



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**PESQUISA E AVALIAÇÃO DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE
LISTERIA MONOCYTOGENES, *SALMONELLA* SPP. E
ESCHERICHIA COLI EM AMBIENTE DE ABATEDOURO
FRIGORÍFICO DE SUÍNOS**

REBECCA LAVARINI DOS SANTOS

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL**

**BRASÍLIA - DF
NOVEMBRO/2021**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

**PESQUISA E AVALIAÇÃO DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE
LISTERIA MONOCYTOGENES, *SALMONELLA* SPP. E
ESCHERICHIA COLI EM AMBIENTE DE ABATEDOURO
FRIGORÍFICO DE SUÍNOS**

REBECCA LAVARINI DOS SANTOS

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. ÂNGELA PATRÍCIA SANTANA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL**

PUBLICAÇÃO: 183/2021

**BRASÍLIA - DF
NOVEMBRO/2021**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

PESQUISA E AVALIAÇÃO DE FORMAÇÃO DE BIOFILMES DE *LISTERIA MONOCYTOGENES*, *SALMONELLA SPP.* E *ESCHERICHIA COLI* EM AMBIENTE DE ABATEDOURO FRIGORÍFICO DE SUÍNOS

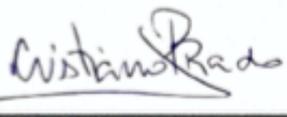
REBECCA LAVARINI DOS SANTOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM SAÚDE ANIMAL.

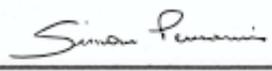
APROVADA POR:



**ÂNGELA PATRÍCIA SANTANA, Prof.^ª. Dr.^ª (Universidade de Brasília - UnB)
(ORIENTADOR)**



**CRISTIANO SALES PRADO, Prof. Dr. (Universidade Federal de Goiás - UFG)
(EXAMINADOR EXTERNO)**



**SIMONE PERECMANIS, Prof.^ª. Dr.^ª (Universidade de Brasília - UnB)
(EXAMINADOR INTERNO)**

BRASÍLIA - DF, 04 DE NOVEMBRO DE 2021

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

SANTOS, R.L. **Pesquisa e avaliação de formação de biofilmes de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* em ambiente de abatedouro frigorífico de suínos.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2021, 53 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Rebecca Lavarini dos

Pesquisa e avaliação de formação de biofilmes de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* em ambiente de abatedouro frigorífico de suínos. Rebecca Lavarini dos Santos, orientação de Ângela Patrícia Santana, 2021. 53 p.

Dissertação de Mestrado (M) - Universidade de Brasília/Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, 2021.

1. Suínos 2. *Salmonella* 3. *Listeria monocytogenes* 4. *Escherichia coli*
I. Santana, A.P. II. Título

CDD ou CDU
Agris / FAO

Agradecimentos

A Deus e a Nossa Senhora, sem fé eu não conseguiria chegar até aqui.

Ao meu esposo Macário por todo apoio e incentivo, caminhar junto a alguém que me impulsiona a ser sempre melhor é a maior benção da minha vida.

Aos meus pais e irmãos que estiveram comigo em todos os momentos da minha vida acadêmica. Compartilhar risadas, lágrimas e conselhos com vocês é o que me faz forte.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Ângela Patrícia Santana, por todos os ensinamentos e pelo apoio desde os meus primeiros anos como graduanda. Todos os alunos deveriam ter a sorte de serem incentivados como eu fui.

À maravilhosa equipe de técnicos e pós-graduandos do Lamal-UnB, Virgílio e Hayanna, agradeço por toda a ajuda no laboratório e pelos cafezinhos na copa, e as minhas amigas e companheiras de bancada, Emilia e Joana, agradeço os muitos artigos compartilhados, as risadas em momentos difíceis e as dicas para que tudo ocorresse da melhor maneira, vocês são profissionais incríveis!

À todos que contribuíram para a realização deste estudo, em especial ao Dr. Bruno Dallago pela disponibilidade e auxílio prestado na realização deste trabalho.

Por fim, agradeço ao apoio financeiro que viabilizou esse projeto, a CAPES, ao Decanato de Pós-Graduação da Universidade de Brasília e ao Programa de Pós Graduação em Saúde Animal da FAV-UnB.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Confirmação por PCR de *Salmonella* Typhi isolada do abatedouro frigorífico A localizado na região do Distrito Federal. 1) marcador 100bp (Invitrogen®), 2) controle negativo, 3) controle positivo para *Salmonella* spp., fragmento 204bp (primer *ompC*), 4) fragmento 204bp (primer *ompC*) para *Salmonella* spp. e 738bp (primer *viaB*) para sorotipo Typhi. Visualização em gel de agarose 2% corado com 0,5 µg/ml, em transiluminador de luz ultravioleta (Major Science®) 20

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Pontos ou locais de detecção de *Escherichia coli* em ambiente, equipamentos e utensílios dos abatedouros frigoríficos de suínos A e B localizados na região do Distrito Federal. 16

Tabela 02. Resultado dos antibiogramas de disco de difusão dos 21 isolados de *Escherichia coli* provenientes de ambientes dos abatedouros frigoríficos de suínos A e B localizados na região do Distrito Federal. 22

Tabela 03. Resultado individual dos 21 isolados de *E. coli* dos antibiogramas por disco de difusão, de detecção de genes de resistência antimicrobiana e de genes de virulência, e os locais onde cada um foi identificado nos abatedouros frigoríficos de suínos A e B, localizados na região do Distrito Federal. 23

Tabela 04. Resultados do antibiograma por disco de difusão e das detecções de genes de resistência antimicrobiana do isolado de *Salmonella* spp., e do local de isolamento no abatedouro frigorífico de suínos A, localizado na região do Distrito Federal. 29

Tabela 05. Resultados do teste de capacidade de formação de biofilmes *in vitro* dos 21 isolados de *Escherichia coli* em microplaca de poliestireno incubadas por 24h e 72h em três diferentes temperaturas (37°C, 24°C e 10°C). A classificação utilizada foi a de STEPANOVIĆ *et al.* (2000), em que DOi equivale a densidade óptica do isolado e DOn a densidade óptica do controle negativo. 36

Tabela 06. Resultados do teste de capacidade de formação de biofilmes *in vitro* do isolado de *Salmonella* Typhi em microplaca de poliestireno incubadas por 24h e 72h em três diferentes temperaturas (37°C, 24°C e 10°C). A classificação utilizada foi a de STEPANOVIĆ *et al.* (2000), onde DOi equivale a densidade óptica do isolado e DOn a densidade óptica do controle negativo. 39

LISTA DE QUADROS

Quadro 01. Oligonucleotídeos utilizados para confirmação do gênero e detecção de sorovares de *Salmonella* spp. 9

Quadro 02. Oligonucleotídeos utilizados para detecção de genes de resistência a antimicrobianos. 12

Quadro 03. Oligonucleotídeos utilizados para detecção de genes de virulência e sorotipos em isolados de *Escherichia coli*. 14

LISTA DE ABREVIATURAS

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
AMO	Amoxicilina
AMP	Ampicilina
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
BHI	Caldo <i>Brain Heart Infusion</i>
BPF	Boas práticas de Fabricação
BPLS	Ágar verde brilhante
CAZ	Ceftazidima
CFZ	Cefazolina
CIP	Ciprofloxacina
CLO	Cloranfenicol
COL	Colistina
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DTAs	Doenças Transmitidas por Alimentos
DOi	Densidade óptica do isolado
DO _n	Densidade óptica do controle negativo
DOX	Doxiciclina
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatogênica
EST	Estreptomicina
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
ExPEC	<i>E. coli</i> patogênica extraintestinal
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
GEN	Gentamicina
GRSC	Granjas de Reprodutores Suídeos Certificadas
IN	Instrução normativa
IPEC	<i>E. coli</i> patogênica intestinal zoonótica
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>

LEE	<i>Locus of enterocyte effacement</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MOX	Ágar Oxford Modificado
NAL	Ácido nalidíxico
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
PPHO	Procedimento Padrão de Higiene Operacional
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
STEC	<i>E. coli</i> produtora de shiga toxina
SUL	Sulfonamida
TET	Tetraciclina
TSA	Ágar Triptona de Soja
TSB	Caldo Triptona de Soja
TSI	Ágar Tríplice Açúcar Ferro
UFC	Unidade formadora de colônia
UVM	Caldo Universidade de Vermont
VM	Prova do Vermelho de Metila
VP	Prova de Voges-Proskau
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO	01
2. OBJETIVOS	04
2.1. Objetivo geral	04
2.2. Objetivo específico	04
3. MATERIAL E MÉTODOS	05
3.1. Origem das amostras	05
3.2. Pesquisa de <i>Escherichia coli</i>	06
3.3. Pesquisa de <i>Salmonella</i> spp.	07
3.4. Pesquisa de <i>Listeria monocytogenes</i>	08
3.5. Confirmação de detecção de <i>Salmonella</i> spp. pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	08
3.6. Pesquisa de resistência antimicrobiana dos isolados.....	09
3.7. Avaliação da capacidade de formação de biofilme <i>in vitro</i> das cepas isoladas	10
3.8. Pesquisa de genes de resistência	12
3.9. Pesquisa de genes de virulência	14
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1. Pesquisa e isolamento de <i>Escherichia coli</i> em abatedouros frigoríficos de suínos localizados no Distrito Federal	16
4.2. Pesquisa e isolamento de <i>Salmonella</i> spp. em abatedouros frigoríficos de suínos localizados no Distrito Federal	18
4.3. Pesquisa e isolamento de <i>Listeria monocytogenes</i> em abatedouros frigoríficos de suínos localizados no Distrito Federal	20
4.4. Antibiograma e detecção de genes de resistência antimicrobiana dos isolados de <i>Escherichia coli</i>	21

4.5. Antibiograma e detecção de genes de resistência antimicrobiana do isolado de <i>Salmonella</i> spp.	28
4.6. Genes de virulência em isolados de <i>Escherichia coli</i>	31
4.7. Avaliação <i>in vitro</i> da capacidade de formação de biofilmes de isolados de <i>Escherichia coli</i>	34
4.8. Avaliação <i>in vitro</i> da capacidade de formação de biofilme do isolado de <i>Salmonella</i> spp.	39
5. CONCLUSÃO	41
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar a presença de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* e *Escherichia coli*, bem como realizar antibiograma, detectar genes de resistência antimicrobiana e virulência, e avaliar a capacidade de formação *in vitro* de biofilmes dos isolados de ambientes, equipamentos e utensílios de abatedouros frigoríficos de suínos localizados no Distrito Federal. Foram detectados 21 isolados de *Escherichia coli*, 01 isolado de *Salmonella* Typhi e não houve detecção de *Listeria monocytogenes*. A *Salmonella* Typhi foi isolada do piso da câmara de resfriamento de carcaças, e apresentou multirresistência a antimicrobianos, sendo eles o ácido nalidíxico, cefazolina, cloranfenicol, doxiciclina, estreptomicina, gentamicina, tetraciclina e sulfonamida, também foram detectados os genes de resistência *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(M)* e *ampC*. Apresentou ainda capacidade moderada de formação de biofilme a 37°C após incubação de 72h. Em relação aos 21 isolados de *E. coli*, o local com o maior número de detecções foi o piso da câmara de resfriamento de carcaças, onde o microrganismo foi isolado em 3 (75%) das 4 coletas. Os isolados apresentaram resistência a 12 dos 13 antimicrobianos testados, sendo que nenhum isolado apresentou sensibilidade ao cloranfenicol, antimicrobiano de uso proibido na alimentação animal desde 2003 no Brasil. Houve presença dos genes de resistência *MCR-1*, *MCR-3*, *sul1*, *ampC*, *clmA*, *cat1*, *tet(A)*, *tet(B)* e *blaSHV*, também foram detectados os genes de virulência *stx-1*, *hlyA*, *eae*, *tir α*, *tir β*, *tir γ* e *saa* nos isolados de *E. coli*. No que se refere à capacidade de formação de biofilme, verificou-se forte capacidade de formação de biofilmes em 5 (23,8%) dos isolados de *E. coli* e capacidade moderada em 15 (71,4%) isolados deste mesmo microrganismo. Em relação às diferentes temperaturas, tempo de incubação e seus locais de origem, o isolado oriundo da mesa de toailete do abatedouro frigorífico apresentou a maior capacidade de formação de biofilme, enquanto o oriundo da parede da câmara de resfriamento não formou biofilme em nenhuma das condições tempo e temperatura verificados neste estudo. No geral, os isolados apresentaram maior capacidade de formação de biofilmes a 10°C após 72h de incubação. A menor capacidade de formação de biofilmes foi verificada na temperatura de 37°C após 24h de incubação. Visto que os isolados apresentaram genes de resistência e virulência, multirresistência a antimicrobianos e capacidade de formação de biofilmes, os resultados deste estudo sugerem risco à saúde de

pública devido a associação destes patógenos a doenças transmitidas por alimentos, sendo pertinente ressaltar o risco de propagação de genes de resistência no ambiente.

Palavras-chave: Suínos, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*.

ABSTRACT

The aim of this work was to verify the presence of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and *Escherichia coli*, as well as perform antibiogram, detect genes of antimicrobial resistance and virulence, and evaluate the *in vitro* capacity of biofilm formation of strains isolated from swine slaughterhouse environments, equipment and utensils located at the Distrito Federal area, Brazil. Twenty-one strains of *Escherichia coli* and one strain of *Salmonella* Typhi were detected, there was no detection of *Listeria monocytogenes*. *Salmonella* Typhi was isolated from the cold storage chamber floor and showed multiresistance to antimicrobials (nalidixic acid, cefazolin, chloramphenicol, doxycycline, streptomycin, gentamicin, tetracycline and sulfonamide), were also detected the resistance genes *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(M)* and *ampC*. The *Salmonella* strain showed a moderate capacity for biofilm formation at 37°C after 72h incubation. Regarding the 21 *E. coli* strains, the place with the highest number of detections was the cold storage chamber floor, where the microorganism was isolated in 3 (75%) of the 4 collected swab samples. The strains were resistant to 12 of the 13 antimicrobials tested, none of the isolates were sensitive to chloramphenicol, an antimicrobial that has been banned in animal feed since 2003 in Brazil. The resistance genes *MCR-1*, *MCR-3*, *sul1*, *ampC*, *clmA*, *cat1*, *tet(A)*, *tet(B)*, *blaSHV*, and the virulence genes *stx-1*, *hlyA*, *eae*, *tir* α , *tir* β , *tir* γ were detected in *E. coli* strains. Concerning the capacity of biofilm formation, a strong biofilm formation was found in 5 (23.8%) of the *E. coli* strains and a moderate biofilm formation in 15 (71.4%) strains of this same microorganism. Regarding the different temperatures, incubation period and their places of origin, the strain isolated from the abattoir evisceration table had the greatest capacity to form a biofilm, while the one from the cold storage chamber walls did not form biofilm under any of the time vs. temperature conditions in this study. In general, the strains showed higher capacity to form biofilms at 10°C after 72h incubation. The lowest capacity for biofilm formation was verified at 37°C after 24h of incubation. Since the strains presented resistance and virulence genes, multiresistance to antimicrobials and the capacity to form biofilms, the results of this study suggest a risk to public health due to the association of these pathogens with foodborne diseases, it is also pertinent to emphasize the risk of spreading resistance genes in the environment.

