







Formação de biofilmes e resistência a antimicrobianos de isolados de *Salmonella* spp.

Biofilm formation and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. isolates

Greici Bergamo^{1*} , Fernanda Demoliner¹ , Cláudio Dias Timm¹ , Natália Rodrigues Carvalho¹ , Elizabete Helbig¹ , Eliezer Avila Gandra¹ 

¹Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

*Correspondente - greici.bergamo@hotmail.com

Resumo

O presente estudo avaliou a presença de *Salmonella* spp. em 89 amostras de produtos cárneos comercializados na região sul do Rio Grande do Sul e, a partir dos isolados obtidos, foi verificada a capacidade de resistência a agentes antimicrobianos e de formação de biofilme em superfícies de poliestireno. Foi constatada a presença de *Salmonella* spp. em 19,1% das amostras avaliadas e, dos isolados obtidos, 40% mostraram resistência a pelo menos um dos agentes antimicrobianos testados e 33,3% manifestaram-se multirresistentes. Apenas o antimicrobiano amicacina (30 µg) foi eficaz na inibição de todos os isolados testados. Nenhum isolado mostrou-se capaz de formar biofilmes em superfícies de poliestireno.

Palavras-chave: antibiótico; linguiça frescal; multirresistência; produtos cárneos.

Abstract

The objective of the study was to evaluate the presence of *Salmonella* spp. in 89 samples of meat products marketed in southern Rio Grande do Sul and from isolates obtained was verified the ability of resistance to antimicrobials and biofilm formation on polystyrene surfaces. The presence of *Salmonella* spp. was found in 19.1% of the samples. Of the isolates obtained, 40% showed resistance to at least one of the tested antimicrobials and 33.3% expressed multiresistant. Only the antimicrobial amikacin (30 µg) was effective in inhibiting all isolates tested. No isolate was able to form biofilms on polystyrene surfaces.

Keywords: antibiotics; sausage frescal; multiresistance; meat products.

Seção: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Recebido
26 de julho de 2017.

Aceito
3 de abril de 2019.

Publicado
5 de fevereiro de 2020.

www.revistas.ufg.br/vet

Como citar - disponível no site, na página do artigo.

Introdução

Um dos principais microrganismos investigados em produtos alimentícios é a *Salmonella* spp. Essa bactéria tem ampla faixa de atuação, podendo causar doenças graves principalmente em idosos, crianças e indivíduos imunodeprimidos que necessitam de hospitalização e de um cuidado rigoroso, representando altos custos sociais e

econômicos⁽¹⁾. Nos Estados Unidos são registrados anualmente 23.000 hospitalizações e 450 óbitos decorrentes de infecções causadas por *Salmonella* spp.⁽²⁾. No Brasil, entre os anos de 2000 a abril de 2013, 39,39 % das doenças transmitidas por alimentos apontaram *Salmonella* spp. como agente responsável e os alimentos com maior incidência de contaminação foram ovos, doces e sobremesas, água, carne bovina, leites e carne de frango⁽³⁾.

Após o desenvolvimento de uma infecção causada por *Salmonella* spp. em humanos ou animais, são utilizados agentes antimicrobianos a fim de cessar o processo infeccioso e, como muitas vezes esses medicamentos são utilizados de maneira inadequada, as bactérias podem adquirir mecanismos que as tornam resistentes a essas drogas⁽⁴⁾. Na pecuária, os agentes antimicrobianos são utilizados como promotores do crescimento e na prevenção e tratamento de doenças e, como grande porcentagem desses medicamentos também são utilizados no tratamento de doenças em humanos, tem-se aumentado o risco do surgimento de bactérias resistentes e multirresistentes que podem ocasionar infecções de difícil tratamento⁽⁵⁾.

Outra característica importante desse microrganismo refere-se a sua estrutura: seus apêndices filamentosos, chamados de fímbrias, possibilitam sua aderência às superfícies facilitando a colonização com a posterior formação de biofilmes⁽⁶⁾. Ao fazer parte da estrutura complexa de um biofilme, as bactérias tornam-se mais tolerantes ao estresse e passam a ter uma maior resistência a antibióticos e desinfetantes, o que dificulta a sua eliminação. Existe ainda a preocupação do biofilme em atuar como um substrato, atraindo bactérias que normalmente não teriam a capacidade de formá-lo. Esses fatores são preocupantes nas linhas de produção de indústrias alimentícias, uma vez que a grande concentração de células aderidas aos equipamentos podem facilmente contaminar lotes inteiros de produtos⁽⁷⁾.

