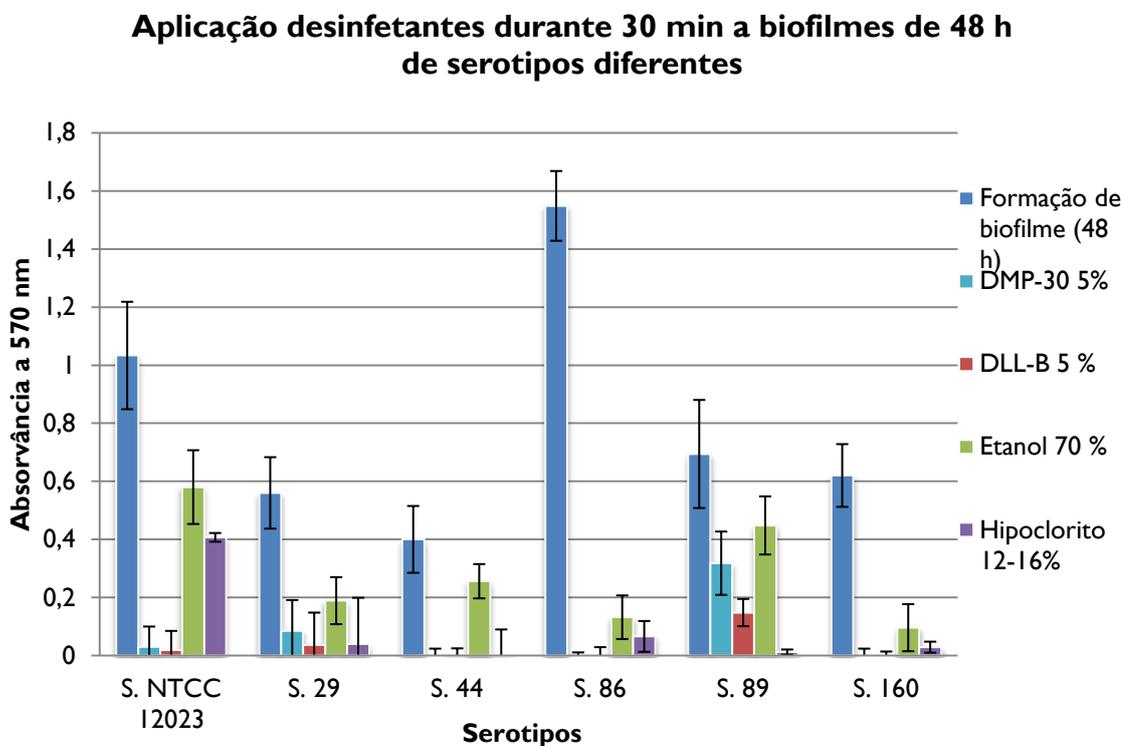
S. 44- *S. Enteritidis* 44

S. 160- *S. Havana* 160

Já na aplicação de desinfetantes a biofilmes com 48 h de idade (Figura 10), o etanol 70 % é novamente o desinfetante que apresenta menor eficácia. Contudo, o produto que apresenta maior eficácia é o DLL-B 5 % exceto na *S. Virchow* 89 em que o mais eficaz é o hipoclorito 12-16 %, e na *S. Enteritidis* 44 em que o mais eficaz é o DMP-30 5 %, onde todo

o biofilme foi removido. É possível observar também a remoção total do biofilme na *S. Agona 86* e *S. Havana 160* por ação do DMP-30 5 % e do DLL-B 5 %.

**Figura 10-** Aplicação de desinfetantes durante 30 min a biofilmes de 48 h de diferentes serotipos de *S. enterica*. Os valores apresentados resultam de ensaios efetuados em triplicado.



S.NTCC 12023- *S. Typhimurium* NTCC 12023

S. 86- *S. Agona* 86

S. 29- *S. Infantis* 29

S. 89- *S. Virchow* 89

S. 44- *S. Enteritidis* 44

S. 160- *S. Havana* 160

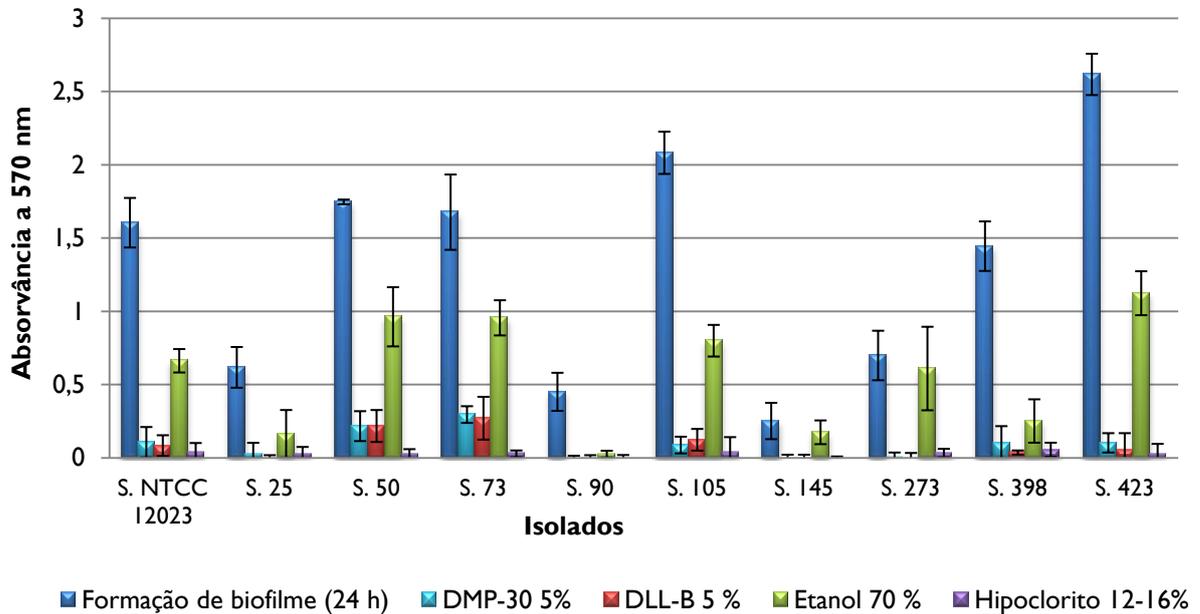
### 3.3.2. Avaliação da resistência do biofilme de diferentes isolados de *S. Typhimurium* aos desinfetantes e produtos de limpeza com tempo de contacto de 30 min

Após a análise dos resultados obtidos em biofilmes com a idade de 24 h (ver Figura 11) pode verificar-se que o hipoclorito 12-16 % é novamente o desinfetante mais eficaz exceto no caso dos isolados 25 e 398 em que este lugar é tomado pelo DLL-B 5 % e no isolado 273 pra o qual o DMP-30 5 % é o produto mais eficaz. Pode também observar-se a remoção completa do biofilme nos isolados 90 e 145 através da ação de todos os desinfetantes exceto o etanol 70 % que mais uma vez é o desinfetante menos eficaz.

**Figura 11-** Aplicação de desinfetantes durante 30 min a biofilmes de 24 h do serotipo Typhimurium.

Os valores apresentados resultam de ensaios efetuados em triplicado.

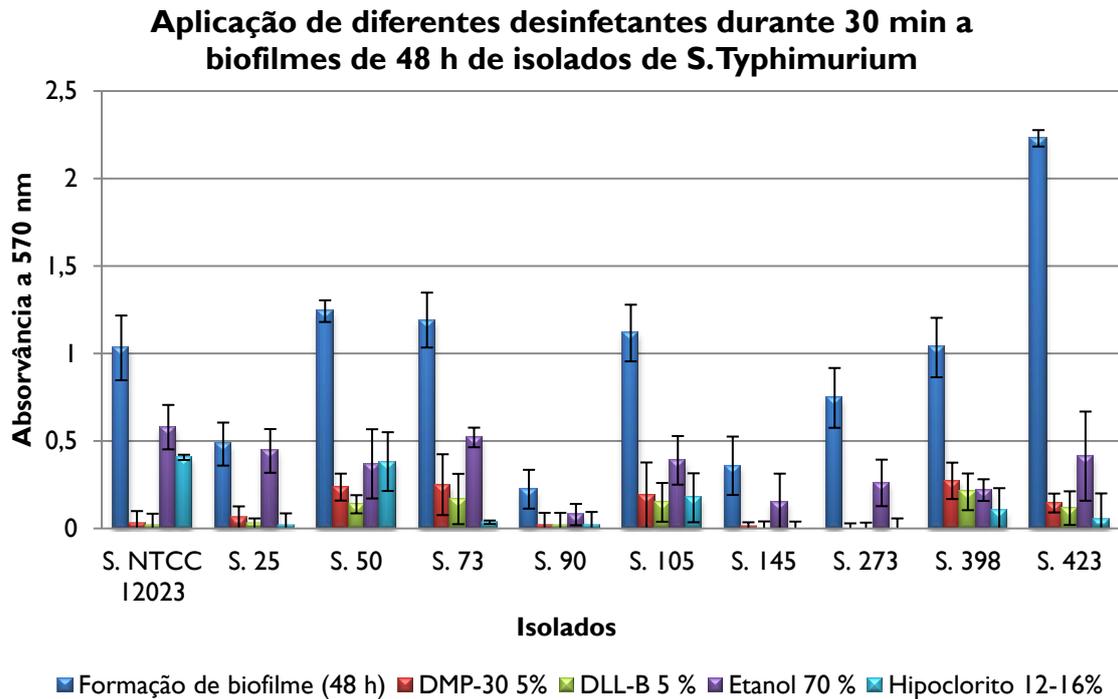
**Aplicação de diferentes desinfetantes durante 30 min a biofilmes de 24 h de isolados de S. Typhimurium**



Relativamente à ação dos desinfetantes em estudo em biofilmes com a idade de 48 h (ver figura 12) é possível verificar que o etanol 70 % é novamente o desinfetante menos eficaz, exceto no caso do isolado 50 em que o desinfetante menos eficaz é o hipoclorito 12-16 %. No que toca ao desinfetante com maior eficácia, o hipoclorito 12-16 % é novamente o mais eficaz mas para apenas seis isolados: 25, 73, 145, 273, 398, e 423. Nos restantes isolados o DLL-B 5 % é produto mais eficaz. No isolado 273 o DLL-B 5 % e o DMP-30 5% e o hipoclorito 12-16 % conseguem remover a totalidade do biofilme e no 145, ocorre a remoção total do biofilme por ação do hipoclorito 12-16 %.