Keywords: Swine, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil é o quarto maior exportador de carne suína, e essa produção aumentou de forma consistente na última década, tendo, segundo Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA, 2020), um aumento da produção de 3 milhões de toneladas de carne suína em 2009 para 4 milhões de toneladas em 2019. Ainda de acordo com ABPA (2020) o cenário é promissor, visto que a previsão é de contínuo crescimento da demanda mundial por proteína animal, e o Brasil apresenta uma taxa de crescimento anual de produção superior a mundial, sendo essa performance produtiva um reflexo da importância do país no mercado internacional.

As indústrias brasileiras produtoras de carnes suínas obtiveram uma receita de aproximadamente US\$750 milhões com exportação em 2019, em que 81% foi destinada ao mercado interno brasileiro e 19% ao mercado externo (ABPA, 2020). A boa performance brasileira no mercado de carnes se deve ao preço competitivo aliado a qualidade, o que torna essencial a atenção aos microrganismos patogênicos que possam acarretar crises sanitárias ou representar entraves à comercialização desses produtos (BOTELHO *et al.*, 2017). A ciência dos alimentos continua a avançar na segurança alimentar e vigilância sanitária, impulsionada pelo desenvolvimento da sociedade e pela globalização, que mudou de maneira significativa os hábitos de produção e consumo (MARINS, 2014).

A carne suína, assim como outros produtos de origem animal, é passível de contaminação por microrganismos, e podemos destacar os agentes bacterianos por sua alta capacidade de multiplicação e conhecido envolvimento em surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos - DTAs (MELO *et al.*, 2018), tendo o Ministério da Saúde (2010) classificado as DTAs como síndrome, onde os sinais clínicos variam de anorexia, náuseas, vômitos, diarreia, hipertermia, até afecções renais, hepáticas e nervosas. Ressalta-se ainda a gravidade dessa síndrome em crianças menores de 5 anos, em decorrência da alta mortalidade, bem como em indivíduos imunodeprimidos e geriatras (BRASIL, 2010).

As bactérias são responsáveis por 92,2% dos surtos de DTAs ocorridos no Brasil, sendo que a *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes*

estão entre as principais envolvidas em Doenças Transmitidas por Alimentos, por isso são monitoradas e avaliadas em profundidade por pesquisadores de diversos países que buscam determinar o que é necessário para evitar e combater surtos futuros (BRASIL, 2018; ADLEY & RYAN, 2016).

De acordo com o perfil epidemiológico dos agentes etiológicos publicado pelo Ministério da Saúde (2018), a *Escherichia coli* é o segundo agente bacteriano mais comumente envolvido em surtos alimentares no Brasil. Trata-se de uma bactéria Gram-negativa anaeróbia facultativa e habitante comensal ubíqua presente no trato gastrointestinal de humanos e animais, porém é uma espécie particularmente complexa, tendo se diversificado em cepas patogênicas responsáveis por enfermidades que vão desde infecções do trato gastrointestinal até septicemias, meningites neonatais, infecções do trato urinário e do sistema respiratório (RAMOS, 2020; ALIZADE *et al.*, 2019; GARRITY & STALEY, 2005). Essas cepas são classificadas em patótipos: *E. coli* patogênica intestinal zoonótica (IPEC) e *E. coli* patogênica extraintestinal (ExPEC), de acordo com o fator de virulência presente na estirpe e nos sintomas clínicos do hospedeiro (LINDSTEDT *et al.*, 2018). A *E. coli* é relevante quando abordamos agentes bacterianos de origem alimentar, pois é indicadora de contaminação fecal e já foi identificada como causa de surtos alimentares em diferentes países (YANG *et al.*, 2017; NEWELL *et al.*, 2010).

A *Salmonella* spp. é mundialmente um dos patógenos com maior envolvimento em doenças de origem alimentar (WHO, 2018). Dentro do gênero foram identificados cerca de 2.600 sorotipos, que em sua maioria conseguem se adaptar a uma grande variedade de hospedeiros animais, incluindo humanos (LEE *et al.*, 2014). Ao ser ingerida possui a capacidade de atravessar a camada epitelial intestinal, onde se prolifera, resultando em inflamação decorrente da atividade no sistema reticuloendotelial (DAIGLE, 2021). As doenças causadas pela ingestão de alimentos contaminados por esse microrganismo podem ser divididas em três grupos: febre tifóide causada pela *Salmonella* Typhi, febres entéricas causadas pela *Salmonella* Paratyphi e as salmoneloses que são causadas pelos demais sorotipos (PAL *et al.*, 2015).

A *Listeria* é um microrganismo gram-positivo móvel com capacidade de crescimento em condições anaeróbicas ou aeróbicas (GARRITY & STALEY, 2005).

Possui 17 sorovares caracterizados de acordo com seus antígenos de membrana, e a sua dose infectiva varia conforme a cepa bacteriana e a susceptibilidade do paciente (MATEREK & OKOH, 2020). Lakicevic & Nastasijevic (2016) salientam que em indústrias de processamento de alimentos existem reservatórios potenciais de *Listeria spp.*, como as superfícies de equipamentos, as substâncias selantes impermeáveis, cintas transportadoras e ralos que permanecem de meses há anos no ambiente industrial e que cepas detectadas nesses locais podem persistir por um longo período no ambiente industrial ocasionando contaminação cruzada ou recontaminação dos alimentos ali produzidos. A *Listeria monocytogenes* é a espécie mais patogênica e de maior importância para a saúde pública, e tem a sua patologia amplamente documentada em surtos de listeriose de origem alimentar em que se destaca por sua capacidade abortiva, podendo também ocasionar septicemias, meningites e encefalites (WHO/FAO, 2018; CARVALHO *et al.*, 2014). Essa bactéria traz uma preocupação particular com relação ao manuseio de alimentos, pois pode crescer em temperaturas de geladeira (4°C a 10°C), que são comumente usadas para controlar patógenos em alimentos (FDA, 2013; TODD & NOTERMANS, 2011; FAO, 2004).

A contaminação dos alimentos por estes três microrganismos patogênicos é problemática nas indústrias, pois uma vez presentes na linha de processamento dificilmente serão eliminados devido a sua proliferação e possível formação de biofilmes (BORGES *et al.*, 2018; LAKICEVIC & NASTASIJEVIC, 2016). A formação dos biofilmes dá-se devido a capacidade de aderência dos microrganismos em diferentes superfícies, em que ocorre o crescimento isolado ou combinado de bactérias que são ligadas por uma matriz polimérica extracelular aderida a superfícies sólidas que disponham de nutrientes necessários para sua proliferação, nas plantas de abatedouros frigoríficos essa condição é atribuída às falhas na higienização e sanitização do sistema de abate (WANG, 2019). Uma vez que ocorre a formação da matriz extracelular do biofilme, há o fortalecimento das ligações entre a bactéria e superfície, influenciando significativamente na arquitetura, atividade e tolerância aos desinfetantes, por consequência, as bactérias ali presentes são mais resistentes ao processo de sanitização e mais tolerantes aos tratamentos físicos e químicos, quando comparados às células bacterianas livres (WANG, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Na indústria da carne os biofilmes bacterianos são particularmente preocupantes, pois podem se formar em locais de difícil higienização, facilitando a contaminação cruzada e favorecendo a deterioração dos alimentos (WANG, 2019; KOO *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2013). Um número significativo de relatos vem surgindo a respeito da persistência de alguns patógenos de origem alimentar associados a biofilmes nas indústrias, em sua maioria são detectados em superfícies de contato com alimentos, afetando a qualidade, quantidade e segurança dos produtos (SATPATHY *et al.*, 2016). Além do comprometimento da higiene dos alimentos e do risco à saúde pública, destacam-se também pela associação a resistência a antibióticos e transferência de genes entre bactérias, podendo levar ao aumento do número de cepas virulentas circulantes (MATEREK & OKOH, 2020; ALIZADE *et al.*, 2019; VASUDEVAN *et al.*, 2014).

Tendo em vista a importância dos microrganismos *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* para a saúde pública, os poucos relatos de detecção de biofilmes em indústrias brasileiras produtoras de carnes suína, e a ausência de dados na região do Distrito Federal e Entorno, este trabalho teve por objetivo pesquisar estes microrganismos e realizar a caracterização molecular e de resistência antimicrobiana de isolados oriundos de biofilmes presentes em ambientes, equipamentos e utensílios de abatedouros frigoríficos de suínos da região do Distrito Federal.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Pesquisar os microrganismos *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em biofilmes presentes em ambientes, equipamentos e utensílios de abatedouros frigoríficos de suínos da região do Distrito Federal.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar a pesquisa e isolamento de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* no ambiente industrial, nos equipamentos e utensílios utilizados em abatedouros frigoríficos de suínos do Distrito Federal.

- Verificar os pontos de detecção dos microrganismos na linha de processamento da indústria;
- Realizar antibiograma e detectar genes de resistência a antimicrobianos dos isolados pela reação em cadeia da polimerase;
- Promover a pesquisa dos principais genes de virulência em todos os isolados;
- Avaliar a capacidade de formação de biofilme *in vitro* das estirpes isoladas de diferentes pontos da indústria.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Origem das amostras

As amostras foram coletadas por meio de *swabs* estéreis (Absorve®) em 2 abatedouros frigoríficos de suínos localizados no Distrito Federal. As indústrias apresentavam Serviço de Inspeção Oficial e aceitaram participar da pesquisa espontaneamente. A média de abate das mesmas era de 110 animais por dia, sendo consideradas de médio porte para a região, e os suínos abatidos eram oriundos de granjas cadastradas na Defesa Agropecuária do Distrito Federal (SEAGRI - DF), mas não possuíam a certificação de sanidade GRSC (Granjas de Reprodutores Suídeos Certificadas).

Foram realizadas 2 visitas ao abatedouro frigorífico de suínos A e 2 visitas ao abatedouro frigorífico de suínos B, perfazendo um total de 4 visitas com intervalo mínimo de 24h entre elas, entre os períodos de 2019 e 2021. Utilizou-se o método de arraste (BARROS *et al.*, 2007) para as coletas, sendo 22 amostras de *swabs* coletadas no abatedouro frigorífico A, onde foram coletados 11 pontos/ locais da planta de processamento industrial na primeira visita e, repetiu-se os mesmos 11 pontos/ locais de coleta de amostras por arraste de *swab* na segunda visita, sendo que para cada ponto/ local de coleta foi amostrado apenas 1 *swab*. O mesmo procedimento foi realizado nas coletas do abatedouro frigorífico B, totalizando 44 amostras de *swabs*. Os pontos/ locais escolhidos foram definidos de acordo com

protocolo apresentado por BARROS (2005), CABRAL *et al.* (2017) e NICOLAU & BOLOCAN (2014), sendo eles divididos em instalações (pisos, paredes e ralos) e nos equipamentos/ utensílios (mesas, faca de sangria, depiladeira e serra de carcaça).

A técnica utilizada para coleta de amostras foi o esfregaço de superfície com *swabs* em água peptonada 0,1% (Himedia®), utilizou-se moldes estéreis de poliestireno de 30 cm². As coletas das amostras foram realizadas no período entre a última higienização pós-abate do local e antes de iniciarem as atividades diárias nos abatedouros frigoríficos/ procedimentos de higienização pré-abate, uma vez que estudos comprovaram a relação entre a permanência de bactérias em superfícies após procedimentos de higienização nas indústrias com a presença de biofilmes bacterianos (PAN *et al.*, 2006; VESTBY *et al.*, 2009). A caracterização dos biofilmes bacterianos seguiu o protocolo descrito por BERRANG *et al.* (2005) no qual foi utilizado o método de repetição de coleta em diferentes dias e nos mesmos pontos da planta de processamento da indústria para confirmação da persistência do microrganismo.

Posteriormente as amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas e encaminhadas ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos (LAMAL) da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, onde foram analisadas em um prazo inferior a 4 horas após a coleta, para o isolamento e identificação microbiológica.

3.2. Pesquisa de *Escherichia coli*

Para a realização do isolamento e identificação de *E. coli* seguiu-se o protocolo descrito por SANDRINI *et al.* (2007). Os *swabs* foram transferidos dos tubos contendo água peptonada (Himedia®) 0,1% para tubos contendo 9 mL de água peptonada tamponada (Acumedia®) a 1% e incubados à 37°C por 24 horas em estufas bacteriológicas (Quimis®), sendo posteriormente transferidas para o Ágar Eosina Azul de Metileno da marca Acumedia® através de plaqueamento de superfície. Foram posteriormente incubadas a 37°C por 24 horas em estufa

bacteriológica (Quimis®) para a observação do crescimento de colônias típicas de *E. coli* (colônias pretas-azuladas com ou sem reflexo verde metalizado). Aproximadamente três UFC com características morfológicas de *E. coli* foram repicadas em Ágar Tríplice Açúcar Ferro (Acumedia®) e incubadas à 37°C por 24 horas. As colônias sugestivas foram submetidas às provas bioquímicas de produção de Indol, Citrato Simmons, teste de Vermelho de Metila e teste de Voges-Proskauer para a confirmação do microrganismo *Escherichia coli* (FENG *et al.*, 2002).

3.3. Pesquisa de *Salmonella* spp.

A metodologia para a análise das amostras foi preconizada pelo Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da *Salmonella* spp. (BRASIL, 2011) e pela ISO 6579/2002 (Organization for Standardization, 2002), onde os *swabs* de superfície que se encontravam em água peptonada (Himedia®) a 0,1% foram transferidos para tubos contendo 9 mL de água peptonada tamponada (Acumedia®) a 1% e incubados em estufa bacteriológica (Quimis®) à 37°C por 24 horas, sendo posteriormente transferidos 1 mL desse material para 10 mL de caldo Selenito Cistina (Merck®) e 0,1 mL para 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis (Fluka®), os quais foram incubados em estufa bacteriológica (Fanem®) à 42°C por 24 horas. Em seguida, com auxílio de uma alça de níquel-cromo, os caldos supracitados foram plaqueados por esgotamento em estrias em meio seletivo Ágar Verde Brilhante Vermelho de Fenol (BPLS) da marca Acumedia®, novamente incubados à 37° por 24 horas. Aproximadamente três UFC com características morfológicas de *Salmonella* spp. foram repicadas em Ágar Tríplice Açúcar Ferro - TSI (Acumedia®) e incubados à 37° por 18-24 horas. Os tubos de TSI com crescimento sugestivo de *Salmonella* foram submetidos aos testes bioquímicos indicados no Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da *Salmonella* spp. (BRASIL, 2011), sendo eles a hidrólise da uréia, fenilalanina desaminase, pesquisa da produção de indol, prova de Voges-Proskauer (VP), prova do Vermelho de Metila (VM), lisina descarboxilase e utilização do citrato.