Diante do exposto, o objetivo desse estudo foi avaliar a presença de *Salmonella* spp. em amostras de produtos cárneos comercializadas em estabelecimentos comerciais da região sul do Rio Grande do Sul – Brasil e, a partir dos isolados encontrados, verificar a resistência a agentes antimicrobianos e à formação de biofilme em superfícies de poliestireno.

Materiais e métodos

As amostras de produtos cárneos foram coletadas em estabelecimentos comerciais localizados no sul do Rio Grande do Sul, no período de junho a novembro de 2014. Essas amostras foram adquiridas na forma como eram comercializadas, “a granel”, acondicionadas em caixa isotérmica com gelo e imediatamente encaminhadas para análise no Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas. Ao todo foram coletadas 89 amostras, sendo 47 de linguiça suína frescal, 15 de linguiça mista frescal (elaborada com carne suína e bovina), 12 de carne bovina moída, oito de cortes de frango, cinco de carne bovina em pedaços e duas de linguiça de frango frescal.

As amostras foram avaliadas pelos métodos descritos pela Instrução Normativa n. 62⁽⁸⁾ e pelo anexo D da ISO 6579:2002/Amd 1:2007 (E)⁽⁹⁾.

Para a etapa de pré-enriquecimento, foram pesadas 25 g de cada amostra e a elas foram acrescentados 225 mL de Diluente Água Peptonada Tamponada 0,1 % (APT), seguida de incubação a 37 °C por 20 horas. Após este período, foram transferidos 100 µL da amostra para um tubo contendo 9,9 mL de Caldo Rappaport Vassiliadis (RV) e para placas contendo Ágar Semissólido Rappaport Vassiliadis (MSRV), 1 mL para tubos contendo 10 mL de Caldo Selenito Cistina (SC) e 10 mL de Caldo Tetratonato (TT) para a etapa de enriquecimento seletivo. Os tubos foram homogeneizados e incubados junto com as placas de ágar a 42 °C durante 24 horas.

A partir das placas de Ágar MSR/V com crescimento característico de *Salmonella* spp. e dos tubos contendo crescimento nos caldos de enriquecimento seletivo, foram semeadas placas de Ágar Brilliant Green Phenol Red Lactose Sucrose (BPLS) e Ágar Xylose Lysine Deoxycholate Modified (XLD) seguida de incubação a 37 °C por 24 horas.

Após esse período, das placas que apresentaram crescimento com morfologia característica para *Salmonella* spp. foram selecionadas três colônias e semeadas em placas contendo ágar nutriente com posterior incubação a 37 °C por 24 horas. A partir das colônias obtidas em ágar nutriente, realizou-se a identificação bioquímica em tubos com Caldo Ureia, Ágar Triple Sugar Iron (TSI) e Ágar Lysine Iron Agar (LIA) com incubação a 37 °C por 24 horas. As colônias que apresentaram reações características de *Salmonella* spp. nos ágar TSI, LIA e no caldo Uréia foram submetidas a teste sorológico de aglutinação rápida com soro polivalente anti-*Salmonella* somático "O" e flagelar "H". Quando observada a aglutinação em até três minutos, a amostra foi considerada positiva para *Salmonella* spp.

Os isolados identificados como *Salmonella* spp. foram mantidos sob congelamento em Caldo Brain Heart Infusion (BHI) e Glicerol (propano-1,2,3-triol) na proporção de 750 µL de BHI para 250 µL de Glicerol para posterior teste de avaliação da resistência a antimicrobianos e da capacidade de formação de biofilme.

A susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados foi testada através do método de disco-difusão de acordo com protocolo proposto pelo Manual Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI⁽¹⁰⁾. A partir da cultura congelada, o isolado foi reativado em Caldo BHI por 37 °C por 24 horas e, após o período, uma alçada de cada isolado foi transferida para placas de Ágar Triptona de Soja (TSA) que foram incubadas a 37 °C durante 24 horas. As culturas foram ressuspendidas em solução salina (NaCl 0,85 %) e padronizadas na concentração 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹), sendo posteriormente semeadas com swab estéril em Ágar Muller-Hinton. Após a secagem do ágar, multidiscos de antibiótico (Laborclin®) foram inseridos e as placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas. Os halos de inibição foram medidos e interpretados de acordo com as normas do CLSI⁽¹¹⁾ e os isolados de *Salmonella* spp. foram classificados como sensível, intermediário e resistente. Os antibióticos testados foram os comumente utilizados para bactérias gram-negativas: amoxicilina mais clavulanato (20 µg e 10 µg), amicacina (30 µg), ampicilina (10 µg), cefalotina (30 µg), gentamicina (10 µg), sulfametaxazol mais trimetoprim (23,75 µg e 1,25 µg), meropenem (10 µg), ceftazidima (30 µg), cefepime (30