**Figura 12-** Aplicação de desinfetantes durante 30 min a biofilmes de 48 h do serotipo Typhimurium.

Os valores apresentados resultam de ensaios efetuados em triplicado.



### 3.4. Avaliação da suscetibilidade dos isolados em estudo aos desinfetantes baseada no método de Kirby- Bauer

Após o registo dos resultados obtidos, apresentados na tabela 6, pode verificar-se que, nas concentrações utilizadas, indicadas na tabela, o produto com maior capacidade de inibição do crescimento bacteriano é o DLL-B na concentração de 20 %. Em sentido inverso o que apresenta menor capacidade de inibição do crescimento bacteriano é o Triton-X 100 diluído a 5 %, pois não inibe o crescimento bacteriano.

Entre os produtos e desinfetantes utilizados na avaliação da resistência do biofilme e na concentração em que foram utilizados, o DLL-B 5 % apresenta maior capacidade de inibição do crescimento bacteriano e o etanol 70 % apresenta menor capacidade de inibição exceto para o isolado S. Virchow 89, para o qual o hipoclorito 12-16 % apresenta menor capacidade de inibição.

**Tabela 6-** Avaliação da suscetibilidade dos isolados pelo método de Kirby-Bauer.

Isolado Desinfetante	S.NTCC 12023	S.25	S. 29	S.44	S. 86	S. 89	S. 159	S. 160
<b>DMP-30 1 %</b>	21 <sup>a</sup>	14	18	16	26	24	17	18
<b>DMP-30 2,5 %</b>	23	17	20	18	25	27	18	18
<b>DMP-30 5 %</b>	25	20	22	20	28	32	20	20
<b>DMP-30 10 %</b>	26	21	24	22	28	34	23	20
<b>DMP-30 20 %</b>	28	22	26	24	30	36	23	22
<b>DLL-B 1 %</b>	16	15	19	16	21	21	16	17
<b>DLL-B 2,5 %</b>	20	19	25	18	28	28	20	22
<b>DLL-B 5 %</b>	25	24	27	25	34	38	22	26
<b>DLL-B 10 %</b>	24	25	28	26	40	38	24	28
<b>DLL-B 20 %</b>	25	28	32	27	36	38	25	29
<b>Hipoclorito 12-16 %</b>	8	9	9	9	8	8	9	9
<b>Glutaraldeído 25 %</b>	14	14	13	12	13	13	13	10
<b>Etanol 70 %</b>	8	9	8	8	7	10	8	11
<b>Triton-X 100 5 %</b>	- <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	-	-

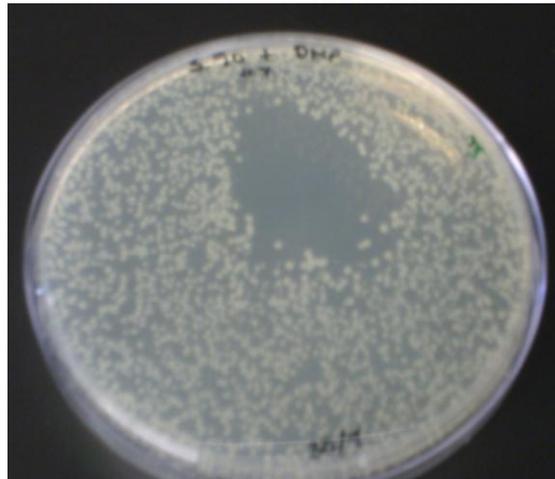
<sup>a</sup>- medição do halo de inibição em mm

<sup>b</sup>- não apresentou halo de inibição

### **3.5. Avaliação da ação dos desinfetantes nas células planctónicas**

Quanto aos resultados da aplicação dos desinfetantes e produtos de limpeza às células planctónicas, apresentados na tabela 7, pode-se observar que tanto o hipoclorito 12-16 % como o etanol 70 %, matam todas as células em suspensão. Já o DLL-B 5 % e o DMP-30 5 % não conseguiram eliminar todas células em suspensão, apenas reduzir um pouco o seu número, mesmo após algumas diluições da suspensão inicial ( $10^{-2}$  a  $10^{-4}$ ). No entanto foi possível observar uma espécie de halo no local onde a suspensão contendo estes desinfetantes tinha sido colocada na placa (ver figura 3).

**Figura 13-** Aplicação de DMP-30 5% às células planctónicas.



**Tabela 7-** Aplicação dos vários desinfetantes nas células planctónicas.

Isolados	Controlo (UFC/mL)	Hipoclorito (UFC/mL)	Etanol 70 % (UFC/mL)	DLL-B 5% (UFC/mL)	DMP- 30 5 % (UFC/mL)
<b>S. Typhimurium NTCC 12023</b>	$8,90 \times 10^{+14}$	>1	>1	>300	>300
<b>S. Typhimurium 23</b>	$4,17 \times 10^{+12}$	>1	>1	>300	>300
<b>S. Typhimurium 25</b>	$6,15 \times 10^{+14}$	>1	>1	>300	>300
<b>S. Infantis 29</b>	$5,50 \times 10^{+14}$	>1	>1	>300	>300
<b>S. Enteritidis 44</b>	$5,00 \times 10^{+13}$	>1	>1	>300	>300
<b>S. Typhimurium 50</b>	$1,22 \times 10^{+14}$	>1	>1	>300	>300
<b>S. Typhimurium 55</b>	$4,27 \times 10^{+14}$	>1	>1	>300	>300
<b>S. Typhimurium 58</b>	$1,00 \times 10^{+12}$	>1	>1	>300	>300
<b>S. Typhimurium 73</b>	$2,80 \times 10^{+14}$	>1	>1	>300	>300
<b>S. Agona 86</b>	$1,95 \times 10^{+13}$	>1	>1	>300	>300
<b>S. Virchow 89</b>	$1,12 \times 10^{+13}$	>1	>1	>300	>300
<b>S. Typhimurium 90</b>	$9,00 \times 10^{+14}$	>1	>1	>300	>300
<b>S. Typhimurium 105</b>	$2,32 \times 10^{+14}$	>1	>1	>300	>300
<b>S. Typhimurium 136</b>	$1,90 \times 10^{+11}$	>1	>1	>300	>300
<b>S. Typhimurium 145</b>	$2,14 \times 10^{+12}$	>1	>1	>300	>300
<b>S. Derby 159</b>	$4,03 \times 10^{+13}$	>1	>1	>300	>300
<b>S. Havana 160</b>	$1,50 \times 10^{+12}$	>1	>1	>300	>300
<b>S. Typhimurium 273</b>	$2,36 \times 10^{+12}$	>1	>1	>300	>300
<b>S. Typhimurium 394</b>	$1,63 \times 10^{+12}$	>1	>1	>300	>300
<b>S. Typhimurium 398</b>	$7,20 \times 10^{+14}$	>1	>1	>300	>300
<b>S. Typhimurium 423</b>	$1,64 \times 10^{+12}$	>1	>1	>300	>300