Foi realizada a técnica de análise de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) para identificação e confirmação do gênero *Salmonella* spp. Os controles positivos para a padronização do procedimento foram gentilmente cedidos pela

3.4. Pesquisa de *Listeria monocytogenes*

A metodologia de pesquisa e isolamento utilizada foi a preconizada pela Instrução Normativa nº40 (BRASIL, 2005) para pesquisa e isolamento microbiológico de *Listeria monocytogenes*. Os *swabs* mergulhados em água peptonada (Himedia®) a 0,1% foram transferidos para tubos contendo 9 mL de água peptonada tamponada (Acumedia®) a 1% e incubados em estufa bacteriológica (Quimis®) à 37°C por 24 horas, sendo posteriormente transferidos 1 mL dessa solução para 9 mL de caldo UVM (Acumedia®) para incubação a 35°C por 24 horas. Em seguida transferiu-se 0,1mL do caldo UVM para 10mL de caldo Fraser (Acumedia®), incubados à 35°C por 24h. Em seguida, os tubos de caldo Fraser que apresentavam hidrólise da esculina foram plaqueados com auxílio de uma alça de níquel-cromo por esgotamento em estrias para uma placa de ágar MOX (Difco®), incubadas em seguida à 35°C por 24h. As colônias pequenas e com halo de hidrólise de esculina foram colhidas e transferidas para caldo Brain Heart Infusion (BHI) da marca Difco® e incubadas à 37°C por 24 horas.

Realizou-se o teste de turbilhonamento com gotícula retirada do caldo BHI, coloração gram e teste da catalase (RYSER & DONNELLY, 2015). Para a identificação e confirmação da *L. monocytogenes*, foi utilizada a técnica de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR), descrita por ROCHA *et al.* (2014) e PAILLARD *et al.* (2003). Os controles positivos para a padronização do procedimento foram gentilmente cedidos pela Fundação Oswaldo Cruz - Rio de Janeiro.

3.5. Confirmação de detecção de *Salmonella* spp. pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a confirmação da detecção do gênero *Salmonella* spp. utilizou-se a metodologia descrita por FREITAS *et al.* (2010), na qual as colônias previamente isoladas e que possuíam características morfológicas e bioquímicas sugestivas do microrganismo foram submetidas à técnica da PCR, com o gene alvo *ompC*, utilizando-se primers *OMPCF* e *OMPCR*, com fragmento apresentando 204pb

(ALVAREZ *et al.*, 2004; KWANG *et al.*, 1996). Para a pesquisa de sorovares do isolado confirmado foram utilizados os oligonucleotídeos descritos no Quadro 01.

Quadro 01. Oligonucleotídeos utilizados para confirmação do gênero e detecção de sorovares de *Salmonella* spp.

Gene	Primer	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Tamanho (pb)	Temperatura de anelamento (°C)	Referência
<i>ompC</i>	OMPCOM PCR	ATCGCTGACTTATGCAATCG CGGGTTGCGTTATAGGTCTG	204	57	ALVAREZ <i>et al.</i> , 2004
<i>entF</i>	ENTF ENTR	TGTGTTTTATCTGATGCAAGAGG TGAACACTACGTTCTCTTCTG G	304	56	ALVAREZ <i>et al.</i> , 2004
<i>viaB</i>	ViaBF ViaBR	CACGCACCATCATTTCACCG AACAGGCTGTAGCGATTAGG	738	57	KUMAR <i>et al.</i> , 2006
DT 104	104F 104R	ATGCGTTTGGTCTCACAGCC GCTGAGGCCACGGATATTTA	102	56	PRITCHETT <i>et al.</i> , 2000

3.6. Pesquisa de resistência antimicrobiana dos isolados

O teste de antibiograma foi realizado em todos os microrganismos isolados e identificados, através da técnica de disco-difusão descrita Kirby-Bauer (BAUER *et al.*, 1966) em ágar Mueller-Hinton (Acumedia®), seguindo as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020). Ao todo foram utilizadas 13 bases químicas de antimicrobianos (SENSIFAR®): AMO - amoxicilina (β -lactâmico), AMP - ampicilina (β -lactâmico), NAL - ácido nalidíxico (quinolona), CFZ - cefazolina (β -lactâmico), CAZ - ceftazidima (β -lactâmico), COL - colistina (polimixina), CIP - ciprofloxacino (fluorquinolona), CLO - cloranfenicol (anfenicol), DOX - doxiciclina (tetraciclina), EST - estreptomicina (aminoglicosídeo), GEN - gentamicina (aminoglicosídeo), SUL - sulfonamida (sulfonamida) e TET - tetraciclina (tetraciclina).

As bactérias isoladas foram inoculadas em caldo BHI - *Brain Heart Infusion* (Difco®) e incubadas à 37°C até alcançarem o grau de turbidez 0,5 na escala padrão de McFarland (Nefelobac - Probac do Brasil). Em seguida, um swab estéril (Absorve®) foi embebido no caldo e usado para plaqueamento no ágar Mueller-Hinton (Acumedia®), de maneira que o caldo BHI anteriormente cultivado fosse distribuído de maneira uniforme por toda a placa. Posteriormente, os discos de antibióticos foram colocados nas placas de petri com o auxílio de uma pinça estéril, não foi excedida a quantidade de 5 discos por placa visando manter a distância mínima recomendada pelo CLSI (2020). Em seguida as placas foram incubadas à 37°C por 24h e em estufa bacteriológica (Quimis®). Para finalizar a análise, os diâmetros dos halos das zonas de inibição foram medidos e interpretados segundo os parâmetros do CLSI (2020), com exceção dos padrões para colistina, na qual foi utilizado o padrão definido pelo European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2021). As estirpes testadas foram classificadas como resistentes, intermediárias ou sensíveis aos antimicrobianos pesquisados.

3.7. Avaliação da capacidade de formação de biofilme *in vitro* das cepas isoladas

A avaliação da capacidade de formação de biofilmes *in vitro* seguiu a metodologia utilizada por DAVANZO (2020) e BORGES *et al.* (2018), nas quais os isolados foram submetidos a ensaio em microplaca de titulação de poliestireno de fundo plano com 96 poços. As cepas foram cultivadas em ágar Triple Soy (TSA - Acumedia®) a 37° C por 24h, posteriormente 5 colônias cultivadas no ágar TSA foram passadas para 10 mL de caldo Triple Soy sem glicose (TSB - Acumedia®) e incubadas a 37° C por 24h. Em seguida, foram adicionadas alíquotas dessa suspensão ao caldo TSB até atingir concentração de 3×10^8 UFC/mL (escala 1 de MacFarland - Probac do Brasil®). Posteriormente, 200µL dessa suspensão foram adicionados a um poço da microplaca estéril de poliestireno (Kartell®). Todos os isolados foram testados em triplicata e o controle negativo foi feito com 200 µL de caldo TSB sem glicose não inoculado.

As microplacas contendo os isolados foram incubadas por 24h e 72h em três temperaturas: 37°C por ser a temperatura ótima para multiplicação dos microrganismos pesquisados (ROSSI, 2001), 24°C por ser a média da temperatura ideal para a expressão de componentes da matriz polimérica extracelular (HUFNAGEL *et al.*, 2014; COMBROUSE, 2013) e 10°C por ser a temperatura máxima recomendada pelo Serviço Federal de Inspeção para instalações destinadas ao espóstejamento e desossa de carcaças provenientes do resfriamento (BRASIL, 1995).

Após a incubação, as suspensões bacterianas presentes nos poços foram submetidas ao processo de lavagem com solução estéril de cloreto de sódio a 0,9%, esse procedimento foi realizado 3 vezes em cada poço. Logo em seguida, as placas secaram em temperatura ambiente e foram fixadas com 200 µL de metanol por 15 minutos. O metanol foi removido e, após as placas estarem secas, foram coradas com 200 µL de cristal violeta de Hucker a 1% por 10 minutos. Os poços foram lavados em água corrente, secaram à temperatura ambiente e receberam 200 µL de ácido acético (J.T.Baker®) a 33% para que fosse realizada a leitura da absorbância em leitor de ELISA (Biotek® ELx800), foi utilizado o comprimento de onda de 490nm.

A média aritmética da leitura das absorbâncias obtidas das triplicatas determinou a densidade óptica de cada isolado, sendo esse valor comparado com o valor do controle negativo (DON). A avaliação da capacidade e intensidade de formação de biofilme foi dividida em: isolado não formador de biofilme (NF) quando a densidade óptica do isolado (DOI) foi menor ou igual à DON ($DOI \leq DON$); fracamente formador de biofilme se $DON < DOI \leq 2x DON$; formador de biofilme moderado se $2x DON < DOI \leq 4x DON$ ou forte formador de biofilme se $4x DON < DOI$ (STEPANOVIĆ *et al.*, 2000).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SAS (v9.4, Cary, North Carolina) em nível de significância de 5%. Inicialmente foi realizado um teste de normalidade (Shapiro-Wilk) e, em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância utilizando o PROC GLIMMIX e como variáveis de classificação o tempo, o fômite, a temperatura e suas interações.

3.8. Pesquisa de genes de resistência

Foram pesquisados 17 genes de resistência a antimicrobianos, pertencentes às classes dos beta-lactâmicos, tetraciclinas, sulfonamidas, anfenicóis, aminoglicosídeos e polimixinas. Utilizou-se a técnica da PCR de colônia nos isolados, as reações foram realizadas em termociclador (MyCycler BioRad®) e tinham volume final de 25µl, as temperaturas de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados estão descritas no Quadro 02.

Quadro 02. Oligonucleotídeos utilizados para detecção de genes de resistência a antimicrobianos.

Gene	Primer	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Tamanho (pb)	Temperatura de anelamento (°C)	Referência
<i>MCR-1</i> (polimixina)	CLR5-F CLR5-R	CGGTCAGTCCGTTTGTTT CTTGGTCGGTCTGTAGGG	309	52	LIU <i>et al.</i> , 2016
<i>MCR-2</i> (polimixina)	MCR2-F MCR2-R	TGGTACAGCCCCTTTATT GCTTGAGATTGGGTTATGA	1617	48	XAVIER <i>et al.</i> , 2016
<i>MCR-3</i> (polimixina)	MCR3-F MCR3-R	TTGGCACTGTATTTTGCAATT TTAACGAAATTGGCTGGAACA	542	52	YIN <i>et al.</i> , 2017
<i>MCR-4</i> (polimixina)	Mcr-4 FW Mcr-4 RV	ATTGGGATAGTCGCCTTTTT TTACAGCCAGAATCATTATCA	487	51	CARATOLLI <i>et al.</i> , 2017
<i>tet(A)</i> (tetraciclina)	tet(A)-F tet(A)-R	GTGAAACCCAACATACCCC GAAGGCAAGCAGGATGTAG	887	53	VAN <i>et al.</i> , 2008
<i>tet(B)</i> (tetraciclina)	tet(B)-F tet(B)-R	CCTTATCATGCCAGTCTTGC ACTGCCGTTTTTTCGCC	773	53	VAN <i>et al.</i> , 2008

<i>tet(C)</i> (tetraciclina)	tet(C)-F tet(C)-R	ACTTGGAGCCACTATCGAC CTACAATCCATGCCAACCC	880	53	VAN <i>et al.</i> , 2008
<i>tet(M)</i> (tetraciclina)	tet(M)-1 tet(M)-2	GTAAATAGTGTCTTGGAG CTAAGATATGGCTCTAACAA	700	49	AARESTRUP <i>et al.</i> , 2000
<i>ermA</i> (macrolídeo)	ermA-F ermA-R	TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT	645	51	SUTCLIFFE <i>et al.</i> , 1996
<i>ermB</i> (macrolídeo)	ermB-F ermB-R	GAAAAGGTA CTCAACCAAATA AGTAACGGTACTTAAATTGTTTAC	639	54	SUTCLIFFE <i>et al.</i> , 1996
<i>ermC</i> (macrolídeo)	ermC-F ermC-R	TCAAAACATAATATAGATAAAA GCTAATATTGTTAAATCGTCAAT	642	51	SUTCLIFFE <i>et al.</i> , 1996
<i>ereA</i> (macrolídeo)	ere(A)-F ere(A)-R	GCCGGTGCTCATGAACTTGAG CGACTCTATTGATCAGAGGC	419	59	VAN <i>et al.</i> , 2008
<i>catI</i> (anfenicol)	CATIF CATIR	AGTTGCTCAATGTACCTATAACC TTGTAATTCATTAAGCATTCTGCC	547	58	VAN <i>et al.</i> , 2008
<i>cmlA</i> (anfenicol)	cmlA-F cmlA-R	CCGCCACGGTGTTGTTGTTATC CACCTTGCTGCCCATCATTAG	698	58	VAN <i>et al.</i> , 2008
<i>sull</i> (sulfonamida)	sull-F sull-R	TTCGGCATTCTGAATCTCAC ATGATCTAACCTCGGTCTC	822	53	VAN <i>et al.</i> , 2008
<i>blaSHV</i> (β-lactâmico)	blaSHV-F blaSHV-R	TCGCCTGTGATTATCTCCC CGCAGATAAATCACCACAATG	768	51	VAN <i>et al.</i> , 2008

ampC (β-lactâmico)	AmpC-For AmpC-Rev	TTCTATCAAMACTGGCARCC CCYTTTTATGTACCCAYGA	550	49	SCHWARTZ <i>et al.</i> , 2003
aac(3)-I (aminoglicosídeo)	aac(3)-I-F aac(3)-I-R	ACCTACTCCCAACATCAGCC ATATAGATCTCACTACGCGC	157	54	VAN <i>et al.</i> , 2008

3.9. Pesquisa de genes de virulência

Foram pesquisados 12 marcadores de virulência, selecionados de acordo com a capacidade de provocar lesões no organismo hospedeiro (CAPRIOLI *et al.*, 2005; KAPER *et al.*, 2004). Utilizou-se o PCR de colônia nos isolados, as reações foram realizadas em termociclador (MyCycler BioRad®) e tinham volume final de 25µl, as temperaturas de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados estão descritas no Quadro 03.

Quadro 03. Oligonucleotídeos utilizados para detecção de genes de virulência e sorotipos em isolados de *Escherichia coli*.

Gene	Primer	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Tamanho (pb)	Temperatura de anelamento (°C)	Referências
<i>Tir α</i>	B139	CRCKCCAYTACCTTCACA*	781	54,2	China <i>et al.</i> , 1999
	B152	CGCTAACCTCCAAACCATT			
<i>Tir β</i>	B139	CRCKCCAYTACCTTCACA*	342	53,4	China <i>et al.</i> , 1999
	B140	TGTATGTCGCACTCTGATT			
<i>Tir γ</i>	B139	CRCKCCAYTACCTTCACA*	560	54,7	China <i>et al.</i> , 1999
	B141	GTCGGCAGTTTCAGTTTCAC			

<i>Stx1</i>	stx1F	AGAGCGATGTTACGGTTTG	388	50	China <i>et al.</i> , 1996
	stx1R	TTGCCCCAGAGTGGATG			
<i>Stx2</i>	stx2F	TGGGTTTTCTTCGGTATC	807	45	China <i>et al.</i> , 1996
	stx2R	GACATTCTGGTTGACTCTCTT			
<i>Eae</i>	eaeAF	AGGCTTCGTCACAGTTG	570	48	China <i>et al.</i> , 1996
	eaeAR	CCATCGTCACCAGAGGA			
<i>hlyA</i>	hlyAF	GCATCATCAAGCGTACGTTCC	534	57	Paton & Paton, 1998
	hlyAR	AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT			
<i>Saa</i>	SAADF	CGTGATGAACAGGCTATTGC	119	55	Paton & Paton, 2002
	SAADR	ATGGACATGCCTGTGGCAAC			
<i>EspP</i>	<i>esp-A</i>	AAACAGCAGGCACTTGAACG	1830	56	Brunner <i>et al.</i> , 1999
	<i>esp-B</i>	GGAGTCGTCAGTCAGTAGAT			
O111	O111F	TAGAGAAATTATCAAGTTAGTTCC	406	60	Paton & Paton, 1998
	O111R	ATAGTTATGAACATCTTGTTTAGC			
O113	O113F	AGCGTTTCTGACATATGGAGTG	593	60	Paton & Paton, 1999
	O113R	GTGTTAGTATCAAAAGAGGCTCC			
O157	O157F	CGGACATCCATGTGATATGR-G	259	60	Paton & Paton, 1998
	O157S	TTGCCTATGTACAGCTAATCC			

*R= A+G, K= T+G, Y= C+T, M= A+C. (China *et al.*, 1999)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Pesquisa e isolamento de *Escherichia coli* em abatedouros frigoríficos de suínos localizados no Distrito Federal

Foram detectados 21 (47,72%) isolados de *Escherichia coli* do total dos 44 swabs pesquisados em instalações e equipamentos nos abatedouros frigoríficos A e B de suínos, sendo que 9 isolados foram obtidos do abatedouro frigorífico A, e 12 isolados do B, entre os períodos de 2019 e 2021. Os pontos/ locais de detecção de cada isolado de *Escherichia coli*, bem como o total de isolados por ponto/ local das coletas estão descritos na Tabela 01.