µg), cefoxitina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), cefuroxina axetil (oral, 30 µg) e cefuroxina axetil (sódica, 30 µg).

A avaliação da capacidade de formação de biofilme foi realizada segundo o método proposto por Stepanovic et al.⁽¹²⁾. A partir da padronização das culturas na concentração 0,5 da escala de McFarland, conforme citado no procedimento para avaliação da resistência a antimicrobianos, 20 µL foram inoculados em poços de placas de microtitulação de poliestireno contendo 180 µL caldo BHI (para cada amostra, foram utilizados três poços). As placas foram fechadas com tampa e incubadas a 35 °C por 24 horas. Como controle negativo, utilizou-se somente caldo BHI (200 µL) e, como controle positivo, utilizou-se 180 µL de caldo BHI e 20 µL da solução padronizada com o microrganismo *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 25923), previamente testado e considerado como forte formador de biofilme. Após o crescimento, as amostras foram lavadas três vezes com 200 µL de solução salina estéril (NaCl 0,85%) e o biofilme foi fixado na placa com 150 µL de metanol P.A. (CH₃OH) durante 20 minutos. Após esse período, o metanol foi descartado e as placas foram mantidas invertidas durante 18 horas a 20 °C. Para corar o biofilme fixado na placa, foram adicionados 150 µL de solução corante Cristal Violeta (0,5%) durante 15 minutos.

As placas foram invertidas e o excesso de corante foi retirado com água corrente, e, em seguida, adicionou-se 150 µL de etanol a 95 % (CH₃CH₂OH). Após repouso por 30 minutos foi realizada a quantificação do biofilme bacteriano em um espectrofotômetro leitor de placas de micropoços (Anthos 2010 Type 17 550 4894) em 450 nm. Os ensaios foram realizados em triplicata. Os resultados foram calculados a partir do valor da densidade óptica dada na leitura das placas seguindo os critérios propostos por Stepanovic et al.⁽¹³⁾. Foram utilizados os seguintes índices e procedimentos: "Do" (média dos nove valores da densidade óptica das amostras e do controle positivo); "Don" (média dos nove valores de absorbância obtidos do controle negativo somado a três vezes o seu desvio padrão); Dof (valor da Do menos a Don). A classificação final foi dada segundo as fórmulas:

Equação 1 – $Dof \leq Don$ = não formadora de biofilme;

Equação 2 – $Don < Dof \leq 2 \times Don$ = fraca formadora de biofilme;

Equação 3 – $2 \times Don < Dof \leq 4 \times Don$ = moderada formadora de biofilme;

Equação 4 – $4 \times Don < Dof$ = forte formadora de biofilme.

Resultados e discussão

Das 89 amostras de produtos cárneos avaliadas, 17 (19,1%) foram positivas para a presença de *Salmonella* spp., enquadrando-se fora do que estabelece a Resolução RDC n. 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária⁽¹⁴⁾, a qual define ausência de *Salmonella* spp. para essa categoria de produto. O microrganismo foi isolado em amostras de linguiça fresca de origem suína e mista (elaborada com carne suína e bovina) e em carne bovina moída (Tabela 1).