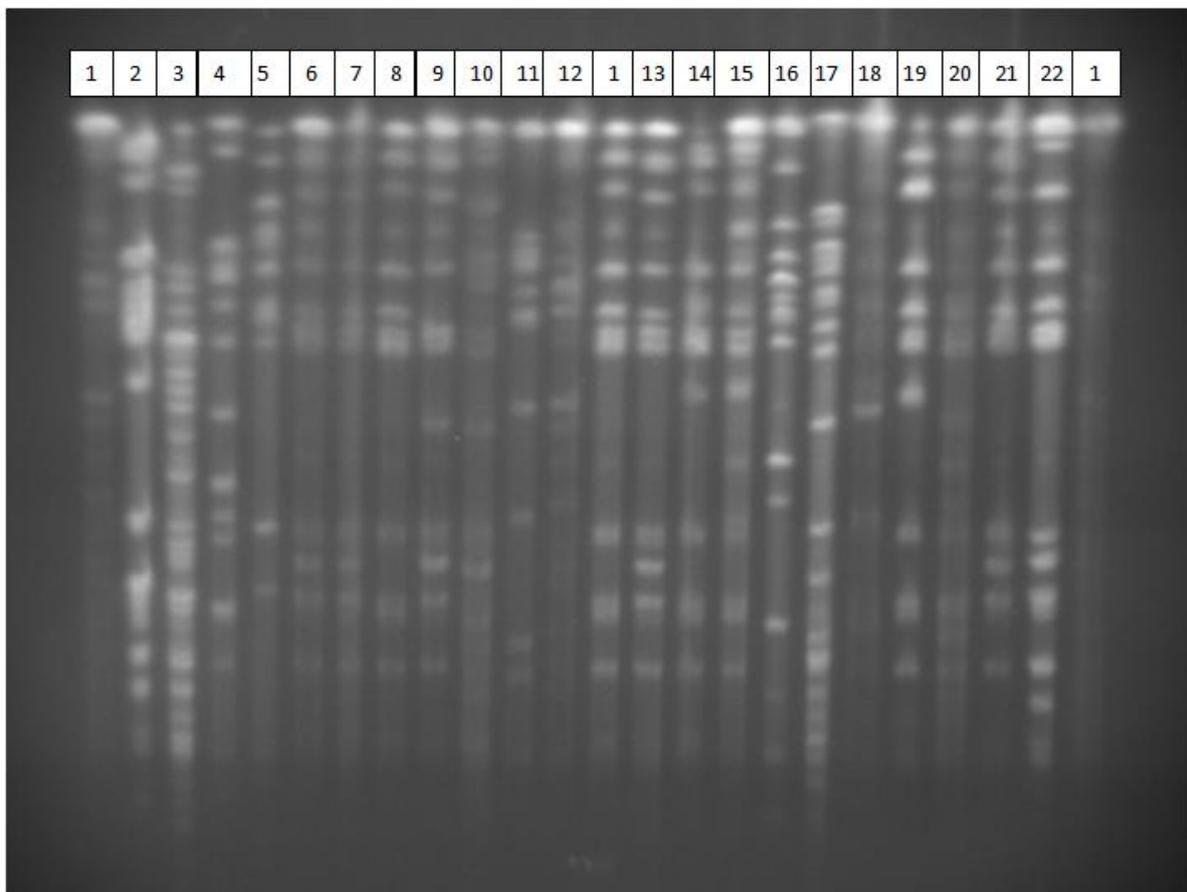
### 3.6. Electroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

A electroforese de campo pulsado permite, através da observação das bandas no gel, avaliar a relação genética dos isolados em estudo. Neste caso, foi feita com o objetivo de avaliar se estirpes geneticamente relacionadas apresentam o mesmo comportamento relativamente à formação de biofilme. E se a aplicação de desinfetantes e produtos de limpeza tem o mesmo efeito em estirpes geneticamente relacionadas.

Assim, por observação do gel obtido, apresentado na figura 4, pode-se verificar que os isolados *S. Typhimurium* 50, *S. Typhimurium* 55 e *S. Typhimurium* 423 (posições 6, 7 e 21, respetivamente) não apresentam qualquer diferença quer no número de bandas, quer na sua posição. Por isso, segundo a classificação descrita por Tenover *et al.*, 1995 são considerados geneticamente indistinguíveis e, pois isso pode-se afirmar que representam a mesma estirpe. Ao comparar os restantes isolados com o *S. Typhimurium* 50 é possível verificar que existem dois isolados que apresentam apenas duas diferenças no número e posição de bandas são eles o *S. Typhimurium* 73 e o *S. Typhimurium* 105 (posições 9 e 13) e ainda que existem quatro isolados que apresentam apenas três diferenças, os isolados *S. Typhimurium* 90, *S. Typhimurium* 398, *S. Typhimurium* 145, e *S. Typhimurium* NTCC 12023 (nas posições 2, 20, 15 e 22). Segundo a classificação anteriormente referida, estes isolados são muito relacionados como anterior (*S. Typhimurium* 50), podendo ser considerados como subtipos deste.

Existe ainda um isolado, o *S. Typhimurium* 394 (posição 9) que, quando comparado com o *S. Typhimurium* 50, apresenta apenas 4 diferenças e, por isso é considerado possivelmente relacionado. Os restantes isolados, *S. Typhimurium* 23, *S. Typhimurium* 25, *S. Typhimurium* 273 (posições 2, 3 e 18) apresentam mais de sete diferenças relativamente ao *S. Typhimurium* 50 e por isso considera-se que não têm relação genética com este isolado.

**Figura 14-**Gel de PFGE dos isolados em estudo



Legenda:

- 1- S. Grupo B 40;
- 2- S. Typhimurium 23;
- 3- S. Typhimurium 25;
- 4- S. Infantis 29;
- 5- S. Enteritidis 44;
- 6- S. Typhimurium 50;
- 7- S. Typhimurium 55;

- 8- S. Typhimurium 58;
- 9- S. Typhimurium 73;
- 10- S. Agona 86;
- 11- S. Virchow 89;
- 12- S. Typhimurium 90;
- 13- S. Typhimurium 105;
- 14- S. Typhimurium 136;

- 15- S. Typhimurium 145;
- 16- S. Derby 159;
- 17- S. Havana 160;
- 18- S. Typhimurium 273;
- 19- S. Typhimurium 394;
- 20- S. Typhimurium 398;
- 21- S. Typhimurium 423;
- 22- S. Typhimurium NTCC 1023

# **IV. DISCUSSÃO**

## 4. Discussão

*Salmonella enterica* é um dos principais patógenos transmitido ao Homem por ingestão de produtos de origem animal contaminados. Os resíduos de produtos animais em superfícies de indústrias alimentares e locais de processamento de alimentos constituem uma base para a formação de biofilmes, estruturas que apresentam um maior resistência aos antibióticos e desinfetantes, e constituem uma fonte contínua de contaminação alimentar (Díez-García, Capita e Alonso-Calleja, 2012; Joseph, Otta e Karunasagar, 2001; Speranza, Corbo e Sinigaglia, 2011). O conhecimento sobre a capacidade de formação de biofilmes por diferentes estirpes de *S. enterica* e a sua resistência à atuação de desinfetantes é escasso.

Neste estudo avaliou-se a formação de biofilmes por diferentes serotipos de *S. enterica* e estirpes de *S. Typhimurium* em tempos diferentes, e a eficácia de alguns desinfetantes e produtos de limpeza usados na restauração em Portugal na remoção dos vários biofilmes obtidos.

Os resultados obtidos mostraram uma enorme heterogeneidade na capacidade de formação de biofilme entre os sete serotipos estudados, independente da idade do biofilme. Destacando-se como maiores formadores de biofilme os serotipos *S. Typhimurium* NTCC 12023, *S. Virchow* 89 e *S. Havana* 160 (por ordem de decrescente) e, como menor formação de biofilme, por ordem crescente, *S. Derby* 159, *S. Enteritidis* 44 e *S. Typhimurium* 25. Estes resultados não são concordantes com os obtidos por Díez-García, Capita e Alonso-Calleja (2012), em que o serotipo que apresentou maior formação de biofilme foi o *Agona*, e de seguida, embora com uma quantidade de biofilme formada muito menor, o serotipo *Typhimurium*, *Derby*, *Infantis*, *Enteritidis* e, por fim *Virchow*. No entanto, este estudo não decorreu nas mesmas condições das deste trabalho, sendo a quantidade de inóculo e a temperatura de incubação diferentes. As alterações das condições dos ensaios não permitem uma correta comparação de resultados, uma vez que estes fatores influenciam a formação de biofilmes (Agarwal *et al.*, 2011; Stepanovic *et al.*, 2003). Além disso, como se poderá observar mais à frente, aquando a análise da formação de biofilme dos isolados de *S. Typhimurium*, a formação de biofilme poderá ser diferente entre estirpes diferentes do mesmo serotipo, resultado também descrito por Agarwal *et al.* (2011). Recentemente, num estudo realizado com os serotipos *Agona*, *Typhimurium*, *Derby*, *Indiana* e *Infantis*, o serotipo que apresentou maior formação de biofilme, foi o *Agona*, mas, mais uma vez, as condições de ensaio são diferentes, nomeadamente a quantidade de inóculo e o tempo de incubação (24 e 72 h), tendo sido ainda referido que a quantidade de biofilme é influenciada pelo meio de cultura e pelo tempo de incubação (Wang *et al.*, 2013).

Na avaliação da formação de biofilme pelos diferentes serotipos após 48 h o serotipo que apresenta maior formação de biofilme é o *S. Agona*. Após este tempo de incubação, os serotipos que apresentam menor formação de biofilme são *S. Typhimurium* 25, *S. Enteritidis* 44 e *S. Derby* 159, que não diferem muito dos resultados obtidos pelos estudos anteriormente referidos. Aparentemente, o serotipo *Agona* parece formar biofilmes maiores às 48h, tal como referido num estudo que envolveu os serotipos *Agona*, *Typhimurium* e *Montevideo* (Vestby *et al.*, 2009), Mas mais uma vez e, devido à escassa literatura sobre este tema, não foi realizado nas mesmas condições, variando o meio de cultura, o tempo de incubação e a quantidade de inoculo. Um outro estudo, realizado em condições diferentes das deste trabalho (variação na temperatura e quantidade de inóculo, entre outros), indica que após 48 h de incubação, o serotipo que de entre os serotipos estudados, apresenta maior formação de biofilme é o *Newport*, seguido do *Agona* e o *Enteritidis*, e o que apresenta menor formação de biofilme é o *Derby* (Valeriano *et al.* 2012).