Tabela 01. Pontos ou locais de detecção de *Escherichia coli* em ambiente, equipamentos e utensílios dos abatedouros frigoríficos de suínos A e B localizados na região do Distrito Federal.

Ponto/ local do abatedouro frigorífico de suínos de detecção de <i>Escherichia coli</i>	Coleta 1 Abatedouro frigorífico de suínos A	Coleta 2 Abatedouro frigorífico de suínos A	Coleta 1 Abatedouro frigorífico de suínos B	Coleta 2 Abatedouro frigorífico de suínos B	Total de isolados
Chute de vísceras	1	0	0	0	1
Ralo área suja	1	0	1	0	2
Faca de sangria	0	1	1	0	2
Ralo área limpa	0	1	1	0	2
Mesa de vísceras	1	0	1	0	2
Depiladeira	1	1	0	0	2
Mesa de toalete	0	0	1	1	2
Serra de carcaça	0	0	1	1	2
Parede área limpa	0	0	1	0	1
Piso câmara de resfriamento	1	0	1	1	3
Parede câmara de resfriamento	0	1	1	0	2
Total de swabs	5	4	9	3	21

O local com o maior número de detecções foi o piso da câmara de resfriamento de carcaças, onde o microrganismo foi isolado em 3 (75%) das 4 coletas, sendo 1 isolado detectado na coleta 1 do abatedouro A, e 2 isolados detectados nas coletas 1 e 2 do abatedouro frigorífico B. Os locais com menores números de detecções foram o chute de vísceras e a parede da área limpa da sala de abate, em que ambos apresentaram apenas 1 isolado em 4 coletas (25%), sendo o isolado do chute de vísceras detectado na coleta 1 do abatedouro frigorífico A, e o da parede da área limpa da sala de abate detectado na coleta 1 do abatedouro frigorífico B. Em relação à ausência do isolamento do microrganismo, verificou-se que no abatedouro frigorífico A não foram detectados *E. coli* na mesa de toailete, na serra de carcaça e na parede da área limpa da sala de abate, em nenhuma das duas coletas realizadas. Já no abatedouro frigorífico B não foi detectado o microrganismo no chute de vísceras e na depiladeira nas duas coletas realizadas.

Os resultados de isolamento de *Escherichia coli* verificados neste estudo são similares aos observados por Egbule *et al.* (2020) em abatedouros frigoríficos de suínos na Nigéria, no qual os autores detectaram o microrganismo em pisos, mesas e facas. No Canadá, Namvar & Warriner (2006) também obtiveram resultados semelhantes aos observados neste estudo, em que a presença de *E. coli* foi confirmada nos pisos de um abatedouro frigorífico de suínos, em duas coletas com swabs-esponja realizadas em datas diferentes. Tal qual neste estudo, Egbule *et al.* (2020) e Namvar & Warriner (2006) também detectaram o microrganismo em mesa de vísceras, pisos de câmara de resfriamento de carcaças, faca de sangria e mesa de toailete, e Rivas *et al.* (2000) isolaram *Escherichia coli* nas depiladeiras em duas das coletas realizadas em abatedouro frigorífico de suínos, localizados na cidade de Salamanca, na Espanha.

A detecção do microrganismo nas duas coletas 1 e 2, para o frigorífico A na depiladeira, na mesa de toailete, serra de carcaça e piso da câmara de resfriamento de carcaças para o frigorífico B, em ambas coletas sugerem a permanência e distribuição da bactéria na linha de abate, corroborando com resultados verificados por Egbule e colaboradores em 2020, e por Namvar & Warriner em 2006.

Não há estudos de detecção de *E. coli* em ambiente, equipamentos e utensílios em abatedouros frigoríficos de suínos no Brasil, visto que a maioria dos trabalhos realizados foram sobre a contaminação de carcaças suínas. No entanto, alguns autores avaliaram a presença de enterobactérias em equipamentos e utensílios, tal como Santos & Ferreira (2017) que as detectaram em facas de abatedouro frigorífico de suínos localizado em Minas Gerais, o que corrobora com os resultados desta pesquisa, porque o microrganismo *E. coli* pertence à família *Enterobacteriaceae*. Barreto (2017) também avaliou a presença de enterobactérias em uma planta de abate de suínos na região paranaense, onde os microrganismos foram isolados nas facas, na serra de carcaça e em mesas, também corroborando com os achados deste estudo em relação ao isolamento do microrganismo pertencente à mesma família.

De uma maneira geral a presença de *E. coli* no ambiente de abatedouro frigorífico de suínos verificados neste estudo podem indicar falhas no processo de higienização, tal como sugerido por Rivas *et al.* (2000). Ainda, o repetido isolamento nos mesmos locais podem sugerir a presença de biofilmes, tal como proposto por Namvar & Warriner (2006). Já em relação aos achados de detecção da bactéria, uma única vez nos abatedouros frigoríficos A e B pode ser indicativo de contaminação cruzada, tais como verificados por Santos & Ferreira (2017) e Barreto (2017).

A presença de *E. coli* nas depiladeiras verificadas neste estudo pode ser em decorrência da presença de microrganismos nas cerdas dos suínos que, após o abate, são direcionados às depiladeiras e contaminam a água e as lâminas do equipamento, como sugerido por Rivas *et al.* (2000), ou ainda em decorrência de falhas de higienização do equipamento. Não existe nenhum estudo de verificação da presença deste microrganismo, neste tipo de indústria, na região do Distrito Federal e Goiás sendo este o primeiro a avaliar a presença do microrganismo em locais ou pontos de ambiente, equipamentos e utensílios.

4.2. Pesquisa e isolamento de *Salmonella* spp. em abatedouros frigoríficos de suínos localizados no Distrito Federal

Foi detectado apenas 01 (2,27%) isolado de *Salmonella* spp. do total dos 44 swabs pesquisados nas instalações e equipamentos dos abatedouros frigoríficos A e B de suínos. O isolado foi obtido na segunda coleta realizada no abatedouro frigorífico A, sendo detectado na câmara de resfriamento de carcaças.

Além do isolamento e identificação microbiológica, foi realizada a confirmação do gênero (fragmento de 204bp) e identificado o sorotipo Typhi (fragmento de 738bp) pela reação em cadeia da polimerase (PCR), conforme demonstrado na Figura 1.

Tal qual neste estudo, o microrganismo foi verificado em países como a Bélgica, em que Botteldoorn *et al.* (2003) detectaram a sua presença em facas, em serra de carcaça, e em carcaças de suínos presentes no interior da câmara de resfriamento. O microrganismo também foi isolado em ambientes, equipamentos e utensílios de abatedouros frigoríficos de suínos em outros países europeus, tais como na Itália (PIRAS *et al.*, 2014), Bélgica (BOTTELDOORN *et al.*, 2003) e Holanda (SWANERBURG *et al.*, 2001), sendo pontos frequentes de contaminação a serra de carcaça e as facas utilizadas na indústria.



Figura 1. Confirmação por PCR de *Salmonella* Typhi isolada do abatedouro frigorífico A localizado na região do Distrito Federal. 1) marcador 100bp (Invitrogen ®), 2) controle negativo, 3) controle positivo para *Salmonella* spp., fragmento 204 bp (primer ompC), 4) fragmento 204 bp (primer ompC) para *Salmonella* spp. e 738 bp (primer viaB) para sorotipo Typhi. Visualização em gel de agarose 2% corado com 0,5 µg/ml, em transiluminador de luz

ultravioleta (Major Science®)

No Brasil há descrição de isolamentos de *Salmonella* spp. em ambiente de abatedouro frigorífico de suínos no Estado de Minas Gerais (VIANA *et al.*, 2019), no Rio Grande do Sul (VIVIAN *et al.*, 2021) e no Rio de Janeiro (LÁZARO *et al.*, 2004), nos quais os autores verificaram a presença deste microrganismo em ralos, serra de carcaça, facas, chute de vísceras e mesa de evisceração, o que corrobora os achados deste estudo. O resultado de isolamento de *Salmonella* em câmara de resfriamento de carcaças de suínos é o primeiro da região do Distrito Federal e Entorno.

A presença de *Salmonella* spp. na câmara de resfriamento de carcaças, verificada neste estudo, pode estar relacionada à contaminação cruzada durante o processo de abate e refrigeração das carcaças, e também às falhas relacionadas aos procedimentos de higienização, tal qual Botteldoorn *et al.* (2003) discorrem sobre a dificuldade de afirmar a origem do local de contaminação, pois podem variar dependendo da quantidade de animais abatidos diariamente no estabelecimento, da procedência da granja de origem dos suínos que serão abatidos, das falhas nos procedimentos de higiene operacional (PPHO) e até falhas no treinamento dos funcionários. A detecção de *Salmonella* Typhi no abatedouro verificado neste estudo é relevante, devido à possibilidade de contaminação cruzada das carcaças que são armazenadas na câmara de resfriamento, ainda vai de encontro a Instrução Normativa 79 (BRASIL, 2018) que fomenta a importância dessa análise ao aprovar procedimentos de inspeção ante e post mortem de suínos com base em risco.

4.3. Pesquisa e isolamento de *Listeria monocytogenes*. em abatedouros frigoríficos de suínos localizados no Distrito Federal

Não houve isolamento de *Listeria monocytogenes* em nenhum dos pontos ou locais analisados neste estudo. Este resultado diverge dos observados por outros autores, tais como Lariviere-Gauthier *et al.* (2014) que detectaram *L. monocytogenes* nos ambientes da sala de abate, sala de evisceração e câmara de

resfriamento em abatedouros frigoríficos de suínos na província de Québec, no Canadá. Na Finlândia, Autio *et al.* (2000) isolaram o microrganismo em serras de carcaça, chutes e mesas oriundos de abatedouros de suínos. Na Itália, Morganti *et al.* (2016) e Meloni *et al.* (2013) encontraram a bactéria em depiladeira, facas, serras de carcaças, chutes e pisos. Já Sala *et al.* (2016) a detectaram em ralos e na câmara de resfriamento de abatedouro de suínos na Romênia.

No Brasil, o resultado de não isolamento do microrganismo verificado neste estudo também diverge dos observados por Moreno *et al.* (2014) que isolaram o microrganismo no piso do abatedouro frigorífico de suíno em São Paulo, e de Sereno *et al.* (2019) que isolaram *Listeria monocytogenes* em pisos, chutes e facas de uma planta de abate de suínos no Paraná.

Uma possível hipótese para a não detecção deste microrganismo seria a realização correta dos procedimentos de higienização operacional dos abatedouros frigoríficos, que pode ter sido favorecido pelo porte médio das indústrias que participaram deste estudo, pois permite um melhor controle dos procedimentos de higienização diária.

A não detecção de *L. monocytogenes* também pode ter ocorrido devido ao restrito número de amostras coletadas, tendo em vista a resistência das indústrias em aceitarem a participar desta pesquisa.

Ainda assim, é importante ressaltar que a não detecção de *Listeria monocytogenes* não assegura a sua ausência nos abatedouros frigoríficos no Distrito Federal, pois o microrganismo apresenta característica cosmopolita (RAHEEM, 2016; VALLIM *et al.*, 2015), e também por existirem relatos de detecção da mesma em cortes cárneos bovinos e em ambiente de abatedouros frigoríficos de bovinos no Distrito Federal (PALMA *et al.*, 2016), além disso, esse microrganismo também foi detectado em carne homogeneizada bovina e salsicha tipo *hot dog* comercializadas nesta mesma região (ANDRADE *et al.*, 2014).

4.4. Antibiograma e detecção de genes de resistência antimicrobiana dos isolados de *Escherichia coli*

Os vinte e um (21) isolados de *E. coli* apresentaram resistência ou sensibilidade intermediária para 12 dos 13 antimicrobianos testados, sendo que 20

(95,2%) isolados foram resistentes à ampicilina e cloranfenicol, 18 (85,8%) isolados à amoxicilina, 17 (80,95%) isolados apresentaram resistência à estreptomicina e tetraciclina, 13 (61,9%) isolados foram resistentes à sulfonamida, 12 (57,15%) isolados resistentes ao ácido nalidíxico e doxiciclina, 11 (52,4%) isolados à cefazolina, 7 (33,3%) isolados à ciprofloxacina, 5 (23,8%) isolados resistentes à gentamicina e 2 (9,52%) isolado apresentou resistência à colistina. Quanto a sensibilidade intermediária aos antimicrobianos, houve 6 (28,6%) isolados com sensibilidade intermediária à ciprofloxacina, 4 (19,05 %) isolados à estreptomicina, 2 (9,52%) isolados ao ácido nalidíxico e 1 (4,8%) isolado ao cloranfenicol, cefazolina e gentamicina. Nenhum dos 21 isolados testados foi resistente à ceftadizma, Tabela 02.

Tabela 02. Resultado dos antibiogramas de disco de difusão, dos 21 isolados de *Escherichia coli*, provenientes de ambiente de abatedouros frigoríficos de suínos A e B localizados na região do Distrito Federal.