Tabela 1. Presença de *Salmonella* spp. em 25 gramas de produtos cárneos comercializados na Região Sul do Rio Grande do Sul

Amostras	Total (n)	Positivas	(%)
Linguiça suína frescal	47	13	27,7
Linguiça mista frescal (suína e bovina)	15	3	20,0
Carne bovina moída	12	1	8,3
Cortes de frango	8	0	0
Carne bovina em pedaços	5	0	0
Linguiça de frango frescal	2	0	0
Total	89	17	19,1

Possíveis explicações para este resultado podem estar relacionadas a problemas higiênicos no abate do animal, que poderiam ter propiciado a contaminação da matéria-prima, ou a problemas higiênicos durante a fabricação e venda. Uma das etapas críticas do processo de fabricação pela qual as amostras que apresentaram contaminação por *Salmonella* spp. foram submetidas é a moagem. Ao ser moída, a carne aumenta seu volume e conseqüentemente sua superfície de contato propiciando a incorporação de resquícios de moagens já realizadas no equipamento e que ficaram expostas a temperatura ambiente, facilitando assim o desenvolvimento de bactérias⁽¹⁵⁾. Como esses produtos não passam por tratamento térmico, as células vegetativas de microrganismos como *Salmonella* spp. não são destruídas e encontram na carne condições intrínsecas ideais para seu desenvolvimento e multiplicação⁽¹⁶⁾. Segundo Oliveira et al.⁽¹⁷⁾, os riscos de contaminação aumentam em produtos que utilizam equipamentos de moagem em seu processo de fabricação, pois podem conter peças de difícil limpeza e higienização, aumentando o risco de contaminação cruzada.

Ainda, alguns autores indicam os maus hábitos de higiene dos manipuladores e as precárias condições no ambiente de fabricação dos alimentos como as principais causas da maioria das doenças transmitidas por alimentos^(18,19,20). Esses fatores também podem justificar a presença de *Salmonella* spp. nas amostras avaliadas por esse estudo.

Outra característica importante a ser avaliada é que 94,1 % das amostras que apresentaram presença de *Salmonella* spp. foram produzidas com carne suína. Castagna et al.⁽²¹⁾ relacionaram a contaminação de embutidos do tipo frescal com a presença de *Salmonella* spp. nos linfonodos submandibulares, nas tonsilas e no conteúdo intestinal de suínos evidenciando assim que, para esse tipo de produto, a contaminação por esse microrganismo pode ter origem também na contaminação da matéria-prima.

Outro fator que também pode ter sido determinante para a presença de *Salmonella* spp. verificada nas amostras de produtos cárneos analisadas são as condições de armazenamento da matéria-prima. Costa et al.⁽²²⁾ constataram situações irregulares de armazenamento de carne in natura em estabelecimentos comerciais na cidade de Recife, Pernambuco. Vários refrigeradores eram mantidos fora da temperatura de refrigeração adequada propiciando o crescimento microbiano e alguns deles encontravam-se em precárias condições de higiene. Essas condições também auxiliam

a contaminação cruzada possibilitando o desenvolvimento de bactérias patogênicas como *Salmonella* spp.

Os dados obtidos mostram um índice de presença de *Salmonella* spp. semelhante ao encontrado em outras pesquisas realizadas no Brasil. Souza et al.⁽²³⁾, analisaram 40 amostras de linguiça frescal coletadas em municípios do estado do Paraná e constataram a presença de *Salmonella* spp. em 15% delas. Dias et al.⁽²⁴⁾ avaliaram 67 amostras de produtos cárneos adquiridas em estabelecimentos comerciais do sul do Rio Grande do Sul e constataram presença de *Salmonella* spp. em 4,2% nas amostras de carne bovina moída, 9,5% de linguiça frescal suína e 13,6% de linguiça frescal de frango. Daguer et al.⁽¹⁶⁾ avaliaram 51 amostras de linguiça frescal suína e de frango obtidas em estabelecimentos situados no estado do Paraná e encontraram presença de *Salmonella* spp. em 5 (9,8%) delas. Spricigo et al.⁽²⁵⁾ avaliaram 200 amostras de linguiça suína tipo frescal obtidas no comércio da cidade de Lages, Santa Catarina, e observaram presença de *Salmonella* spp. em 27% delas.

Os sintomas clínicos causados pela ingestão de alimentos contaminados com *Salmonella* spp. estão relacionados com o sorotipo envolvido e variam de sintomas brandos que não necessitam de intervenção médica, febre, diarreia, gastroenterite até septicemia, podendo, nesse caso, levar o paciente a óbito⁽²⁶⁾. Levando em consideração que esse microrganismo é eliminado em temperaturas entre 60 °C a 75 °C⁽²⁷⁾ e, se por ventura os consumidores que adquiriram os produtos com presença de *Salmonella* spp. não tenham utilizado tratamento térmico adequado no processo culinário, eles poderiam estar expostos a desenvolver algum sintoma anteriormente mencionado.