O serótipo *Typhimurium* é um dos serótipos mais comuns envolvido em infecção humana. Inicialmente, verificou-se uma diferente capacidade de formação de biofilme entre duas estirpes testadas: a de colecção NTCC 12023 e o isolado 25. Colocou-se a hipótese da formação de biofilme ser diferente para estirpes de um dado serotipo. A relação genética entre isolados de *S. Typhimurium* de diferentes amostras biológicas e origem geográfica foi avaliada por PFGE.

Relativamente aos isolados de *S. Typhimurium* considerados geneticamente indistinguíveis (isolados 50, 55 e 423), pode-se verificar que, embora pertençam à mesma estirpe, têm origem em locais diferentes, os dois primeiros em matadouros de diferentes localizações e o último, já na cadeia de distribuição, o que mostra a disseminação de uma estirpe em Portugal. Quanto à formação de biofilme às 24 h é possível verificar que, embora os isolados 50 e 55 apresentem uma capacidade de formação de biofilme idêntica, o 423 apresenta uma capacidade de formação de biofilme muito superior à dos anteriores. Após 48 h apresenta um comportamento idêntico, inclusivamente na diminuição da quantidade de biofilme formado. No entanto, o decréscimo na quantidade de biofilme não é tão grande como o dos outros isolados.

Quanto à formação de biofilme pelos isolados considerados geneticamente muito relacionados com a estirpe de *S. Typhimurium* 50, é possível verificar que o NTCC 12023 e o 73 apresentam uma capacidade de formação de biofilme idêntica. E, às 48 h de incubação é possível observar novamente a diminuição da quantidade de biofilme formado, principalmente no isolado NTCC 12023. O isolado 398, após 24 h de incubação, apresenta uma quantidade de biofilme ligeiramente inferior à do isolado 50, diminuindo essa diferença

após 48 h de incubação, tempo após o qual os dois isolados apresentam menor quantidade de biofilme formado. O isolado 105 apresenta um ligeiro aumento na capacidade de formação de biofilme em relação ao 50 após 24 h de incubação. No entanto, após 48 h de incubação, é o 50 que apresenta maior quantidade de biofilme formado. Por fim, os isolados 90 e 145, após 24 h de incubação, apresentam muito menor capacidade para formar biofilme. Após 48 h de incubação, apresentam novamente muito menor capacidade de formação de biofilme e o isolado 145, ao contrário do 50 e do 90, apresenta um aumento do biofilme formado em comparação com a leitura anterior. Os restantes isolados muito relacionados geneticamente 105, 90, 398 e 145, não apresentam semelhanças com o 50 relativamente à formação de biofilme.

A variabilidade na capacidade de formação de biofilme entre os diferentes isolados de *S. Typhimurium* foi também descrita em outros estudos, como por exemplo, o descrito por Lianou e Koutsoumanis (2012) no qual foram avaliados 60 isolados de *S. enterica*, entre os quais 18 de *S. Typhimurium*. Também não foi possível observar nenhuma relação específica entre o serotipo e a capacidade de formação de biofilme, dada a sua grande variedade entre isolados do mesmo serotipo, suportando os resultados obtidos no presente trabalho. Apesar dos resultados idênticos, deve referir-se que os ensaios não decorreram nas mesmas condições de temperatura, quantidade de inóculo, tempo de incubação e incubação sem agitação. Noutro estudo também recente, e, novamente, devido à escassa literatura sobre este tema, efetuado em diferentes condições (meio de cultura, tempo de incubação e quantidade de inóculo), foram descritos resultados variados em diferentes estirpes do mesmo serotipo (Agarwal et al., 2011).

Quanto à aplicação de desinfetantes e produtos de limpeza de superfícies durante 5 min em biofilmes de 24 h de isolados de serotipos diferentes pode-se verificar que o desinfetante mais eficaz é o hipoclorito 12 - 16 %, e o menos eficaz é o etanol 70 %, com raras exceções. Já na aplicação após 48 h de incubação é possível verificar que, o etanol 70 % é novamente o desinfetante menos eficaz, exceto no caso da *S. virchow* 89 em que a menor eficácia é observada no produto de limpeza DMP-30 a 5%.

Quanto à maior eficácia, não há nenhum desinfetante ou produto de limpeza que se destaque uma vez que para três serótipos (*S. Typhimurium* 25, *S. Agona* 86 e *S. Virchow* 89) o desinfetante mais eficaz é o hipoclorito 12-16 %, para outros três isolados (*S. Typhimurium* NTCC 12023, *S. Typhimurium* 29 e *S. Enteritidis* 44) é o produto de limpeza DLL-B 5 %, e para um dos serótipos (*S. Havana* 160) o mais eficaz é o DMP-30 a 5%.

Na aplicação de desinfetantes e produtos de limpeza durante 30 min em biofilmes de 24 h pode-se verificar que o hipoclorito continua a ser o mais eficaz na maioria dos

serotipos, sendo possível a remoção total do biofilme por ação do hipoclorito e do DLL-B 5 % na *S. Infantis* 29, e também na *S. Enteritidis* 44 por ação do DLL-B 5 %. O desinfetante menos eficaz, para a maioria dos serotipos é o etanol 70%. Na aplicação de desinfetantes e produtos de limpeza durante 30 min a biofilmes com 48 h de idade, o etanol 70% é novamente o desinfetante que apresenta menor eficácia. Contudo, neste caso o produto que apresenta maior eficácia, na maioria dos casos, é o DLL-B 5 %. No *S. Enteritidis* 44 o produto mais eficaz é o DMP-30 5 %, que é capaz de remover todo o biofilme.

Relativamente aos produtos de limpeza DLL-B 5 % e DMP-30 5 %, não é possível comparar os resultados obtidos com outros, uma vez que são produtos com uma composição específica. Já em relação ao hipoclorito 12-16 % e ao etanol 70 %, os resultados encontrados na literatura são provenientes de estudos que não utilizam a mesma metodologia. Além disso, avaliam a redução do número de UFC devido à ação dos desinfetantes, enquanto neste trabalho, é avaliada a remoção do biofilme formado por ação dos desinfetantes e produtos de limpeza por espectrofotometria.

Assim, um desinfetante constituído por etanol 70 % foi descrito como sendo o mais eficaz na redução do número de UFC, e este juntamente com um outro contendo hipoclorito 4,4 % (um valor muito menor que o utilizado neste trabalho) foram considerados os mais eficazes no serótipo *Agona* do que no *Typhimurium* (Møretro *et al.*, 2009). Neste trabalho esta maior eficácia no serótipo *Agona* em relação ao *Typhimurium*, é apenas observada na aplicação de etanol 70 % durante 5 min ao biofilme de 24 h, na aplicação DMP 5 % e DLL-B 5 % às 48 h, e na aplicação de etanol 70 %, DLL-B 5 % e DMP-30 5 % durante 30 min a biofilmes de 48 h.

Quanto à aplicação dos desinfetantes e produtos de limpeza durante 5 e 30 min a isolados de *S. Typhimurium* geneticamente indistinguíveis, (os isolados 50, 55 e 423) quer às 24, quer às 48h, o único comportamento idêntico que se encontra é nos isolados 50 e 55, na aplicação durante 5 min às 48 h. Já na aplicação aos isolados muito relacionados geneticamente com o isolado 50, os isolados NTCC 12023, 73, 90, 105, 105 e 145, é apenas possível observar um comportamento semelhante entre os isolados 73 e NTCC 12023 e o 50. Em relação ao isolado 394, considerado possivelmente relacionado com o 50, não é possível verificar qualquer comportamento idêntico na aplicação dos desinfetantes quer às 24, quer às 48 h. Na maioria dos casos o desinfetante menos eficaz é o etanol 70 % e o mais eficaz é o hipoclorito 12-16 %.

Estudos prévios descreveram o hipoclorito como um desinfetante eficaz na remoção de biofilmes de *S. Enteritidis* (Rodrigues *et al.*, 2011), e em biofilmes com três e quatro dias de idade de diferentes isolados de *S. enterica* *Typhimurium*, Thompson, Berta, Hadar, e

Johannesburg (Ramesh, Joseph e Carr, 2002). Estes resultados são semelhantes aos obtidos neste estudo, embora as condições de ensaio tenham variado. De referir que um dos estudos (Ramesh, Joseph e Carr, 2002) foi realizado em pequenas peças de aço incubadas a 37 °C em TSB. No entanto, mesmo em condições diferentes, o hipoclorito, parece ser o mais eficaz. A grande eficácia de compostos contendo cloro foi já demonstrada na remoção de biofilmes formados na superfície de pequenas peças de aço e avaliando a redução de UFC (Nguyen e Yuk, 2013).

A pouca eficácia do etanol a 70% quando aplicado em biofilmes, foi também descrita por um outro estudo realizado, embora realizado em condições diferentes, nomeadamente os meios de cultura, o tempo, a temperatura de incubação e a formação de biofilme ocorreu num *peg* presente na tampa da microplaca denominada *Calgary device* (Wong *et al.*, 2010).