Base Antimicrobiana	Número de isolados resistentes (%)	Número de isolados com sensibilidade intermediária (%)	Número de isolados sensíveis (%)	Total isolados resistentes ou intermediários (%)
Ác. Nalidixico (NAL)	12 (57,15%)	2 (9,52%)	7 (33,33%)	14 (66,7%)
Amoxicilina (AMO)	18 (85,8%)	0 (0%)	3 (14,2%)	18 (85,8%)
Ampicilina (AMP)	20 (95,2%)	0 (0%)	1 (4,8%)	20 (100%)
Cefazolina (CFZ)	11 (52,4%)	1 (4,8%)	9 (42,8%)	12 (57,15%)
Ceftazidima (CAZ)	0 (0%)	0 (0%)	21 (100%)	0 (0%)
Colistina (COL)	2 (9,52%)	0 (0%)	19 (90,48%)	2 (9,52%)
Ciprofloxacina (CIP)	7 (33,3%)	6 (28,6%)	8 (38,1%)	13 (61,9%)
Cloranfenicol (CLO)	20 (95,2%)	1 (4,8%)	0 (0,0%)	21 (100%)

Doxiciclina (DOX)	12 (57,15%)	2 (9,52%)	7 (33,33%)	14 (66,7%)
Estreptomicina (EST)	17 (80,95%)	4 (19,05 %)	0 (0%)	21 (100%)
Gentamicina (GEN)	5 (23,8%)	1 (4,8%)	15 (71,4%)	6 (28,6%)
Tetraciclina (TET)	17 (80,95%)	0 (0%)	4 (19,05%)	17 (80,95%)
Sulfonamida (SUL)	13 (61,9%)	0 (0%)	8 (38,1%)	13 (61,9%)

Os resultados individuais dos isolados de *Escherichia coli* dos antibiogramas por disco de difusão, de detecção dos genes de resistência antimicrobiana pesquisados, bem como o local ou ponto de detecção do isolado nos ambientes dos abatedouros frigoríficos A e B encontram-se descritos na Tabela 03, tendo os diâmetros dos halos das zonas de inibição medidos e interpretados segundo os parâmetros do CLSI (2020), com exceção dos padrões para colistina, na qual foi utilizado o padrão definido pelo European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2021).

Tabela 03. Resultado individual dos 21 isolados de *E. coli* dos antibiogramas por disco de difusão, de detecção de genes de resistência antimicrobiana e de genes de virulência, e os locais onde cada um foi identificado nos abatedouros frigoríficos de suínos A e B, localizados na região do Distrito Federal.

isolados de <i>E. coli</i>	Abatedouro frigorífico de suínos	Ponto/ local de coleta	Antibiogramados isolados resistentes	Antibiogramados isolados com resistência intermediária	Antibiograma dos isolados sensíveis	Genes de resistência	Genes de virulência
1	A	Chute de vísceras	NAL AMO AMP CFZ CLO EST TET	-	CAZ CIP COL DOX GEN SUL	ampC tet(A) sulI	hlyA tir β stx-1
2	A	Ralo área suja	NAL AMO AMP CLO DOX EST TET SUL	CFZ	CAZ CIP COL GEN	-	eae hlyA tir α tir β

5	A	Mesa de vísceras	AMO AMP CFZ CLO DOX TET SUL	EST NAL	CAZ CIP COL GEN	clmA	Stx-1 tir-β
6	A	Depiladeira	NAL AMO AMP CFZ CLO DOX TET SUL	CIP EST	CAZ COL GEN	ampC tet(A)	tir α tir γ
10	A	Piso câmara de resfriamento	NAL AMO AMP CFZ CIP CLO DOX EST GEN TET SUL	-	CAZ COL	MCR-3 tet(A)	tir α
14	A	Faca de sangria	NAL AMO AMP CIP CLO DOX EST TET SUL	-	CFZ CAZ COL GEN	tet(A) tet(B) sulI	-
15	A	Ralo área limpa	NAL AMO AMP CFZ CIP CLO COL DOX EST GEN TET SUL	-	CAZ	MCR-1 MCR-3 tet(B)	tir α
17	A	Depiladeira	NAL AMO AMP CFZ CIP CLO DOX EST GEN TET SUL	-	CAZ COL	tet(A)	saa
22	A	Parede câmara de resfriamento	AMO AMP CFZ DOX EST TET	NAL CIP CLO	CAZ COL GEN SUL	-	tir α tir β tir γ
24	B	Ralo da área suja	AMO AMP CFZ CIP CLO EST TET SUL	DOX	NAL CAZ COL GEN	-	-
25	B	Faca de sangria	CLO EST TET	DOX	NAL AMO AMP CAZ CFZ CIP COL GEN SUL	-	stx-1
26	B	Ralo área limpa	NAL AMO AMP CIP CLO DOX EST GEN TET SUL	-	CFZ CAZ COL	-	-
27	B	Mesa de vísceras	NAL AMO AMP CLO COL EST TET SUL	-	CFZ CAZ CIP DOX GEN	-	-
29	B	Mesa de toalete	AMO AMP CLO EST TET SUL	-	NAL CFZ CAZ CIP COL DOX GEN	-	-

30	B	Serra de carcaça	AMO AMP CLO EST TET	CIP	NAL CFZ CAZ COL DOX GEN SUL	-	-
31	B	Parede área suja	NAL AMO AMP CLO DOX	CIP EST	CFZ CAZ COL GEN TET SUL	-	Stx-1
32	B	Piso câmara de resfriamento	AMP CFZ CLO EST	-	NAL AMO CAZ CIP COL DOX GEN TET SUL	cat1	Stx-1
33	B	Parede câmara de resfriamento	AMP CFZ CLO	EST	NAL AMO CAZ CIP COL DOX GEN TET SUL	ampC blaSHV	-
40	B	Mesa de toalete	NAL AMO AMP CFZ CLO EST	CIP GEN	CAZ COL DOX TET SUL	tet(B)	tir γ
41	B	Serra de carcaça	NAL AMO AMP CIP CLO DOX EST GEN TET SUL	-	CFZ CAZ COL	ampC tet(B)	tir β
43	B	Piso câmara de resfriamento	AMO AMP CLO DOX EST TET	CIP	NAL CFZ CAZ COL GEN SUL	ampC	-

* Nos isolados onde nenhum gene foi identificado, considerar apenas os genes de resistência e genes virulência pesquisados pelos primers utilizados neste estudo.

Em relação à pesquisa de resistência antimicrobiana realizada neste estudo, os resultados encontrados são semelhantes aos demonstrados por Egbule *et al.* (2020), que detectaram cepas de *E. coli* resistentes à ciprofloxacina e gentamicina em isolados provenientes de ambientes e equipamentos de abatedouro de suínos na Nigéria. No entanto divergem em relação à detecção de sensibilidade à ceftazidima verificada neste estudo.

Os resultados encontrados por Li *et al.* (2016) também são similares aos deste estudo no que se refere à resistência antimicrobiana, em que os autores detectaram estirpes resistentes à tetraciclina, ampicilina, gentamicina, ciprofloxacina e cloranfenicol, no entanto a fonte dos isolados de *E. coli* foram provenientes de carcaças de suínos após a lavagem em abatedouro frigorífico na China. Apesar dos

isolados não serem detectados do ambiente de abatedouros frigoríficos de suínos, tal qual neste estudo, pode-se considerar que as carcaças de suínos são uma potencial fonte de contaminação para ambientes, utensílios e equipamentos utilizados nas indústrias. Do mesmo modo, os resultados apresentados na Alemanha por Schwaiger *et al.* (2012) corroboram aos encontrados neste estudo, pois os autores detectaram cepas resistentes à amoxicilina, ampicilina, gentamicina, estreptomicina, colistina e doxiciclina, no entanto os isolados também foram oriundos de carcaças suínas.

No Brasil não existem pesquisas que caracterizem o perfil de resistência da bactéria *Escherichia coli* em ambiente de abatedouros frigoríficos de suínos, no entanto existem amplas pesquisas que promovem a caracterização desse microrganismo em carcaças de suínos. Desta forma, os resultados de resistência encontrados por Franco e colaboradores (2010) em cepas de *E. coli* oriundas de carcaças suínas do Rio de Janeiro, Minas Gerais, Paraná e Santa Catarina foram similares aos deste estudo, pois também apresentaram resistência à ampicilina, ceftadizima, ciprofloxacina, tetraciclina e cloranfenicol. Os resultados encontrados por Pissetti *et al.* (2016) no Rio Grande do Sul são similares os deste estudo, pois os autores detectaram em carcaças suínas estirpes resistentes ao ácido nalidíxico, ampicilina, ceftadizima, gentamicina, sulfonamida e tetraciclina.

Na região do Distrito Federal não há estudos em relação à verificação de resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* advinda de ambientes, equipamentos e utensílios de abatedouros frigoríficos de suínos ou em carcaças suínas. A existência de isolados resistentes a múltiplos antimicrobianos, tais como os observados nos isolados 10, 15 e 17 em que se constatou a resistência ao ácido nalidíxico, amoxicilina, ampicilina, cefazolina, ciprofloxacina, cloranfenicol, doxiciclina, estreptomicina, gentamicina, tetraciclina e sulfonamida, é uma preocupação para a saúde pública, pois podem sugerir o uso indiscriminado de antibióticos para tratamento, prevenção de doenças ou como promotores de crescimento Barlaam *et al.* (2019), e podem ocasionar o surgimento de bactérias resistentes em animais de produção, sua disseminação no meio ambiente ou resíduos em produtos de origem animal que são consumidos pela população, tal como relatado por Barlaam *et al.* (2019) e Pacheco-Silva *et al.* (2014).

A resistência de 95,2% (20/21) dos isolados ao cloranfenicol observados neste estudo é importante, pois trata-se de um antibiótico de amplo espectro com uso proibido no Brasil desde 2003, pela IN 09 de 2003 (BRASIL, 2003). A presença dessas estirpes resistentes pode ser explicada pela manutenção dos genes de resistência por meio de cosseleção com outros genes de resistência e genes de virulência, muitas vezes ligados em elementos genéticos transmissíveis/ móveis, tal qual sugerido por Rosengren *et al.* (2009), porém mais estudos devem ser realizados para verificar as possíveis origens dessa resistência antimicrobiana verificada nos isolados desta pesquisa. A detecção dos genes de resistência *cat 1* e *clmA* confirmam ainda a presença de resistência ao cloranfenicol observada no antibiograma de disco de difusão deste trabalho.

A resistência ao cloranfenicol anos após a proibição do uso na alimentação animal também foi constatada por Bischoff *et al.* (2006) nos Estados Unidos, onde esse antimicrobiano foi banido na década de 80, os autores detectaram que 53% das cepas de *E. coli* de suínos diarreicos apresentavam resistência a este antimicrobiano e presença do gene de *clmA*. Segundo os autores a explicação para essa persistência seria a localização do gene de resistência *clmA* em integrons de classe 1, permitindo a transferência por conjugação, visto que estão ligados a outros genes que codificam a resistência a antimicrobianos que atualmente são permitidos para uso em rações, o que pode explicar a resistência verificada neste estudo. No Japão, Harada *et al.* (2006) corroboram essa informação ao demonstrarem que os genes *clmA* e *cat1* estão envolvidos na corresistência, contribuindo para a seleção de cepas resistentes ao cloranfenicol, permitindo que esta persista apesar do seu banimento na alimentação de suínos, o que também pode explicar a presença da resistência verificada neste estudo.

Foi detectado no isolado 15 resistência à colistina, e foi verificado também a presença dos genes de resistência *MCR-1* e *MCR-3*, indicando resistência à classe das polimixinas. A Organização Mundial da Saúde classificou as polimixinas como antimicrobianos de importância crítica e de maior prioridade (WHO, 2018), sendo assim, esse resultado é preocupante para a saúde pública, pois já foi demonstrado em outros estudos (BARLAAM *et al.*, 2019; BERGLUND, 2019; LI *et al.*, 2019) que o crescente uso deste antimicrobiano no tratamento de infecções graves em humanos e a presença dos genes de resistência *MCR* conferem resistência

transmissível e propagação de microrganismos resistentes através da cadeia alimentar.

Em relação à presença de sensibilidade a determinado antimicrobiano e detecção de genes de resistência antimicrobiana, houve isolados de *Escherichia coli* que apresentaram genes de resistência e sensibilidade ao mesmo antimicrobiano. O isolado 1 apresentou gene de resistência *sul1* e sensibilidade à sulfonamida, o isolado 10 foi sensível à colistina e apresentou gene de resistência *MCR-3*, já o isolado 40 foi sensível à tetraciclina e doxiciclina, e detectou-se o gene de resistência *tet(B)*, tal fato pode explicado pela não expressão do gene presente em seu DNA bacteriano ou no plasmidial, tal como demonstrado por Amer *et al.* (2018).

4.5. Antibiograma e detecção de genes de resistência antimicrobiana do isolado de *Salmonella* spp.

O isolado de *Salmonella* Typhi apresentou resistência a 8 dos 13 antimicrobianos testados, sendo eles o ácido nalidíxico, cefazolina, cloranfenicol, doxiciclina, estreptomicina, gentamicina, tetraciclina e sulfonamida. O isolado foi suscetível à amoxicilina, ampicilina, ciprofloxacina, ceftazidima e colistina. Não houve detecção de resistência intermediária a nenhum dos fármacos pesquisados.

Na pesquisa dos genes de resistência a antimicrobianos foram detectados os genes *ampC*, correspondente aos β -lactâmicos, e os genes *tet(B)*, *tet(C)* e *tet(M)*, correspondentes às tetraciclinas. A resistência a tetraciclina e doxiciclina no teste de disco difusão foi confirmada pela presença dos genes *tet(B)*, *tet(C)* e *tet(M)*.

Em relação à presença de sensibilidade a determinado antimicrobiano e detecção de genes de resistência antimicrobiana, o isolado de *Salmonella* spp. apresentou o gene de resistência *ampC* (β -lactâmico), sensibilidade à ampicilina (β -lactâmico), Tabela 04.

O isolado também apresentou resistência a alguns antimicrobianos, porém não foram detectados genes de resistência a esses mesmos fármacos, são eles: cloranfenicol (anfencóis) e seus respectivos genes de resistência *cat1* e *clmA*, estreptomicina e gentamicina (aminoglicosídeos) e o gene *aac(3)-I*, e sulfonamidas e o gene de resistência *sul1*.

Não foram detectados genes de resistência às polimixinas (*MCR-1*, *MCR-2*, *MCR-3* e *MCR-4*), aos macrolídeos (*ermA*, *ermB*, *ermC* e *ereA*), às sulfonamidas (*sul1*), aos aminoglicosídeos (*aac(3)-I*) e aos anfenicóis (*cat1* e *clmA*).

Tabela 04. Resultados do antibiograma por disco de difusão e das detecções de genes de resistência antimicrobiana do isolado de *Salmonella* spp., e do local de isolamento no abatedouro frigorífico de suínos A, localizado na região do Distrito Federal.

Identificação do isolado de <i>Salmonella</i>	Identificação do abatedouro frigorífico de suínos	Local de coleta	AntibiogramaR esistência	Antibiograma Sensibilidade	Genes de resistência detectados
21	A	Piso da câmara de resfriamento	CFZ	AMP	<i>ampC</i>
			NAL	AMO	-
			CLO	CIP	-
			SUL	CAZ	-
			EST	COL	-
			GEN	-	-
			TET DOX	-	<i>tet(B) tet(C) tet(M)</i>

Os resultados encontrados no isolado de *Salmonella* spp. deste estudo foram similares aos encontrados por Bridier *et al.* (2019) na França, em que isolados de *Salmonella* spp., provenientes de equipamentos e ambiente de abatedouro frigorífico de suínos, foram resistentes ao cloranfenicol e à tetraciclina. No entanto, divergem em relação à sensibilidade à ampicilina verificada neste isolado.

Chen *et al.* (2019) também apresentaram resultados semelhantes ao deste estudo, em que foi detectada resistência à tetraciclina e doxiciclina em isolados de *Salmonella* spp. oriundas de ambientes, facas e mesas de abatedouros de suínos na China, porém houve divergência na resistência à ampicilina.