Quanto à capacidade de resistência a antimicrobianos, dos 17 isolados de *Salmonella* spp., 15 deles foram testados, sendo 11 provenientes de linguiça suína frescal, três de linguiça mista frescal e uma de carne bovina moída. Ressalta-se que dois isolados oriundos de linguiça suína frescal não apresentaram células viáveis depois da etapa de reativação (descrita na seção de Materiais e Métodos) e por isso não foram testados. Os resultados estão apontados na Tabela 2.

Dos 15 isolados de *Salmonella* spp. avaliados, seis (40 %) apresentaram resistência a pelo menos um dos antimicrobianos testados e cinco (33,3 %) apresentaram multirresistência. Os antimicrobianos com menor eficiência foram a ampicilina (10 µg), gentamicina (10 µg) e amoxicilina (20 µg) mais clavulanato (10 µg). Dos 13 antimicrobianos testados, apenas um (amicacina 30 µg) apresentou inibição de todos os isolados testados. Spricigo et al.⁽²⁵⁾ avaliaram 60 isolados de *Salmonella* spp. e observaram resistência em 56,7 % das amostras sendo que 20 % delas foram multirresistentes e, diferente dos resultados obtidos nesse estudo, nenhuma amostra foi resistente à amoxicilina mais ácido clavulânico e gentamicina. Dias et al.⁽²⁴⁾ avaliaram seis isolados provenientes de carne moída bovina, linguiça frescal suína e de frango e todos foram sensíveis à ampicilina, resultado esse que também foi diferente do presente estudo em que cinco (33,3 %) amostras demonstraram-se resistentes a essa substância. O aumento da resistência bacteriana a agentes antimicrobianos tem sido associada a sua utilização indevida e excessiva em humanos e animais ao longo dos anos⁽⁵⁾ e esse fato pode ser uma provável justificativa da eficiência da amoxicilina mais clavulânico e gentamicina

para isolados de *Salmonella* spp. em um primeiro momento e, anos depois, não apresentarem o mesmo efeito.

Tabela 2. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos de isolados de *Salmonella* spp. provenientes de produtos cárneos comercializados na Região Sul do Rio Grande do Sul

Antibiótico	Isolado								
	Carne moída (n=1)			Linguiça frescal suína (n=11)			Linguiça frescal mista (n=3)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Meropenem (10µg)	1	0	0	10	1	0	3	0	0
Amicacina (30µg)	1	0	0	11	0	0	3	0	0
Ceftazidima (30µg)	1	0	0	10	1	0	2	1	0
Cefepime (30µg)	1	0	0	11	0	0	2	1	0
Gentamicina (10µg)	1	0	0	10	0	1	0	0	3
Cefoxitina (30µg)	1	0	0	10	0	1	3	0	0
Ampicilina (10µg)	1	0	0	9	0	2	0	0	3
Sulfametoxazol (23,75µg) + Trimetoprim (1,25µg)	1	0	0	9	0	2	3	0	0
Cefalotina (30µg)	1	0	0	9	1	1	2	0	1
Ciprofloxacina (5µg)	1	0	0	11	0	0	2	0	1
Cefuroxina Axetil (Oral) (30µg)	1	0	0	11	0	0	2	0	1
Cefuroxina Axetil (Sódica) (30µg)	1	0	0	10	1	0	1	1	1
Amoxicilina (20µg) + Clavulanato (10µg)	1	0	0	9	0	2	0	2	1

S = Sensível; I = Intermediário; R = Resistente

O alto número de isolados de *Salmonella* spp. multirresistentes a antibióticos encontrado nas amostras é preocupante pois demonstra que esses microrganismos estão se tornando resistentes a vários tipos de substâncias antibióticas disponíveis no mercado para tratamento de infecções. A Organização Mundial da Saúde – OMS⁽⁵⁾ alerta para o fato de que as bactérias estão criando mecanismos de resistência a novas substâncias antibióticas com rapidez superior ao desenvolvimento desses medicamentos e, se a situação não for controlada, bactérias multirresistentes não serão combatidas através dos medicamentos disponíveis, acarretando em consequências imprevisíveis à saúde. Para amenizar esses efeitos, Korb et al.⁽²⁸⁾ sugerem que o controle da resistência bacteriana deve ser feito de forma integrada e intersetorial através de ações contínuas que divulguem os malefícios relacionados ao uso indiscriminado e sem necessidade de antibióticos. O ideal é que a prescrição de antibióticos para inibir infecções causadas por bactérias em humanos e animais seja realizada por médicos e veterinários após o isolamento da bactéria e a aplicação de testes de resistência antimicrobiana afim de que substância e dose corretas sejam administradas sem exageros⁽²⁹⁾.