É também possível observar que um maior tempo de exposição é mais eficaz para remover o biofilme. Este resultado também foi obtido por Wong *et al.* (2010) em que um maior tempo de aplicação foi mais eficaz para evitar o crescimento bacteriano após a ação do desinfetante. Embora a metodologia seja diferente, uma maior quantidade de biofilme removida, possivelmente, irá impossibilitar ou diminuir o posterior crescimento bacteriano.

É ainda possível observar tanto para os diferentes serotipos como para os isolados de *S. Typhimurium*, que a quantidade de biofilme removida às 48 h quer na aplicação de desinfetantes e produtos de limpeza durante 5 min quer durante 30 min que, na maioria dos casos a quantidade de biofilme removida é inferior à quantidade de biofilme removida às 24 h. O aumento da idade do biofilme leva ao aumento da resistência do mesmo aos desinfetantes estudados, o que foi recentemente observado (Nguyen e Yuk, 2013)

Os resultados da aplicação dos desinfetantes nas células planctónicas e pelo método de Kirby-Bauer foram discordantes, uma vez que o hipoclorito 12-16 % e o etanol 70 %, embora eliminem todas as células planctónicas, e são portanto mais eficazes que o DLL-B 5 % e o DMP-30 5%, apresentam um halo de inibição de crescimento no método de difusão em disco substancialmente menor que os produtos de limpeza referidos. O mecanismo pelo qual isto acontece não é totalmente compreendido, mas pode estar relacionado com o facto de termos células em suspensão, enquanto no método de Kirby-Bauer as células crescem à superfície da gelose. Na verdade, foi demonstrada a eliminação de *S. Weltevreden* em suspensão em PBS com  $2,4 \times 10^6$  UFC/mL depois de exposta durante 10 minutos a uma solução com 10 ppm de Cloro (Joseph, Otta e Karunasagar, 2001). Tanto a aplicação de hipoclorito (1,31 g/L de cloro disponível) às células planctónicas como de etanol 70 % durante 5 minutos elimina, todas as células em suspensão (Wong *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos neste estudo, realçam a importância do controlo da formação de biofilmes por *S. enterica*, uma vez que entre os isolados testados, apenas um não formou biofilme (às 24 h) na superfície da microplaca de plástico, que é um material muito utilizado na indústria alimentar, demonstrando a ampla capacidade dos isolados de salmonela para formar biofilme. Demonstrou-se ainda o diverso comportamento de estirpes face à aplicação dos desinfetantes. Além disso, num ambiente de processamento de alimentos, os biofilmes podem ser compostos por mais do que um microrganismo patogénico, como por exemplo *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* (Rode *et al.*, 2007), aumentando a complexidade do biofilme, e alterando a sua reação à desinfeção, colocando em causa a segurança alimentar do produto.

Demonstrando assim a importância da otimização e uniformização dos métodos de avaliação de formação de biofilme e de avaliação da eficácia de diferentes desinfetantes para e melhorar estratégias para a erradicação de biofilmes na indústria alimentar e locais de processamento de alimentos.

# **V. BIBLIOGRAFIA**

## 5. Bibliografia

AGARWAL, R. K.; SIGH, S.; BHILEGAONKAR, K. N.; SIGH, V.P. - Optimization of microtitre plate assay for the testing of biofilm formation in different *Salmonella* serotypes. *International Food Research Journal*. [Em Linha]. 18:4 (2011) 1493-1498. [Consult. 29 Nov. 2012]. Disponível na internet:<URL: <http://www.ifrj.upm.edu.my/18%20%2804%29%202011/%2840%29IFRJ-2011-283.pdf>>.

ALI, L.; KHAMBATY, F.; DIACHENKO, G. - Investigating the suitability of the Calgary Biofilm Device for assessing the antimicrobial efficacy of new agents. *Bioresource Technology*. [Em Linha.] 97(2006) 1887-1893. [Consult. 05 Nov. 2012]. Disponível na internet:<URL: <https://webvpn.uc.pt/http/0/www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852405004207>>.

ALVAREZ-ORDÓÑEZ, Avelino et al.- *Salmonella* spp. survival strategies within the host gastrointestinal tract. *Microbiology*. [Em Linha]. 157:12 (2011) 3268-3281. [Consult. 06 Jun. 2013]. Disponível na internet:<URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22016569>>.

AMAGLIANI, G.; BRANDI, G.; SCHIAVANO, G. F. - Incidence and role of *Salmonella* in seafood safety. *Food Research International*. [Em Linha]. 45:2 (2012) 780-788. [Consult. 29 Mai. 2012]. Disponível na internet:<URL: [https://webvpn.uc.pt/http/0/www.sciencedirect.com/science?\\_ob=MiamiImageURL&\\_cid=271165&\\_user=2459680&\\_pii=S0963996911004005&\\_check=y&\\_origin=article&\\_zone=toolbar&\\_coverDate=31-Mar-2012&view=c&originContentFamily=serial&wchp=dGLzVBA-zSkVWA&md5=d70de4c8c321632992cdd55f4169110c&pid=1-s2.0-S0963996911004005-main.pdf](https://webvpn.uc.pt/http/0/www.sciencedirect.com/science?_ob=MiamiImageURL&_cid=271165&_user=2459680&_pii=S0963996911004005&_check=y&_origin=article&_zone=toolbar&_coverDate=31-Mar-2012&view=c&originContentFamily=serial&wchp=dGLzVBA-zSkVWA&md5=d70de4c8c321632992cdd55f4169110c&pid=1-s2.0-S0963996911004005-main.pdf)>.ISSN 0963-9969.

ASAE - *Salmonella* [Em linha].Lisboa: ASAE, atual. 2012. [Consult. 6 Jun. 2012]. Disponível na internet: <URL: <http://www.asae.pt/?cn=541054135462AAAAAAAAAAAAA>>.

BAE, Young-Min; BAEK, Seung-Youb; LEE, Sun-Young - Resistance of pathogenic bacteria on the surface of stainless steel depending on attachment form and efficacy of chemical sanitizers. *International Journal of Food Microbiology*. [Em Linha]. 153:3 (2012) 465-473. [Consult. 25 Out. 2012]. Disponível na internet:<URL: <https://webvpn.uc.pt/http/0/www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816051100729X>> . ISSN 1879-3460.

BAYOUMI, Mohamed A. et al. - Assessment of a regulatory sanitization process in Egyptian dairy plants in regard to the adherence of some food-borne pathogens and their biofilms. *International Journal of Food Microbiology*. [Em Linha]. 158:3 (2012) 225-231. [Consult. 23 Mai. 2013]. Disponível na internet:<URL: <https://webvpn.uc.pt/http/0/www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160512004023>>. ISSN 1879-3460.

BOYLE, Erin C. et al.- *Salmonella*: from Pathogenesis to Therapeutics. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*. [Em Linha]. 189:5 (2007) 1489-1495. [Consult. 04 Mai. 2013]. Disponível na internet:<URL: <http://jb.asm.org/content/189/5/1489.short>>.

BRIDIER, A. et al. - Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*. [Em Linha]. 27:9 (2011) 1017-1032. [Consult. 21 Fev. 2012]. Disponível na internet:<URL: <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/08927014.2011.626899>>.

BURGOS, M. G. et al.- Inhibition of planktonic and sessile *Salmonella enterica* cells by combinations of enterocin AS-48, polymyxin B and biocides. *Food Control*. [Em Linha]. 30:1 (2012) 214-221. [Consult. 07 Nov. 2012]. Disponível na internet:<URL: <https://webvpn.uc.pt/http/0/www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512004021>>. ISSN 0956-7135.

CARRASCO, Elena; MORALES-RUEDA, Andrés; GARCÍA-GIMENO, Rosa María - Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. *Food Research International*. [Em Linha]. 45:2 (2012) 545-556. [Consult. 25 Jan. 2013].Disponível na internet: <URL:<https://webvpn.uc.pt/http/0/www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996911006260>>.ISSN 0963-9969.

CERF, O.; CARPENTIER, B.; Sanders, P. - Tests for determining in-use concentrations of antibiotics and disinfectants are based on entirely different concepts: “ Resistance ” has different meanings. *International Journal of Food Microbiology*. [Em Linha]. 136(3),(2010) 247–254. [Consult. 25 Jan. 2013]. Disponível na internet: <URL: <https://webvpn.uc.pt/http/0/www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160509005236>>. ISSN 0168-1605.

CHATURONGKASUMRIT, Yuphakhun; TAKAHASHI, Hajime; KEERATIPIBUL, Suwimon; KUDA, Takashi; KIMURA, Bon - The effect of polyesterurethane belt surface roughness on *Listeria monocytogenes* biofilm formation and its cleaning efficiency. [Em Linha]. *Food Control*. 22:12 (2011) 1893-1899. [Consult. 25 Jun. 2013]. Disponível na internet: <URL:<https://webvpn.uc.pt/http/0/www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713511001800>>. ISSN 0956-7135.

CHMIELEWSKI, R. A. N.; FRANK, J. F. - Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. [Em Linha]. 2:1 (2003) 22-32. [Consult. 10 Dez. 2012]. Disponível na internet:<URL: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1541-4337.2003.tb00012.x>>. ISSN 0956-7135.

COBURN, B.; GRASSL, G.; FINLAY, B. - *Salmonella*, the host and disease: a brief review. *Immunology and Cell Biology*. [Em Linha]. 85 (2007) 112-118. [Consult. 11 Nov. 2012]. Disponível na internet:<URL: <http://www.nature.com/icb/journal/vaop/ncurrent/full/7100007a.html>>.