No Brasil, Lázaro *et al.* (2004) encontraram cepas de *Salmonella* resistentes à estreptomicina, sulfonamida e tetraciclina em equipamentos de abatedouro de suínos do estado do Rio de Janeiro, tal qual ocorreu neste estudo. A pesquisa conduzida por Lopes *et al.* (2016) em ambientes de abatedouros de suínos do município de Porto Alegre também apresentou resultados semelhantes ao deste estudo, visto que as cepas de *Salmonella* spp. apresentaram resistência ao

cloranfenicol, estreptomicina, sulfonamida e tetraciclina, todavia houve divergência na resistência à ampicilina. Assim como ocorreu neste estudo, os autores também detectaram os genes de resistência à tetraciclina, *tet(A)* e *tet(B)*, mas houve diferença em relação a detecção dos genes de *cat1* (cloranfenicol) e *sul1* (sulfonamida), os quais não foram detectados neste estudo.

Os resultados encontrados em Santa Catarina por Kich *et al.* (2011) também corroboram os desta pesquisa, em que isolados de *Salmonella* spp. provenientes de ambiente e carcaças de suínos apresentaram resistência ao ácido nalidíxico, tetraciclina, gentamicina, estreptomicina, cloranfenicol. Entretanto, houve divergência em relação à detecção de sensibilidade à ampicilina e de resistência à ciprofloxacina e amoxicilina.

Na região do Distrito Federal não há estudos em relação à verificação de resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp. oriunda de ambientes, equipamentos e utensílios de abatedouros frigoríficos de suínos ou em carcaças suínas, sendo este o primeiro relato.

Em relação a resistência ao cloranfenicol, o isolado de *Salmonella* spp. foi sensível ao antimicrobiano no teste de disco difusão, entretanto não foi detectado nenhum dos genes de resistência ao cloranfenicol pesquisados neste estudo (*ampC* e *cat1*). Assim como ocorreu nos isolados de *Escherichia coli* deste estudo, a resistência do isolado de *Salmonella* spp. ao cloranfenicol é relevante para a saúde pública, pois trata-se de um antimicrobiano banido da alimentação animal desde 2003 (BRASIL, 2003) que atualmente apresenta resistência em isolados bacterianos, tal fato é preocupante porque alimentos de origem animal contaminados por patógenos resistentes podem ser distribuídos por grandes áreas geográficas, ocasionando um aumento da resistência a antimicrobianos na população que consome esses produtos (DOWLING *et al.*, 2013).

Resultados semelhantes foram encontrados em abatedouros de suínos na China por Wu *et al.* (2021), onde isolados de *Salmonella* de ambientes e carcaças de suínos apresentaram resistência ao cloranfenicol. Na Bélgica, Botteldoorn *et al.* (2020) detectaram o microrganismo resistente ao cloranfenicol em ambientes e utensílios de abatedouros de suínos e carcaças de suínos, assim ocorreu neste estudo. No Rio Grande do Sul também houve resultados similares, foi detectada

Salmonella spp. resistente ao cloranfenicol em ambientes, utensílios e carcaças de frigoríficos de suínos (QUADROS *et al.*, 2020).

Assim como descrito anteriormente, a sensibilidade do isolado à ampicilina (β -lactâmico) e a detecção do gene de resistência *ampC* (β -lactâmico) pode ser justificada pela não expressão do gene presente em seu DNA bacteriano ou no plasmidial, tal como demonstrado por McMillan *et al.* (2019).

No que se refere a resistência à algumas drogas antimicrobianas no antibiograma de disco de difusão, e não detecção dos genes de resistência a esses mesmos fármacos (anfencóis, aminoglicosídeos e sulfonamidas), tal ocorrido pode ser explicado pela presença de resistência cruzada (PÉRICHON *et al.*, 2019; LÓPEZ & OLVERA, 2000) ou pela presença de genes de resistência que não foram pesquisados neste estudo, tais como *sul2*, *sul3* e *floR* (LOPES *et al.*, 2016).

4.6. Genes de virulência em isolados de *Escherichia coli*

Foram detectados 7 dos 9 genes de virulência pesquisados neste estudo. Um total de 13 (61,9%) dos 21 isolados de *Escherichia coli* apresentaram ao menos 1 gene de virulência, sendo que cinco (23,8%) isolados o gene *tir* α , cinco (23,8%) isolados o gene *tir* β , cinco (23,8%) isolados de *E. coli* apresentaram o gene *stx-1*, três (14,2%) isolados o gene *tir* γ , 3 (14,2%) isolados o gene *hlyA*, um (4,8%) isolado o gene de virulência *eae* e um (4,8%) isolado o gene *saa*. Os resultados individuais dos isolados da presença dos genes de virulência, bem como do local de detecção na indústria, juntamente com os resultados dos antibiogramas e de detecção de genes de resistência antimicrobiana encontram-se na Tabela 03. Não houve detecção do gene de virulência *stx-2* e *esp*.

Em relação aos sorotipos pesquisados neste estudo, dois (9,5%) isolados apresentaram o sorotipo O157 (isolados 15 e 22). Não foram detectados os sorotipos O111 e O113 neste trabalho.

O isolado 2 de *Escherichia coli* apresentou o maior número de genes de virulência, foram detectados os genes *hlyA*, *eae*, *tir* α e *tir* β , associados ao perfil do antibiograma de resistência ao ácido nalidixico, amoxicilina, ampicilina, cloranfenicol, doxiciclina, estreptomocina, tetraciclina e sulfonamida. Esses achados implicam ao isolado importância, tendo em vista os riscos para a saúde pública

ocasionados pela presença desses genes. O gene *hlyA* codifica a exotoxina alfa-hemolisina e está relacionado a infecções clínicas em humanos, tais como pielonefrite e septicemias (MAY *et al.*, 2000), os genes de virulência *eae* e *tir* podem ser relacionados às cepas de *E. coli* enteropatogênicas (EPEC), visto que o gene *eae* codifica o fator de aderência intimina, e o *tir* é um receptor de intimina, permitindo a ocorrência do mecanismo da patogênese A/E (*attaching and effacing*) que provoca lesões na mucosa intestinal de humanos e animais (SOUZA *et al.*, 2016; FROHLICHER *et al.*, 2008). A presença desses genes de virulência somada à resistência aos antimicrobianos mencionados, sugere potencial risco à população.

Em relação ao isolado 17 que apresentou o gene de virulência *saa*, associados ao gene de resistência *tet(A)* e ao perfil do antibiograma de resistência ao ácido nalidixico, amoxicilina, ampicilina, cefazolina, ciprofloxacina, cloranfenicol, doxiciclina, estreptomocina, gentamicina, tetraciclina e sulfonamida, também pode implicar em risco à saúde pública, pois o isolado apresenta resistência a múltiplos antimicrobianos, e possui o gene *saa* com capacidade de codificar uma adesina autoaglutinante, exclusiva para cepas STEC LEE-negativo, que tem função similar ao gene *eae* na patogênese da colonização do intestino humano ocasionando doenças (PATON *et al.*, 2001).

A presença do gene de virulência *stx-1* em cepas não-O157, tal qual ocorreu nos isolados 1, 5, 25, 31 e 32 também é relevante, pois mesmo não sendo o sorotipo convencionalmente associado a patologias (O157:H7), já tiveram associação comprovada em quadros graves de doenças em humanos (MENRATH *et al.*, 2010; BETTELHEIM, 2007).

Apesar de serem escassos os estudos de verificação de genes de virulência em *Escherichia coli* em ambientes, equipamento/utensílios de abatedouros de suínos e de carcaças suínas, existem trabalhos que isolaram esses genes de carcaças de suínos. Os achados de Botteldoorn *et al.* (2003) foram semelhantes ao deste trabalho, os autores encontraram os genes de *hlyA* (alfa hemolisina) e *eae* em cepas *Escherichia coli* presentes em carcaças suínas na Bélgica. O estudo conduzido por Bouvet *et al.* (2001) na França também apresentou resultados semelhantes na detecção do gene de virulência *stx1* em carcaças de suínos, porém houve divergência quanto à presença do gene *eae* e a detecção do gene *stx-2*. No Canadá, Essendoubi *et al.* (2021) também detectaram em carcaças de suínos o

gene *eae*, assim como neste estudo. No entanto, houve a detecção do *stx-2*, o que não ocorreu neste trabalho.

As detecções dos genes de virulência em isolados de *Escherichia coli* também foram semelhantes às encontradas no Mato Grosso por Martins *et al.* (2012), no qual o gene de virulência *eae* esteve presente em amostras de *swabs* de vísceras de suínos após abate. Em São Paulo, Borges e colaboradores (2012) detectaram os genes *sxt-1* e *eae* em carcaças de suínos. Entretanto houve divergências, visto que neste estudo detectamos o gene *saa* e não detectamos o gene de virulência *stx-2*. Já no Rio Grande do Sul, Machado *et al.* (2014) isolaram em carcaças de suínos abatidos na região cepas de *E. coli* com gene *eae*, tal qual neste estudo. Houve diferença dos achados deste estudo, pois os autores não detectaram o gene *stx-1*.

Os estudos que verificam a presença dos genes de virulência pesquisados neste trabalho em carcaças de suínos também são poucos, sendo mais comum a pesquisa de genes de virulência em *E. coli* isoladas de fezes de suínos sadios e doentes em fazendas de criação, tal como descrito por Dellanoy *et al.* (2017) que detectaram o gene *hlyA* em *E. coli* isoladas de suínos diarreicos na França, por Peng *et al.*, (2019) que detectaram os genes de virulência *stx1*, *eae* e *saa* (STEC adesina autoaglutinante) em isolados de *Escherichia coli* de fezes de suínos. Fröhlicher *et al.* (2008) e Toledo *et al.* (2012) também detectaram o gene *eae* em fezes de suínos na Suíça e no México, respectivamente. Esses resultados sugerem que os genes de virulência pesquisados neste trabalho são circulantes em isolados de *E. coli* oriundos de suínos.

Na região do Distrito Federal não há trabalhos em relação à verificação de genes de virulência em *Escherichia coli* oriunda de ambientes, equipamentos e utensílios de abatedouros frigoríficos de suínos ou em carcaças suínas, sendo este o primeiro relato, porém houve o estudo realizado por Drummond & Perecmanis (2013) de verificação dos genes *stx-1* e *stx-2* em suínos hígidos desta região, no qual nenhum desses genes foi detectado.

Os genes de virulência detectados nos isolados deste estudo conferem patogenicidade as cepas de *Escherichia coli* e são um potencial risco à saúde pública (BEUTIN & FACH, 2014), pois os isolados são provenientes de superfícies de equipamentos, utensílios e ambientes de abatedouros frigoríficos de suínos que

possuem contato direto e/ou indireto com os alimentos produzidos nessas indústrias, podendo ocasionar contaminação direta ou cruzada de produtos que serão consumidos pela população do Distrito Federal e Entorno.

Houve diferenças na presença dos genes de virulência entre os isolados dos abatedouros frigoríficos A e B, o que pode ser atribuído aos diferentes lotes de animais recebidos para o abate, devido diferentes manejos sanitários nas granjas de origem, tal como verificado por Borges e colaboradores (2012).

Além do potencial risco à saúde pública que está relacionado a contaminação dos alimentos, é importante ressaltar a perda econômica decorrente da infecção por cepas patogênicas de *E. coli* em suínos, especialmente leitões, diminuindo a conversão alimentar devido a sintomatologia diarreica, podendo contaminar outros suínos da granja e sendo passíveis de óbito devido ao quadro de severa desidratação ou desenvolvimento de síndromes relacionadas a cepas patogênicas de *E. coli* conforme descrito por Camargo & Suffredini (2015).

4.7. Avaliação *in vitro* da capacidade de formação de biofilmes de isolados de *Escherichia coli*

Os 21 isolados de *Escherichia coli* que foram incubados por 24h em microplacas de poliestireno em três temperaturas (37°C, 24°C e 10°C) para verificação da capacidade de formação de biofilme *in vitro* apresentaram os seguintes resultados: à temperatura de 37°C houve 3 (14,2%) isolados formadores moderados de biofilme, 8 (38,1%) isolados foram formadores fracos, 10 (47,7%) isolados não apresentaram formação de biofilme e não houve isolados com forte capacidade de formação de biofilme. A 24°C houve 3 (14,2%) isolados formadores moderados, 14 (66,75%) isolados foram formadores fracos, 4 (19,05%) não apresentaram formação de biofilme e não houve isolados com forte formação de biofilmes. A 10°C houve 1 (4,8%) isolado formador forte de biofilme, 4 (19,05%) isolados formadores moderados, 12 (57,1%) isolados formadores fracos e 4 (19,05%) isolados não formadores de biofilme.

Nas microplacas incubadas por 72h a 37°C houve 2 (9,5%) isolados formadores fortes de biofilme, 6 (28,6%) isolados formadores moderados, 11

(52,4%) isolados formadores fracos e 2 (9,5%) isolados não apresentaram formação de biofilme. A 24°C houve 4 (19,05%) isolados formadores fortes de biofilmes, 10 (47,75%) isolados formadores moderados, 6 (28,6%) isolados formadores fracos e 1 (4,8%) isolado não formador de biofilme. A 10°C houve 4 (19,05%) isolados formadores fortes de biofilmes, 8 (38,1%) isolados formadores moderados, 7 (33,3%) isolados formadores fracos e 2 (9,5%) isolados não formadores de biofilme. A identificação individual dos 21 isolados de *E. coli*, bem como os valores de densidade óptica e classificação da capacidade de formação de biofilme nas três temperaturas verificadas neste estudo, após 24h e 72h de incubação das microplacas de poliestireno encontram-se na Tabela 05.

Nas análises estatísticas realizadas, em nível de significância de 5%, houve diferença significativa ($P < 0,0001$) quanto à capacidade de formação de biofilmes bacterianos dos isolados em relação às diferentes temperaturas, tempo de incubação e seus locais de origem. Em relação aos locais amostrados, o isolado 40 (mesa de toalete) apresentou a maior capacidade de formação de biofilmes, enquanto o isolado 22 (parede da câmara de resfriamento) não formou biofilmes em nenhuma das condições tempo x temperatura verificadas neste estudo.

No que se refere às temperaturas testadas e os tempos de incubação, os isolados apresentaram maior capacidade de formação de biofilmes após 72h de incubação, sendo que na temperatura de 10°C houve o maior crescimento de biofilme. A menor capacidade de formação de biofilmes foi verificada na temperatura de 37°C após 24h de incubação. É relevante que a maior capacidade de formação de biofilmes tenha ocorrido em temperatura de refrigeração, pois tal condição se assemelha a temperatura interna para desossa climatizada em abatedouros frigoríficos (BRASIL, 2018) e cepas de *E. coli* capazes de formar biofilme nessa temperatura podem representar risco de contaminação aos alimentos produzidos nestes locais. O maior crescimento dos isolados após 72h de incubação, quando comparados ao crescimento em 24h, corrobora as diretrizes da portaria nº 1304, de 7 de agosto de 2018 do MAPA acerca da importância da limpeza diária nas plantas de abate após o término das atividades, e antes do início do processo de abate, visando a qualidade higiênico sanitária dos alimentos.