Quanto à capacidade de formação de biofilme em superfícies de poliestireno, todos os 15 isolados avaliados foram considerados não formadores. Existem estruturas presentes em *Salmonella* spp. que contribuem significativamente para que esse microrganismo seja capaz de formar biofilme, por exemplo, as fímbrias presentes na estrutura celular de *Salmonella* spp., relatadas por Gibson et al.⁽⁶⁾ como principais responsáveis pela formação de biofilmes em superfícies. Segundo Borges et al.⁽³⁰⁾, a formação de biofilmes também pode estar relacionada a uma variedade de genes, sendo que a presença ou ausência de um gene pode ou não refletir sua expressão. Ainda, os mesmos autores evidenciaram que a temperatura influencia na formação de biofilmes de cepas de *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium, obtendo uma redução na produção de biofilme a 28 °C. Assim, características específicas de cada sorotipo também são fatores que podem influenciar no crescimento e na capacidade de formação de biofilmes de cepas de *Salmonella*⁽³¹⁾.

Apesar dos isolados deste estudo terem apresentado morfologia e reações bioquímicas características de *Salmonella* spp., eles não apresentaram a capacidade de formar biofilme. A possível explicação para estes resultados está no fato de que a formação de biofilme não é somente dependente de estruturas celulares como fímbrias, podendo ser expressa ou suprimida dependendo de fatores genéticos que são regulados principalmente por condições ambientais, aos quais provavelmente os isolados avaliados não foram submetidos.

Conclusão

Apesar de nenhum dos isolados de *Salmonella* spp. ter demonstrado capacidade de formar biofilmes em superfícies de poliestireno, a presença desse microrganismo em amostras de produtos cárneos indica falhas e falta de cuidados higiênicos na cadeia produtiva. Ainda, o alto índice de resistência a antimicrobianos demonstra que cuidados devem ser reforçados ao administrar essas substâncias sem necessidade específica, tanto em humanos quanto em animais.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

Referências

1. Bajpai VK, Baek K-H, Kang SC. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. Food Research International. 2012;45(2):722–34.
2. Yang Q, Wang F, Jones KL, Meng J, Prinyawiwatkul W, Ge B. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification for the rapid, reliable, and robust detection of *Salmonella* in produce. Food Microbiology. 2015;46:485–93.

3. Brasil. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos. SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde. 2013;35p.
4. Souza CO, Ramos FLP, Mota CM, Santos LVS, Lopes ML. Resistência antimicrobiana de *Salmonella* Typhi identificadas no Estado do Pará, Brasil. Revista Pan-Amazônica de Saúde. 2010;1(2):61–5.
5. OMS. Organização Mundial da Saúde. A crescente ameaça da resistência antimicrobiana. Genebra, Suíça. 2012;
6. Gibson DL, White AP, Rajotte CM, Kay WW. AgfC and AgfE facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella enteritidis*. Microbiology. 2007; 53(4):1131–40.
7. Lapidot A, Romling U, Yaron S. Biofilm formation and the survival of *Salmonella* Typhimurium on parsley. International Journal Food Microbiology. 2006;109(3):229–33.
8. Brasil. Instrução Normativa n. 62 de 23 de Agosto de 2003. Oficializa os métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para controle de produtos de origem animal e água. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. 2003.
9. International Organisation for Standardisation. Microbiology of food and animal feeding stuffs — horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. International Organization Standardization - ISO 6579:2002 (E). 2002.
10. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Metodologia dos testes de sensibilidade antimicrobiana. CLSI Doc M07-A06. 2005;23(2).
11. CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Normas de desempenho para testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para crescimento de bactérias aeróbias. CLSI Doc M100-S15. 2005;25(1).
12. Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. Journal Microbiology Methods. 2000;40(2):175–9.
13. Stepanović S, Vuković D, Hola V, Bonaventura G, Djukić S, Cirković I, et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. Journal of Pathology, Microbiology and Immunology - APMIS. 2007;115(8):891–9.
14. Brasil. Resolução RDC n. 12 de 02 de Janeiro de 2001. Regulamento técnico sobre os padrões microbiológicos para alimentos. Diário Oficial da União, Brasília. 2001.
15. Almeida AS, Gonçalves PMR, Franco RM. *Salmonella* em corte de carne bovina inteiro e moído. Higiene Alimentar. 2002;16(96):77–81.
16. Daguer H, Silva HD, Higashiyama ET, Zanette CM, Bersot LS. Qualidade de produtos cárneos fabricados sob inspeção federal no Estado do Paraná. Ciência Animal Brasileira. 2011;12(2):359–64.
17. Oliveira MMM, Brugnera DF, Mendonça AT, Piccoli RH. Condições higiênico-sanitárias de máquinas de moer carne, mãos de manipuladores e qualidade microbiológica da carne moída. Ciência e Agrotecnologia. Editora UFLA; 2008;32(6):1893–8.
18. Nolla AC, Cantos GA. Relação entre a ocorrência de enteroparasitoses em manipuladores de alimentos e aspectos epidemiológicos em Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. Cadernos Saúde Pública. 2005;21(2):641–5.
19. Matos V de SR, Gomes APP, Santos VA dos, Freitas F, Silva I de MM da. Perfil sanitário de carne bovina in natura comercializada em supermercados. Revista do Instituto Adolfo Lutz. 2012;71(1):187–92.