DÍEZ-GARCÍA, Miriam; CAPITA, Rosa; ALONSO-CALLEJA, Carlos - Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiology*. [Em Linha]. 31:2 (2012) 173-180. [Consult. 11 Nov. 2012]. Disponível na internet:<URL: <https://webvpn.uc.pt/http/0/www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002012000676>>. ISSN 1095-9998.

DOUGAN, Gordon *et al.*- Immunity to salmonellosis. *Immunological Reviews*. [Em Linha]. 240:1 (2011) 196-210. [Consult. 15 Mai. 2013]. Disponível na internet:<URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21349095>>.

EFSA - *Salmonella* [Em linha]. Parma: EFSA, atual. 2012. [Consult. 29 Mai. 2012]. Disponível na internet: <URL: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/salmonella.htm?wtrl=01>>.

EFSA - *Food-borne zoonotic diseases* [Em linha]. Parma: EFSA, atual. 2012. [Consult. 29 Mai. 2012]. Disponível na internet:<URL: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/foodbornezoonoticdiseases.htm?wtrl=01>>.

EFSA - *What is Salmonella* [Em linha]. Parma: EFSA, atual. 2012. [Consult. 29 Mai. 2012].  
Disponível na internet:<URL:  
<http://www.efsa.europa.eu/en/corporate/pub/factsheetsalmonella.htm>>.

EFSA; ECDC - The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal*. [Em linha]. 10:3 (2012) 1-442. [Consult. 29 Mai. 2012]. Disponível na internet:<URL:  
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2597.pdf>>.

FOLEY, S. L.; LYNNE, A. M. - Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. *Journal of Animal Science*. [Em linha]. 86:E (2008) 173- 187. [Consult. 01 Jun. 2012]. Disponível na internet:<  
URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17878285>>. ISSN 1525-3163.

FOLEY, S.; LYNNE, A.; NAYAK, R. - *Salmonella* challenges: prevalence in swine and poultry and potential pathogenicity of such isolates. *Journal of Animal Science*. [Em linha]. 86:E (2008) 149-162. [Consult. 29 Nov. 2012]. Disponível na internet:<URL:  
[http://www.journalofanimalscience.org/content/86/14\\_suppl/E149.short](http://www.journalofanimalscience.org/content/86/14_suppl/E149.short)>.

FOX, Alvin - Microbiology and Immunology [Em linha]. 6th. ed. Chicago : The Board of Trustees of the University of South Carol, 2011. [Consult. 31 Mai. 2012]. Disponível na internet:<URL:<http://pathmicro.med.sc.edu/fox/enterobact.htm>>.

FURUKAWA, Soichi *et al.* - Sugar fatty acid esters inhibit biofilm formation by food-borne pathogenic bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. [Em linha]. 138:1-2 (2010) 176-180. [Consult. 06 Nov. 2012]. Disponível na internet:<URL:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2880187&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. ISSN1879-3460.

GARAI, Preeti; GNANADHAS, Divya Prakash; CHAKRAVORTTY, Dipshikha - *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi as model organisms: revealing paradigm of host-pathogen interactions. *Virulence*. [Em linha]. 3:4 (2012) 377-388. [Consult. 4 Mai. 2013]. Disponível na internet:<URL:  
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3478240&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. ISSN 2150-5608.

GIANNELLA, Ralph A. - *Medical Microbiology :Salmonella*. [Em linha]. 4th ed. ed. Galveston, Texas : University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. [Consult. 4 Mai. 2012]. Disponível na internet:<URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8435/>>. ISBN 10: 0-9631172-1-1

GILBERT, P.; MCBAIN, A. J.; RICKARD, A. H. - Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. *International Biodeterioration & Biodegradation*. [Em linha]. 51:4 (2003) 245-248. Disponível na internet:< URL: <https://webvpn.uc.pt/http/0/www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096483050300043X>> . ISSN 0964-8305.

GÓMEZ-ALDAPA, Carlos Alberto; et al.- The Role of Foods in Salmonella Infections In Barakat S. M Mahmoud (Ed.) - *Salmonella - A Dangerous Foodborne Pathogen*: [Em linha]. [S.I.]. InTech, 2012. [Consult. 26 Nov. 2012]. Disponível na internet:<URL: [http://cdn.intechopen.com/pdfs/26421/InTech-The\\_role\\_of\\_foods\\_in\\_salmonella\\_infections.pdf](http://cdn.intechopen.com/pdfs/26421/InTech-The_role_of_foods_in_salmonella_infections.pdf)>. ISBN : 978-953-307-782-6. p.21-46.

GORDON, M. A. - Invasive Non-typhoidal *Salmonella* Disease – epidemiology , pathogenesis and diagnosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*. [Em linha]. 24:5 (2011) 484-489. [Consult. 15 Jun. 2013]. Disponível na internet:<URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21844803>>.

GRIMONT, P.; WEILL, F. - *Antigenic Formulae of the Salmonella serovars*. [Em linha]. [S.I.] : WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella, 2007. [Consult. 17 Jun. 2013]. Disponível na internet:<URL: [http://nih.dmsc.moph.go.th/aboutus/media/antigenic\\_formula\\_of\\_Salmonella.pdf](http://nih.dmsc.moph.go.th/aboutus/media/antigenic_formula_of_Salmonella.pdf)>. p. 1-166.

JONES, Timothy F. et al. - Salmonellosis outcomes differ substantially by serotype. *Journal of Infectious Diseases*. [Em linha]. 198:109 (2008) 109-114. [Consult.29 Nov. 2012]. Disponível na internet: <URL: <http://jid.oxfordjournals.org/content/198/1/109.short>>.

JONG, Hanna K. de et al. - Host-pathogen interaction in invasive Salmonellosis. *PLoS Path.* [Em linha]. 8:10 (2012) e1002933. [Consult. 26 Mai. 2013]. Disponível na internet:<URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3464234&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. ISSN 1553-7374.

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*. 64:3 (2001) 367-72. [Consult. 23 Out. 2012]. Disponível na internet: <URL:<https://webvpn.uc.pt/http/0/www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016816050004669>>. ISSN 0168-1605.

KAPLAN, J. B. - Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal of Dental Research*. [Em linha]. 89:3 (2010) 205-218. [Consult. 5 Mai. 2013]. Disponível na internet:< URL: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3318030&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. ISSN 1544-0591.

KIM, Junghyun; PARK, Hee-Deung; CHUNG, Seok - Microfluidic approaches to bacterial biofilm formation. *Molecules*. [Em linha]. 17:8 (2012) 9818-9834. [Consult. 22 Mai. 2013]. Disponível na internet:<URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22895027>>. ISSN 1420-3049.

LEBERT, Isabelle; LEROY, Sabine; TALON, Régine - Effect of industrial and natural biocides on spoilage, pathogenic and technological strains grown in biofilm. *Food Microbiology*. [Em linha]. 24:3 (2007) 281-7. [Consult. 17 Dez. 2012]. Disponível na internet: <URL:<https://webvpn.uc.pt/http/0/www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002006001067>>. ISSN 0740-0020.

LIANOU, Alexandra; KOUTSOUMANIS, Konstantinos P. - Strain variability of the biofilm-forming ability of *Salmonella enterica* under various environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*. [Em linha]. 160:2 (2012) 171-178. [Consult. 19 Jun. 2013]. Disponível na internet: <URL: <https://webvpn.uc.pt/http/0/www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160512005193>>. ISSN 1879-3460.

LÓPEZ, Fabián E. et al. - *Salmonella* Typhimurium general virulence factors: A battle of David against Goliath?. *Food Research International*. [Em linha]. 45:2 (2012) 842-851. [Consult. 22 Mai. 2013]. Disponível na internet:< URL: <https://webvpn.uc.pt/http/0/www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996911005035>>. ISSN 0963-9969.

MEIRA, Quênia Gramile da Silva *et al.* - Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. *Food Control*. [Em linha]. 25:2(2012) 469-475. [Consult. 30 Out. 2012]. Disponível na internet:< URL: [https://webvpn.uc.pt/http/0/ac.els-cdn.com/S0956713511005123/1-s2.0-S0956713511005123-main.pdf?\\_tid=03107150-0bd7-11e2-a6b3-00000aab0f02&acdnat=1349103067\\_8621310761624b51ab32a9dff867d83e](https://webvpn.uc.pt/http/0/ac.els-cdn.com/S0956713511005123/1-s2.0-S0956713511005123-main.pdf?_tid=03107150-0bd7-11e2-a6b3-00000aab0f02&acdnat=1349103067_8621310761624b51ab32a9dff867d83e)>.

MØRETRØ, T.; VESTBY, L. K.; NESSE, L. L.; STORHEIM, S. E.; KOTLARZ, K.; LANGSRUD, S.- Evaluation of efficacy of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. *Journal of Applied Microbiology*. [Em linha]. 106:3 (2009) 1005-1012. [Consult. 27 Nov. 2012]. Disponível na internet:<URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19191969>>. ISSN 1365-2672.

MØRETRØ, Trond; HEIR, Even; NESSE, Live L.; VESTBY, Lene K.; LANGSRUD, Solveig- Control of *Salmonella* in food related environments by chemical disinfection. *Food Research International*. [Em linha]. 45:2 (2012) 532-544. [Consult. 05 Out. 2012]. Disponível na internet:< URL: <https://webvpn.uc.pt/http/0/www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996911000895>>. ISSN 0963-9969.