Tabela 05. Resultados do teste de capacidade de formação de biofilmes *in vitro* dos 21 isolados de *Escherichia coli* em microplaca de poliestireno incubadas por 24h e 72h em três diferentes temperaturas (37°C, 24°C e 10°C). A classificação utilizada foi a de STEPANOVIĆ *et al.* (2000), em que DOi equivale a densidade óptica do isolado e DOn a densidade óptica do controle negativo.

Identificação do isolado de <i>E. coli</i>	Tempo de incubação	DOi a 37°C	DOi a 24°C	DOi a 10°C	Classificação a 37°C	Classificação a 24°C	Classificação 10°C
1	24h	0,156	0,188	0,105	fraca	moderada	moderada
	72h	0,085	0,095	0,140	fraca	fraca	fraca
2	24h	0,064	0,132	0,070	NF	fraca	NF
	72h	0,061	0,065	0,087	NF	fraca	fraca
5	24h	0,111	0,124	0,097	fraca	fraca	fraca
	72h	0,099	0,133	0,089	fraca	moderada	fraca
6	24h	0,193	0,192	0,112	moderada	moderada	fraca
	72h	0,157	0,134	0,149	moderada	moderada	moderada
10	24h	0,193	0,167	0,116	moderada	fraca	fraca
	72h	0,135	0,133	0,156	moderada	moderada	moderada
14	24h	0,110	0,141	0,062	fraca	fraca	NF
	72h	0,103	0,123	0,063	fraca	fraca	NF
15	24h	0,088	0,125	0,116	fraca	fraca	fraca
	72h	0,087	0,101	0,083	fraca	fraca	fraca
17	24h	0,103	0,116	0,111	fraca	fraca	fraca
	72h	0,136	0,117	0,111	moderada	fraca	fraca
22	24h	0,041	0,044	0,043	NF	NF	NF
	72h	0,043	0,044	0,044	NF	NF	NF
24	24h	0,068	0,072	0,098	NF	NF	fraca
	72h	0,102	0,405	0,313	fraca	forte	forte
25	24h	0,108	0,094	0,103	fraca	fraca	fraca
	72h	0,114	0,223	0,285	fraca	moderada	forte
26	24h	0,078	0,090	0,092	NF	fraca	fraca
	72h	0,118	0,207	0,176	fraca	moderada	moderada
27	24h	0,069	0,112	0,120	NF	fraca	fraca
	72h	0,187	0,298	0,191	moderada	forte	moderada
29	24h	0,070	0,083	0,075	NF	NF	NF
	72h	0,083	0,188	0,065	fraca	moderada	fraca

30	24h	0,096	0,072	0,122	fraca	NF	fraca
	72h	0,268	0,165	0,116	forte	moderada	fraca
31	24h	0,069	0,150	0,179	NF	fraca	moderada
	72h	0,078	0,130	0,226	fraca	moderada	moderada
32	24h	0,072	0,124	0,157	NF	fraca	fraca
	72h	0,340	0,266	0,312	forte	forte	forte
33	24h	0,070	0,094	0,220	NF	fraca	moderada
	72h	0,112	0,108	0,174	fraca	fraca	moderada
40	24h	0,248	0,197	0,355	moderada	moderada	forte
	72h	0,201	0,336	0,319	moderada	forte	forte
41	24h	0,086	0,076	0,099	fraca	fraca	fraca
	72h	0,131	0,140	0,198	moderada	moderada	moderada
43	24h	0,080	0,105	0,221	NF	fraca	moderada
	72h	0,084	0,201	0,189	fraca	moderada	moderada

*DOn = 0,064 nos isolados incubados por 24h e de 0,086 nos isolados incubados por 72h.

** A avaliação da capacidade e intensidade de formação de biofilme foi dividida em: isolado não formador de biofilme (NF) quando a densidade óptica do isolado (DOi) foi menor ou igual à DOn ($DOi \leq DOn$); fracamente formador de biofilme se $DOn < DOi \leq 2x DOn$; formador de biofilme moderado se $2x DOn < DOi \leq 4x DOn$ ou forte formador de biofilme se $4x DOn < DOi$ (STEPANOVIĆ *et al.*, 2000).

Em relação à capacidade de formação de biofilmes associados aos resultados de detecção de genes de resistência antimicrobiana e de detecção de alguns genes de virulência, 5 (23,8%) dos 21 isolados apresentaram capacidade forte de formar biofilmes em pelo menos uma das temperaturas testadas, entre eles o isolado 32 que apresentou o gene de resistência *cat1* (cloranfenicol) e o isolado 40 que apresentou o gene de resistência à tetraciclina - *tet(B)*.

Houve 15 (71,4%) dos 21 isolados que apresentaram capacidade moderada de formação de biofilmes em alguma das temperaturas testadas, sendo que em 9 desses 15 isolados haviam sido detectados genes de resistência antimicrobiana: isolados 1 (*ampC*, *tet(A)* e *sul1*), isolado 5 (*clmA*), isolado 6 (*tet(A)* e *ampC*), isolado 10 (*tet(A)* e *MCR-3*), isolado 17 (*tet(A)*), isolado 33 (*ampC* e *blaSHV*), isolado 40 (*tet(B)*), isolado 41 (*tet(B)* e *ampC*) e isolado 43 (*ampC*). Esses resultados são relevantes e implicam importância aos isolados devido ao risco que representam a saúde pública, e a capacidade de propagarem resistência antimicrobiana no ambiente, tal como descrito por Barilli *et al.* (2019). Além da presença de genes de

resistência, esses isolados também apresentaram genes de virulência *stx-1*, *saa*, *hlyA* e *tir*, que por sua vez apresentam associação comprovada a desenvolvimento de doenças graves em humanos, o que reforça o risco potencial aos consumidores dos alimentos processados nessas indústrias frigoríficas.

A formação de biofilmes bacterianos é um sério problema em indústrias de alimentos (STOCCO *et al.*, 2017), pois permite que microrganismos permaneçam em superfícies após procedimentos de higienização e sanitização, se mantendo viáveis por meses no ambiente e podendo se tornar ponto recorrente de contaminação, tal qual descrito por Galié *et al.* (2018). A falha recorrente nos processos de higienização é o que permite a fixação das bactérias em superfícies abióticas, e uma vez instaurados no ambiente, a remoção do biofilme bacteriano na planta de processamento de alimentos é desafiadora, pois a matriz de substâncias poliméricas extracelulares autoproduzidas possibilita a adesão de outros microrganismos que irão colonizar uma ampla variedade de superfícies, sendo ainda capazes de suportar várias formas de estresse (KARIMI *et al.*, 2015). Em ambientes de processamento de produtos de origem animal, pode haver complexas comunidades multiespécies, permitindo a fixação e o descolamento de células bacterianas, possibilitando a contaminação cruzada dos produtos, e por sua vez, a redução do tempo de prateleira dos alimentos e a transmissão de doenças (GIAOURIS *et al.*, 2014).

Os resultados encontrados neste estudo foram semelhantes aos de Stanford *et al.* (2021) no Canadá, em que os autores constataram a capacidade de forte formação de biofilmes de *Escherichia coli* presentes em equipamentos de abatedouros frigoríficos de bovinos. Na Itália, Barilli *et al.* (2019) também tiveram resultados similares, em que detectaram *E. coli* oriunda de carcaça suína com capacidade de formação de biofilme. Já Wang *et al.* (2013), nos Estados Unidos, detectaram *E. coli* em carcaças de bovinos com capacidade de formação de biofilme, tal qual neste estudo.

No Brasil, esse é o primeiro trabalho que avalia a capacidade de formação de biofilme de *Escherichia coli* em ambientes de abatedouros frigoríficos de suínos.

4.8. Avaliação *in vitro* da capacidade de formação de biofilme do isolado de *Salmonella* spp.

O isolado de *Salmonella* Typhi incubado por 24h em microplacas de poliestireno em três temperaturas (37°C, 24°C e 10°C) para verificação da capacidade formação de biofilme *in vitro* apresentou os seguintes resultados: formador fraco de biofilme a 37°C e 24°C, e não apresentou capacidade de formação de biofilme a 10°C. Na microplaca incubada por 72h a 37°C houve formação moderada de biofilme, e a 24°C e 10°C o isolado foi formador fraco de biofilme. Os valores da densidade óptica do isolado de *Salmonella*, bem como classificação da capacidade de formação de biofilme nas três temperaturas verificadas neste estudo após 24h e 72h de incubação das microplacas de poliestireno estão descritas na Tabela 06.

Tabela 06. Resultados do teste de capacidade de formação de biofilmes *in vitro* do isolado de *Salmonella* Typhi em microplaca de poliestireno incubadas por 24h e 72h em três diferentes temperaturas (37°C, 24°C e 10°C). A classificação utilizada foi a de STEPANOVIĆ *et al.* (2000), onde DOi equivale a densidade óptica do isolado e DOn a densidade óptica do controle negativo.

Identificação do isolado de <i>Salmonella</i>	Tempo de incubação	DOi a 37°C	DOi a 24°C	DOi a 10°C	Classificação a 37°C	Classificação a 24°C	Classificação a 10°C
21	24h	0,089	0,112	0,084	fraca	fraca	NF
	72h	0,135	0,074	0,084	moderada	fraca	fraca

* DOn = 0,064 nos isolados incubados por 24h e de 0,086 nos isolados incubados por 72h.

** A avaliação da capacidade e intensidade de formação de biofilme foi dividida em: isolado não formador de biofilme (NF) quando a densidade óptica do isolado (DOi) foi menor ou igual à DOn ($DOi \leq DOn$); fracamente formador de biofilme se $DOn < DOi \leq 2x DOn$; formador de biofilme moderado se $2x DOn < DOi \leq 4x DOn$ ou forte formador de biofilme se $4x DOn < DOi$ (STEPANOVIĆ *et al.*, 2000).

A bactéria *Salmonella* Typhi apresentou capacidade de formação moderada de biofilme sob a temperatura de 37°C, após incubação por 72h, o que pode ter

ocorrido por essa ser sua temperatura ideal de crescimento (BRASIL, 2011). Em relação às demais temperaturas e tempos de incubação testados, o isolado apresentou fraca capacidade de formação de biofilme, ou não formação de biofilme, mesmo assim esteve presente no ambiente. É importante salientar que mesmo na condição de não formador de biofilme (10°C após incubação de 24h) o microrganismo isolado é o agente causador da febre tifóide, doença amplamente descrita e caracterizada clinicamente por febre alta, cefaleia, diarreia e dor abdominal após consumo de alimentos contaminados (WHO, 2003; BRASIL, 2008).

Assim, implica-se risco à saúde pública, uma vez que esse isolado apresenta multirresistência a antimicrobianos, presença de genes de resistência (*tet(B)*, *tet(C)*, *tet(M)* e *ampC*) e possui capacidade de fixação em superfícies.

São quase inexistentes os trabalhos que buscam avaliar a capacidade de formação de biofilmes de *Salmonella* spp. no Brasil em abatedouros frigoríficos, porém os resultados encontrados neste trabalho foram similares aos de Garcia *et al.* (2017) no Estado de São Paulo, em que os autores detectaram fraca e moderada formação de biofilmes de cepas de *Salmonella* oriundas carcaças de aves e equipamentos utilizados em granjas de criação. Sereno *et al.* (2017) também tiveram resultados semelhantes, e detectaram cepas formadoras fracas e moderadas de *Salmonella* em carcaças de aves congeladas no Paraná.

No Brasil, esse é o primeiro trabalho que buscou avaliar a capacidade de formação de biofilme de *Salmonella* spp. isolada em ambiente de abatedouros frigoríficos de suínos.

5. CONCLUSÃO

Neste estudo foi detectada a presença de 21 isolados de *Escherichia coli* e 1 isolado de *Salmonella Typhi* em ambientes, equipamentos e utensílios utilizados em abatedouros frigoríficos de suínos localizados na região do Distrito Federal. Os isolados de *E. coli* apresentaram multirresistência a antimicrobianos, presença de genes de resistência e de genes de virulência. Verificou-se forte capacidade de formação de biofilmes em 5 (23,8%) dos isolados de *E. coli* e capacidade moderada em 15 (71,4%) isolados deste mesmo microrganismo. O isolado de *Salmonella* também foi multirresistente aos antimicrobianos, e teve a presença do gene de resistência às tetraciclinas. Em relação a capacidade de formação de biofilme, verificou-se capacidade moderada de formação de biofilme a 37°C após incubação de 72h.

Os resultados deste estudo sugerem risco à saúde pública devido à associação destes patógenos a doenças transmitidas por alimentos, sendo pertinente ressaltar o risco de propagação de genes de resistência no ambiente.

A presença de resistência a múltiplos antimicrobianos nos isolados deste estudo é indicadora da necessidade do uso racional desses fármacos visando a preservação de sua eficácia para uso futuro. Em relação a presença dos microrganismos patogênicos, sabe-se que a diminuição da ocorrência de DTAs está intimamente relacionada ao aumento da qualidade dos produtos através de ações higiênicas criteriosas dentro das indústrias, assim destaca-se a importância de recursos que busquem reduzir ou eliminar microrganismos patogênicos, tais como BPF (Boas Práticas de Fabricação), PPHO (Procedimento Padrão de Higiene Operacional) e APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle), a fim de garantir a qualidade higiênica e sanitária do produto final e a saúde do consumidor.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARESTRUP, F.M.; AGERSO, Y.; AHRENS, P.; JORGENSEN, J.C.O.; MADSEN, M.; JENSEN, L.B. **Antimicrobial susceptibility and presence of resistance genes in staphylococci from poultry.** *Veterinary Microbiology*, v. 74, n. 4, p. 353-364, 2000.
- ADLEY, C., RYAN, M.P. 2016. *Antimicrobial Food Packaging*. Edition: 1st. Chapter: **The Nature and Extent of Foodborne Disease**. Publisher: Elsevier. Editors: J Barros-Velazquez
- ALIZADE, H.; HOSSEINI, T.; AZAD, M., SHOJAE, S.; GOUKLANI, H.; DAVOODIAN, P.; GHANBARPOUR, R. **An overview of diarrheagenic *Escherichia coli* in Iran: A systematic review and meta-analysis.** *J. Res. Med. Sci.*, v. 24, n. 23, 2019.
- ALMEIDA, L.; BARRETO, E.H.; BITTENCOUR, J.V.M. **Controle de qualidade microbiológico no processamento de frigorífico bovino.** *Rev. Espacius*, v. 38, n. 22, p. 9, 2017.
- ALVAREZ, J.; SOTA, M.; VIVANCO, A.B.; PERALES, I.; CISTERNA, R.; REMENTERIA, A.; GARAIZAR, J. **Development of a Multiplex PCR Technique for Detection and Epidemiological Typing of *Salmonella* in Human Clinical Samples.** *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 4, p. 1734-1738, 2004.
- AMER, M.M.; HODA, M.M.; AMER, A.M.; HANA, S.F. **Antimicrobial resistance genes in pathogenic *Escherichia coli* isolated from diseased broiler chickens in Egypt and their relationship with the phenotypic resistance characteristics.** *Vet World*. v.11, n.8, p.1082–1088, 2018.
- ANDRADE, R.R.; SILVA, P.H.C.; SOUZA, N.R.; MURATA, L.M.; GON ALVES, V.S.P.; SANTANA, A.P. **Ocorrência e diferenciação de espécies de *Listeria* spp. em salsichas tipo hot dog a granel e em amostras de carne moída bovina comercializadas no Distrito Federal.** *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 44, n. 1, p. 147-152, 2014.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL - ABPA. **Relatório anual, 2020.** São Paulo, 2020.
- AUTIO, T.; SATERI, T.; FREDRIKSSON-AHOMA, M.; RAHKIO, M.; LUNDÉN, J.; KORKEALA, H. ***Listeria monocytogenes* contamination pattern in pig slaughterhouses.** *J Food Prot.*, v.63, n.10, p.1438-42, 2000.
- BARILLI, E.; VISMARRA, A.; VILLA, Z.; BONILAURI, P.; BACCI, C. **ES β L *E. coli* isolated in pig's chain: Genetic analysis associated to the T phenotype and biofilm synthesis evaluation.** *Journal of Food Microbiology*, v.289, p.162-167, 2019.
- BARLAAM, A.; PARISI, A.; SPINELLI, E.; CARUSO, M.; TARANTO, P.; NORMANNO, G. **Global Emergence of Colistin-Resistant *Escherichia coli* in Food Chains and Associated Food Safety Implications: A Review.** *Journal of Food Protection*, v.82, n.8, P.1440–1448, 2019.
- BARRETO, E.H. **Controle da qualidade sanitária em frigoríficos de suínos do Paraná.** 2017. 89 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Produção) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2017.
- BARROS, M.A.F.; NERO, L.A.; SILVA, L.C.; DOVIDIO, L.; MONTEIRO, F.; TAMANINI, R.; FAGNANI,

R.; HOFER, E.; BELOTI, V. **Listeria monocytogenes: Occurrence in beef and identification of the main contamination points in processing plants.** Meat science, v. 76, n. 4, p. 591-596, 2007.