20. Alves E, Giarreta AG, Costa F. Higiene pessoal dos manipuladores de alimentos dos Shoppings Centers da região da grande Florianópolis. *Revista Técnico Científica do IFSC*. 2012;1(2):604-14.
21. Castagna SMF, Schwarz P, Canal CW, Cardoso MRI. Prevalência de suínos portadores de *Salmonella* sp. ao abate e contaminação de embutidos tipo frescal. *Acta Scientiae Veterinariae* 2004;32(2):141-7.
22. Costa JNP, Santos VVM, Silva GR, Moura FML, Gurgel CAB, Moura APBL de. Condições higiênico-sanitárias e físico-estruturais da área de manipulação de carne *in natura* em minimercados de Recife (PE), Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico (São Paulo)*. 2013;80(3):352-8.
23. Souza M, Pinto FGS, Bona EAM, Moura AC. Qualidade higiênico-sanitária e prevalência de sorovares de *Salmonella* em linguças frescas produzidas artesanalmente e inspecionadas, comercializadas no oeste do Paraná, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico (São Paulo)*. 2014;81(2):107-12.
24. Dias PA, Conceição RCS, Coelho FJO, Tejada TS, Segatto M, Timm CD. Qualidade higiênico-sanitária de carne bovina moída e de embutidos frescos comercializados no sul do Rio Grande do Sul, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*. 2008;6(3):359-63.
25. Spricigo DA, Matsumoto SR, Espíndola ML, Vaz EK, Ferraz SM. Prevalência e perfil de resistência a antimicrobianos de sorovares de *Salmonella* isolados de linguças suínas tipo frescal em Lages, SC. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2008;60(2):517-20.
26. Shinohara NKS, Barros VB, Jimenez SMC, Machado ECL, Dutra RAF, Lima Filho JL. *Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. *Ciência e Saúde Coletiva*. 2008;13(5):1675-83.
27. Nadvorny A, Maria D, Figueiredo S, Schmidt V. Ocorrência de *Salmonella* sp. em surtos de doenças transmitidas por alimentos no Rio Grande do Sul em 2000. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2004;32(1):47-51.
28. Korb A, Brambilla DK, Teixeira DC, Rodrigues RM. Riscos para a saúde humana do uso de antibióticos na cadeia produtiva leiteira. *Revista de Saúde Pública de Santa Catarina*. 2011;4(1):21-36.
29. Arias MVB, Maio Carrilho CMD. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação? *Semina: Ciências Agrárias*. 2012;33(2):775-90.
30. Díez-García M, Capita R, Alonso-Calleja C. Influence of serotype on the growth kinetics and the ability to form biofilms of *Salmonella* isolates from poultry. *Food Microbiology*. 2012;31:173-180.
31. Borgesa KA, Furiana TQ, Souza SN, Menezes R, Lima DA, Fortesa FBB, et al. Biofilm formation by *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* isolated from avian sources is partially related with their in vivo pathogenicity. *Microbial Pathogenesis*. 2018;118:238-241.