MUKHOPADHYAY, S.; RAMASWAMY, R. - Application of emerging technologies to control *Salmonella* in foods: A review. *Food Research International*. [Em linha]. 45:2 (2012) 666-677. [Consult. 13 Mai. 2013]. Disponível na internet:< URL: <https://webvpn.uc.pt/http/0/www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996911003152>>. ISSN 0963-9969.

NGUYEN, Hai Duong Ngoc; YUK, Hyun-Gyun - Changes in resistance of *Salmonella* Typhimurium biofilms formed under various conditions to industrial sanitizers. *Food Control*. [Em linha]. 29:1 (2013) 236-240. [Consult. 05 Mai. 2013]. Disponível na internet:<URL:[https://webvpn.uc.pt/http/0/ac.els-cdn.com/S095671351200326X/1-s2.0-S095671351200326X-main.pdf?\\_tid=e9a63fce-267f-11e2-9765-00000aab0f01&acdnat=1352034339\\_6999b8f119c99276bf0d3be18d790ddc](https://webvpn.uc.pt/http/0/ac.els-cdn.com/S095671351200326X/1-s2.0-S095671351200326X-main.pdf?_tid=e9a63fce-267f-11e2-9765-00000aab0f01&acdnat=1352034339_6999b8f119c99276bf0d3be18d790ddc)>.

OLIVEIRA, M.; BRUGNERA, D.; PICCOLI, R. - Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. [Em linha]. 69:3 (2010) 277-284. [Consult. 29 Out. 2012]. Disponível na internet:<URL: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=583060&indexSearch=ID>>.

PITTS, Betsey et al. -A microtiter-plate screening method for biofilm disinfection and removal. *Journal of Microbiological Methods*. [Em linha]. 54:2 (2003) 269-276. [Consult. 25 Out. 2012]. Disponível na internet:< URL: <https://webvpn.uc.pt/http/0/www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701203000344>>. ISSN 0167-7012.

RAMESH, N.; JOSEPH, S.; CARR, L. - Evaluation of chemical disinfectants for the elimination of *Salmonella* biofilms from poultry transport containers. *Poultry science*. [Em linha]. 81 (2002) 904-910. [Consult. 05 Nov. 2012]. Disponível na internet:< URL:<http://ps.fass.org/content/81/6/904.short>>.

RIVERA, C.; ESTELA, L.; ALEJANDRO, P. R. - Biofilms: A Survival and Resistance Mechanism of Microorganisms. In PANA, D. M. (Ed.) - *Antibiotic Resistant Bacteria – A Continuous Challenge in the New Millennium* [Em linha]. [S.l.] : Tech, 2012. [Consult. 05 Dez. 2012]. Disponível na internet:<URL:<http://www.intechopen.com/books/antibiotic-resistant-bacteria-a-continuous-challenge-in-the-new-millennium/biofilms-a-survival-and-resistance-mechanism-of-microorganisms>>. ISBN 978-953-51-0472-8. p. 160-178.

RODE, Tone Mari et al. - Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *International Journal of Food Microbiology*. [Em linha]. 116:3 (2007) 372-83. [Consult. 25 Out. 2012]. Disponível na internet:<URL: <https://webvpn.uc.pt/http/0/www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160507001626>>. ISSN 0168-1605.

RODRIGUES, D. et al. - *Listeria Monocytogenes* and *Salmonella Enteritidis* Biofilms Susceptibility to Different disinfectants and Stress-Response and Virulence Gene Expression of Surviving Cells. *Microbial Drug Resistance*. [Em linha]. 17:2 (2011) 181-189. [Consult. 30 Out. 2012]. Disponível na internet:<URL: [http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/16622/1/Artigo%20aceite\\_Microbial%20Drug%20Resistance.pdf](http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/16622/1/Artigo%20aceite_Microbial%20Drug%20Resistance.pdf)>.ISSN 0168-1605.

SANCHÉZ-VARGAS, Flor M.; ABU-EL-HAIJA, Maisam A. ; GÓMEZ-DUARTE, Oscar G. - *Salmonella* infections: An update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Medicine and Infectious Disease*. [Em linha]. 9 (2011) 263-277. [Consult. 11 Nov. 2012]. Disponível na internet: <URL: <https://webvpn.uc.pt/http/0/www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1477893911001207>>.

SHAKERI, Shahryar *et al.* - Assessment of biofilm cell removal and killing and biocide efficacy using the microtiter plate test. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*. [Em linha]. 23:1-2 (2007) 79-86. [Consult. 02 Out. 2012]. Disponível na internet:<URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17453732>>.

SHEFFIELD, C. L.; CRIPPEN, T. L. - Invasion and Survival of *Salmonella* in the Environment: The Role of Biofilms. In KUMAR, Y. (Ed.) - *Invasion and Survival of Salmonella in the Environment: The Role of Biofilms, Salmonella - A Diversified Superbug* [Em linha]. [S.l.] : In Tech, 2012. [Consult. 26 Nov. 2012]. Disponível na internet:<URL: <http://www.intechopen.com/books/salmonella-a-diversified-superbug/invasion-and-survival-of-salmonella-in-the-environment-the-role-of-biofilms>>. ISBN 978-953-307-781-9. p. 3-28.

SHEN, Shu.; FANG, Ferric C. - Integrated stress responses in *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology*. [Em linha]. 152:3 (2012) 75-81. [Consult. 29 Out. 2012]. Disponível na internet:< URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21570144>>.

SHI, Xianming; ZHU, Xinna - Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*. [Em linha]. 20(2009) 407-413. [Consult. 30 Nov. 2012]. Disponível na internet:<URL: <https://webvpn.uc.pt/http/0/www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512006536>>.

SILVEIRA, Leonor; MARQUES, Adelaide; MACHADO, Jorge - Infecções por *Salmonella enterica* no período entre 2000-2012. *Boletim epidemiológico*. [Em linha]. (2013) 14-16. [Consult. 04 Jun. 2013]. Disponível na internet:< URL: [http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/PublicacoesRepositorio/Documents/observa%C3%A7%C3%B5es%20N%C2%BA%20Especial%201%202013\\_artigo6.pdf](http://www.insa.pt/sites/INSA/Portugues/PublicacoesRepositorio/Documents/observa%C3%A7%C3%B5es%20N%C2%BA%20Especial%201%202013_artigo6.pdf)>.

SIMÕES, Manuel; SIMÕES, Lúcia C.; VIEIRA, Maria J. - A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology*. [Em linha]. 43(2010) 573-583. [Consult. 22 Fev. 2013]. Disponível na internet:< URL: <https://webvpn.uc.pt/http/0/www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643809003430>>.

SPERANZA, Barbara; CORBO, Maria R.; SINIGAGLIA, Milena - Effects of nutritional and environmental conditions on *Salmonella* sp. biofilm formation. *Journal of Food Science*. [Em linha]. 76:1 (2011) M12-16. [Consult. 25 Out. 2012]. Disponível na internet:< URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21535687>>. ISSN 1750-3841.

SREY, Sokunrotanak; JAHID, Iqbal Kabir ; HA, Sang-Do - Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*. [Em linha]. 31:2 (2013) 572-585. [Consult. 23 Fev. 2013]. Disponível na internet:<URL: <https://webvpn.uc.pt/http/0/www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713512006536>>. ISSN 0956-7135.

STEPANOVIĆ, Srdjan *et al.* - A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*. [Em linha]. 40:2 (2000) 175-179. [Consult. 30 Out. 2012]. Disponível na internet:<URL: <https://webvpn.uc.pt/http/0/www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701200001226>>. ISSN 0167-7012.

STEPANOVIĆ, Srdjan *et al.*- Influence of the incubation temperature, atmosphere and dynamic conditions on biofilm formation by *Salmonella* spp. *Food microbiology*. [Em linha]. 20(2003) 339-343. [Consult. 30 Out. 2012]. Disponível na internet: <URL: <https://webvpn.uc.pt/http/0/www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002002001235>>.

STEVENS, Mark P.; HUMPHREY, Tom J.; MASKELL, Duncan J. - Molecular insights into farm animal and zoonotic *Salmonella* infections. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. [Em linha]. 364(2009) 2709-2723. [Consult. 29 Nov. 2012]. Disponível na internet:<URL: <http://rstb.royalsocietypublishing.org/content/364/1530/2709.short>>.

TENKE, P. et al. - Biofilm and Urogenital Infections. In NIKIBAKHSH, D. A. (Ed.) - *Clinical Management of Complicated Urinary Tract Infection* [Em linha]. [S.l.] : In Tech, 2011. [Consult. 28 Jan. 2013]. Disponível na internet:<URL:<http://www.intechopen.com/books/clinical-management-of-complicated-urinary-tract-infection/biofilm-and-urogenital-infections>>. ISBN 978-953-307-393-4. p. 145-158.

TENOVER, Fred C. et al. - Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of Clinical Microbiology*. [Em linha]. 33:9 (1995). 2233-2239. [Consult. 23 Mar. 2013]. Disponível na internet:<URL: <http://jcm.asm.org/content/33/9/2233.full.pdf+html>>.

TESSARI, Eliana N. Castiglioni et al. - Important Aspects of *Salmonella* in the Poultry Industry and in Public Health. In Barakat S. M. Mahmoud (Ed.)- *Salmonella - A Dangerous Foodborne Pathogen* [Em linha]. [S.l.] : Tech, 2012. [Consult. 26 Nov. 2012]. Disponível na internet:<URL: <http://www.intechopen.com/books/salmonella-a-dangerous-foodborne-pathogen/important-aspects-of-salmonella-in-the-poultry-industry-and-in-public-health>>. ISBN 978-953-307-782-6. p.181-206.

THIENNIMITR, P.; WINTER, S. E.; BÄUMLER, A. J. - *Salmonella*, the host and its microbiota. *Current Opinion in Microbiology*. [Em linha]. 15:1 (2012) [Consult. 31 Mai. 2013]. Disponível na internet:<URL: <https://webvpn.uc.pt/http/0/www.sciencedirect.com/science/article/pii/S136952741100172X>>

THU, Thi; VAN, Hao; NAM, Hoang; NGUYEN, Kha; SMOOKER, Peter M.; COLOE, Peter J.- The antibiotic resistance characteristics of non-typhoidal *Salmonella enterica* isolated from food-producing animals , retail meat and humans in South East Asia. *International Journal of Food Microbiology*. [Em linha]. 154:3 (2012) 98-106. [Consult. 01 Jun. 2012]. Disponível na internet:<URL: <https://webvpn.uc.pt/http/0/www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160511007604>>. ISSN 0168-1605.

TODAR, Kenneth - *Todar's Online Textbook of Bacteriology* [Em linha]. Madison, Wisconsin : [s.n.], atual. 2012 [Consult. 6 Jun. 2012] Disponível em WWW:<URL: <http://textbookofbacteriology.net/salmonella.html>>.

VALERIANO, C. *et al.* - The sanitizing action of essential oil-based solutions against *Salmonella enterica* serotype Enteritidis S64 biofilm formation on AISI 304 stainless steel. *Food Control*. [Em linha]. 25:2 (2012) 673-677. [Consult. 25 Out. 2012] Disponível em WWW: <URL:

<https://webvpn.uc.pt/http/0/www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713511005561>>.

VENKATARAMAIAH, Prapulla Devi; BIRADAR, Baswaraj - Plaque Biofilm. In Fotinos Panagakos (Ed.)- *Gingival Diseases - Their Aetiology, Prevention and Treatment Pathogen* [Em linha]. [S.l.] : Tech, 2011. [Consult. 28 Jan. 2013]. Disponível na internet:<URL:

<http://www.intechopen.com/books/gingival-diseases-their-aetiology-prevention-and-treatment/plaque-biofilm>>. ISBN 978-953-307-376-7. p.23-40.

VESTBY, Lene K. *et al.* - Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. [Em linha]. *BMC Veterinary Research*. 5:20(2009) 20. [Consult. 25 Out. 2012] Disponível em WWW: <URL:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2693496/?tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

WANG, Huhu YE, Keping; WEI, Xinru; CAO, Jinxuan; XU, Xinglian; ZHOU, Guanghong- Occurrence, antimicrobial resistance and biofilm formation of *Salmonella* isolates from a chicken slaughter plant in China. *Food Control*. [Em linha]. 33:2 (2013) 378-384.[Consult. 04 Jun. 2013]. Disponível na internet:< URL:

<https://webvpn.uc.pt/http/0/www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713513001527>>. ISSN0956-7135.

WOLSKA, K.; SZWEDA, P. - Genotyping Techniques for Determining the Diversity of Microorganisms. In CALISKAN, P. M. (Ed.) - *Genetic Diversity in Microorganisms* [Em linha]. [S.l.] : InTech, 2012. [Consult. 02 Abr. 2013]. Disponível na internet:<URL:

<http://www.intechopen.com/books/genetic-diversity-in-microorganisms/genotyping-techniques-for-determining-the-diversity-of-microorganisms>>. ISBN 978-953-51-0064-5. p. 53-94.

WONG, H. S. *et al.* - Comparative susceptibility of planktonic and 3-day-old *Salmonella* Typhimurium biofilms to disinfectants. *Journal of Applied Microbiology*. [Em linha]. 108:6 (2010) 2222-2228. [Consult. 19 Jun. 2013]. Disponível na internet:< URL:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20002868>>.ISSN 1365-2672.

WOOD, Thomas K.; HONG, Seok Hoon; MA, Qun - Engineering biofilm formation and dispersal. *Trends in Biotechnology*. [Em linha]. 29:2 (2011) 87-94. [Consult. 28 Mai. 2013]. Disponível na internet: ISSN 1879-3096.

A imagem da capa foi gentilmente cedida pela empresa Cyano Biotech GmbH, Alemanha. [Consult. 27 Jun. 2013] Disponível na Internet: <URL: [http://www.cyano-biotech.com/\\_editor/plugins/ExtendedFileManager/daten/Downloads/microplate.jpg](http://www.cyano-biotech.com/_editor/plugins/ExtendedFileManager/daten/Downloads/microplate.jpg)>.

# **VI. Anexos**

## 6. Anexos

### Anexo I-Teste de suscetibilidade a antibióticos

Isolado Antibiótico	23	25	29	44	50	55	58	73	86	89	90	105	136	145	159	160	273	394	398	423	
Cpd	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Aug	S	I	S	S	I	I	S	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	I
Cfz	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
C	I	R	S	S	R	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	S	R	R	R
Cft	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Cft/CA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Cfx	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Nxn	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Caz	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Caz/ CA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Mz	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R
Cp	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Am	S	R	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R
A/S	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S	R	I	I	S	S	S	R	R	R	R	R
Azt	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Lvx	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
T/S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S
Cl	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Fd	S	S	S	S	S	I	S	I	R	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Cpe	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Mxf	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S	S	R	S	S
Te	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
Crn	S	R	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S
Tgc	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Gm	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
Pi	R	R	S	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R
P/T	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ak	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
To	S	R	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
Imp	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Mer	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Etp	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Fos	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

a- Cpd- Cefpodoxima; Aug- Amoxicilina+CLA; Cfz- Cefazolina; C- Cloranfenicol; Cft- Cefotaxime; Cft/CA-Cefotaxime+CA; Cfx- Cefoxitina; Nxn- Norfloxacina; Caz- Ceftazidime; Caz/CA- Ceftazidime+CA; Mz- Mezlocilina; Cp- Ciprofloxacina; Am- Ampicilina; A/S- Ampicilina+Sulbactam; Azt- Aztreoname; Lvx- Levofloxacina; T/S- Trimetoprim/Sulfametoxazole; Cl-

Colistina; Fd- Nitrofurantoina; Cpe- Cefepime; Mxf- Moxifloxacina; Te- Tetraciclina; Crm- Cefuroxime; Tgc- Tigeciclina; Gm- Gentamicina; Pi- Piperacilina; P/T- Piperacilina+TZB; Ak- Amicacina; To- Tobramicina; Imp- Imipenem; Mer- Meropenem; Etp- Ertapenem; Fos- Fosfomicina.

<sup>b</sup>- S. 23- S. Typhimurium 23; S. 25- S. Typhimurium 25; S. 29- S. Infantis 29; S. 44- S. Enteritidis 44; S. 50- S. Typhimurium 50; S. 55- S. Typhimurium 55; S. 58- S. Typhimurium 58; S. 73- S. Typhimurium 73; S. 86- S. Agona 86; S. 89- S. Virchow 89; S. 90- S. Typhimurium 90; S. 105- S. Typhimurium 105; S. 136- S. Typhimurium 136; S. 145- Typhimurium 145; S. 159- S. Derby 159; S. 160- S. Havana 160; S. 273- S. Typhimurium 273; S. 394- S. Typhimurium 394; S. 398- S. Typhimurium 398; S. 423- S. Typhimurium 423.

<sup>c</sup>- susceptível

<sup>d</sup>- intermédio

<sup>e</sup>- resistente

## **Anexo 2-Composição dos tampões e soluções de PFGE**

### **Tampão de lise**

- 6 mM de Tris base;
- 1 M de cloreto de sódio;
- 0,1 M de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) pH 8;
- 0,2 % de Ácido desoxicólico;
- 0,5% de N-lauril sarcosina,
- 0.5 % de Brij 58

### **Solução de lise com proteínase K**

- 0,5 M de EDTA
- 1 % de N-lauroil sarcosina
- 1 mg de proteínase K

(1 mL de solução por cada isolado)

### **Tampão Tris EDTA**

- 12,1 g de Tris;
- 3,72 g de Na EDTA
- 30 mL de HCl 2 M
- Perfazer com água até 1 L

### **Tampão de restrição**

- 10 µL de tampão NEB4 10x (BioLabs Inc., New England)
- 90 µL de água estéril

(por cada isolado)

### **Mistura de restrição**

- 87,5  $\mu\text{L}$  de água MiliQ estéril
- 10  $\mu\text{L}$  de Albumina sérica bovina (BSA Purified 100x, BioLabs Inc., Nova Inglaterra)
- 1,5  $\mu\text{l}$  de XbaI (30U) (BioLabs Inc., Nova Inglaterra)

(100  $\mu\text{L}$  por cada isolado)

### **Tampão Tris/Borato/EDTA 10 X**

- 108 g de Tris base
- 54 g de ácido bórico
- 7,44 g de NaEDTA
- Perfazer com água até 1 L e autoclavar