BAUER, A.W; KIRBY, W.M.M; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. **Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method.** American Journal of Clinical Pathology, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.

BERGLUND, B. **Acquired Resistance to Colistin via Chromosomal And Plasmid-Mediated Mechanisms in *Klebsiella pneumoniae*.** Infectious Microbes & Diseases, v.1, n.1, p.10-19, 2019.

BERRANG, M.E.; MEINERSMANN, R.J.; FRANK, J.F. LaADELY, S.R. **Colonization of a newly constructed commercial chicken further processing plant with *Listeria monocytogenes*.** Journal of food protection, v. 73, n. 2, p. 286- 291, 2010.

BETTELHEIM, K.A. **The Non-O157 Shiga-Toxigenic (Verocytotoxigenic) *Escherichia coli*, Under- Rated Pathogens.** Critical Reviews in Microbiology, v.33, n.1, p. 67–87, 2007.

BEUTIN, L.; FACH, P. **Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* from Nonhuman Sources and Strain Typing.** Microbiology Spectrum, v.2, n.3, 2014.

BISCHOFF, K.M.; WHITE, D.G.; HUME, M.E.; POOLE, T.L.; NINSBET, D.J. **The chloramphenicol resistance gene *cmIA* is disseminated on transferable plasmids that confer multiple-drug resistance in swine *Escherichia coli*.** 2006 FEMS Microbiology Letters, v. 243, n.1. p. 285-29, 2006.

BORGES, C.A.; BERALDO, L.G.; MALUTA, R.P.; CARDOZO, M.V.; GUTH, C.B.E.; RIGOBELLO, E.C.; DE ÁVILA, F.A. **Shiga Toxigenic and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli* in the Feces and Carcasses of Slaughtered Pigs.** Foodborne Pathogens and Disease, v.9, n.12, p1119–1125, 2012.

BORGES, K.A.; FURIAN, T.Q.; SOUSA, S.S.; MENEZES, R.; TONDO, E.C.; SALLES, C.T.P.; MORAES, H.L.S.; NASCIMENTO, V.P. **Biofilm formation capacity of *Salmonella* serotypes at different temperature conditions.** Pesq. Vet. Bras., v. 38, n. 1, p. 71-76, 2018.

BOTELHO, L.G.; MAFFEI, L.S.; NUNES, L.P.; MARTINS, M.S.; KRUG, F.D.M.; SCHMITT, C.I. **Novas perspectivas para a cadeia produtiva de suínos.** Revista Científica de Medicina Veterinária, v. XIV, n. 28, 2017.

BOTTELDOORN, N.; HERMAN, L.; RIJPENS, N.; HEYNDRIKX. **Phenotypic and Molecular Typing of *Salmonella* Strains Reveals Different Contamination Sources in Two Commercial Pig Slaughterhouses.** Applied and Environmental Microbiology, v. 70, n. 9, 2020.

BOTTELDOORN, N.; HEYNDRIKX, M.; RIJPENS, N.; HRHMAN, L. **Detection and characterization of verotoxigenic *Escherichia coli* by a VTEC/EHEC multiplex PCR in porcine faeces and pig carcass swabs.** Res Microbiol. v.154, n.2, p.97-104, 2003.

BOTTELDOORN, N.; HEYNDRIKX, M.; RIJPENS, N.; GRIJSPEERDT, Grijspeerdt, K.; HERMAN, L. ***Salmonella* on pig carcasses: positive pigs and cross contamination in the slaughterhouse.** Journal of Applied Microbiology, v.95, p.891–903, 2003.

BOUVET, J.; MONTET, M.P.; ROSSEL, R.; LE ROUX, A.; BAVAI, C.; RAY-GUENIOT, S.; Mazuy, C.; ATRACHE, V.; VERNOZY-ROZAND, C. **Effects of slaughter processes on pig carcass contamination by verotoxin-producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7.** v.77, n.1-2, p.99–108, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis.

Apresentação sobre Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. Brasília, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria MAPA nº 1304, de 2 de agosto de 2018. Altera a Portaria nº 711, de 1º de novembro de 1995: **Normas técnicas de instalações e equipamentos para abate e industrialização de suínos.** Brasília, 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 79 de 14 de dezembro de 2018. **Procedimentos de inspeção ante e post mortem de suínos com base em risco.** Brasília, 2018

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n. 40 de 12 de dezembro de 2005. **Aprovar os Métodos Analíticos, Isolamento e Identificação da Salmonella na carne bovina, avicultura e produtos derivados de ovos.** Brasília, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual Técnico de Diagnóstico Laboratorial da *Salmonella spp.* Brasília, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos.** Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. 158 p. : il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de vigilância e controle da febre tifóide.** Brasília, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.º 9 de 27 de junho de 2003. **Proíbe a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos: cloranfenicol e nitrofuranos.** Brasília, 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, do Abastecimento e da Reforma Agrária. Portaria nº 711, de 1º de novembro de 1995: **Normas técnicas de instalações e equipamentos para abate e industrialização de suínos** Brasília, 1995.

BRIDIER, A., LE GRANDOIS, P., MOREAU, MH. **Impact of cleaning and disinfection procedures on microbial ecology and *Salmonella* antimicrobial resistance in a pig slaughterhouse.** Sci Rep, v.9, article 12947, 2019.

BRUNDER, W.; SCHIMIDT, H.; FROSCHE, M.; KARCH, H.; **The large plasmids of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are highly variable genetic elements.** Microbiology, v. 145, n.5, p. 1005-1014, 1999.

CABRAL, C.C., PANZENHAGEN, P.H.N., DELGADO, K.F., SILVA, G.R.A.; RODRIGUES, D.P.; FRANCO, R.M.; CONTE-JUNIOR, C.A. **Contamination of Carcasses and Utensils in Small Swine Slaughterhouses by *Salmonella* in the Northwestern Region of the State of Rio de Janeiro, Brazil.** Journal of Food Protection, v. 80, n. 7, p. 1128-1132, 2017. doi:10

CAMARGO, L.R.P.; SUFFREDINI, I.B. **Impacto causado por *Escherichia coli* na produção de animais de corte no Brasil: revisão de literatura.** J Health Sci Inst. v.33, n.2, p.193-197, 2015.

CAPRIOLI, A.; MORABITO, S.; BRUGERE, H.; OSWALD, E. **Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: Emerging issues on virulence and modes of transmission.** Vet Res., v. 36, p. 289-31, 2005.

CARATTOLI, A.; VILLA, L.; FEUDI, C.; CURCIO, L.; ORSINI, S.; LUPPI, A.; PEZZOTTI, G.; MAGISTRALI, C.F. **Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016.** Euro Surveill., v. 22, n. 31, 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30584>

CARVALHO, F.; SOUSA, S.; CABANES, D. **How *Listeria monocytogenes* organizes its surface for virulence.** Front Cell Infect Microbiol. v. 4, n. 48, p. 1-22, 2014.

CHEN, T.; JIANG, J.; YE, C.; XIE, J.; CHEN, X.; XU, D.; ZENG, Z.; PENG, Y.; HU, D.; FANG, R. **Genotypic characterization and antimicrobial resistance profile of *Salmonella* isolated from chicken, pork and the environment at abattoirs and supermarkets in Chongqing, China.** BMC Veterinary Research, v.15, n.1, p. 456, 2019.

CHINA, B.; GOFFAUX, F.; PIRSON, V.; MAINIL, J. **Comparison of eae, tir, espA and esp B genes of bovine and human attaching and effacing *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction.** FEMS Microbiology, v. 178, n. 1, p.177-182, 1999.

CHINA, B.; PIRSON, V.; MAINIL, J. **Typing of Bovine Attaching and Effacing *Escherichia coli* by Multiplex *in vitro* Amplification of Virulence-Associated Genes.** Applied and environmental microbiology, v. 62, n. 9, p. 3462-3465, 1996.

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **CLSI M100 - ED30:2020 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing.** 30 ed.

COMBROUSE, T.; SADOVSKAYA, I.; FAILLE, C.; KOL, O.; GUERARDEL, Y.; MIDELETBOURDIN, G. **Quantification of the extracellular matrix of the *Listeria monocytogenes* biofilms of different phylogenetic lineages with optimization of culture conditions.** Journal of Applied Microbiology, n.114, p.1120-31, 2013.

DAIGLE, F. **Special Issue “*Salmonella*: Pathogenesis and Host Restriction”.** Microorganisms, v. 9, p. 325, 2021.

DAVANZO, E.F.A. **Caracterização molecular de estirpes de *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* de biofilmes em ambiente de abatedouros frigoríficos bovinos e de aves localizados no Distrito Federal e estado de Goiás.** 2020. 94 p. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal). Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - Universidade de Brasília.

DELANNOY, S.; MARIANI-KURKDJIAN, P.; WEBB, H.E.; BONACORSI, S.; FACH, P. **The Mobilome; A Major Contributor to *Escherichia coli* stx2-Positive O26:H11 Strains Intra-Serotype Diversity.** Frontiers in Microbiology, v.8, article 1625, 2017.

DOWLING, A., O’ DWYER, J.; ADLEY, C.C. **Alternatives to antibiotics: future trends.** In: Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. MENDEZ-VILAS, A. 1. ed. Espanha: Formatex Research Centre, 2013. p. 216-226.

DRUMMOND, V.O.; PERECMANIS, S. **Enterotoxin genes and antimicrobial profile of *Escherichia coli* isolated from healthy swines in Distrito Federal, Brazil.** Medicina Veterinária. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. v.65, n.4, 2013.

ENG, S.; PUSPARAJAH, P.; MUTALIB., N.A.; CHAN, K.; LEE, L. ***Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance.** Frontiers in Life Science, v. 8, n. 3, p. 284-293, 2015.

EGBULE, O.S.; IWERIEBOR, B.C.; ODUM, E.I. **Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates Recovered from Pig Handlers in Retail Shops and Abattoirs in Selected Localities in Southern Nigeria: Implications for Public Health.** Antibiotics, v.10, n.9, 2020.

ESSENDUBI, S.; YANG, X.; KING, R.; KEENLISIDE, J.; BAHAMON, J.; DIEGEL, J.; LU, P.; CASSIS, R.; GENSLER, G.; STASHKO, N.; ROLHEISER, D. **Prevalence and Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 on Pork Carcasses and in Swine Colon Contents from Provincially Licensed Abattoirs in Alberta, Canada.** J Food Prot, v. 83, n.11, p.1909–1917, 2020.

EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Versão 11.0. 2021.

FENG, P.; WEAGANT, S. D.; GRANT, M. A.; BURKHARDT, W. Food and Drugs Administration (FDA). **Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria**, 2002.

FERREIRA, M.D.P.F.; VIEIRA-FILHO, J.E.R. **Inserção no mercado internacional e produção de carnes no Brasil**. Texto para discussão / Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, 2019.

FRANCO, R.M.; MANTILLA, S.P.S.; GOUVÊA, R.; OLIVEIRA, L.A.T. **Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated in meat and fecal samples from pigs**. Acta Veterinaria Brasilica, v.4, n.1, p.31-36, 2010.

FREITAS, C.G.; SANTANA, A.P.; SILVA, P.H.C.; GONÇALVES, V.S.P.; BARROS, M.A.F.; TORRES, F.A.G.; MURATA, L.S.; PERECMANIS, S. **PCR multiplex for detections of *Salmonella* Enteritidis, Typhi and Typhimurium and occurrence in poultry meat**. International Journal of Food Microbiology, v. 139, p. 15-22, 2010.

FROHLICHER, E.; KRAUSE, G.; ZWEIFEL, C.; BEUTIN, L.; STEPHAN, R. **Characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) isolated from pigs and sheep**. BMC Microbiol. v. 11, n.8, p.144, 2008.

GALIÉ, S. GARCÍA-GUTIÉRREZ, C.; MIGUÉLEZ, E.M.; VILLAR, C.J.; LOMBÓ, F. **Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods**. Frontiers in Microbiology, v.9, article 898, 2018.

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

GARRITY, G.B.; STALEY, J.T. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume Two**. New York: Springer, 2005.

GIAOURIS, E.; HEIR, E.; HÉBRAUD, M.; CHORIANOPOULOS N.; LANGSRUD, S.; MORETRO, T.; HABIMANA, O.; DESVAUX, M.; RENIER, S.; NYCHAS, G.J. **Attachment and biofilm formation by foodborne bacteria in meat processing environments: causes, implications, role of bacterial interactions and control by alternative novel methods**. Meat Sci. v.97, n.3, p.298-309, 2014.

HARADA, K.; ASAI, T.; KOJIMA, A.; ISHIHARA, K.; TAKAHASHI, T. **Role of coresistance in the development of resistance to chloramphenicol in *Escherichia coli* isolated from sick cattle and pigs**. American Journal of Veterinary Research, v.67, n.2, p.230–235, 2006.

HUFNAGEL, D.A.; DEPAS, W.H.; CHAPMAN, M.R. **The Biology of the *Escherichia coli* Extracellular Matrix**. Rev. American Society of Microbiology Press., Microbiology Spectrum, n.3, 2014.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION - **ISO 6579**. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. 27 p. 2002.

KAPER, J.B.; NATARO, J.P.; MOBLEY, H.L.T. **Pathogenic *Escherichia coli***. Nature Reviews Microbiology. v. 2, p. 123-140, 2004.

KARIMI, A.; KARIG, D.; KUMAR, A.; ARDEKANI, A.M. **Interplay of Physical Mechanisms and Biofilm Processes: Review of Microfluidic Methods**. Lab Chip. v.15, n.1, p.23-42, 2015.

KICH, J.D.; COLDEBELLA, A.; MORÉS, N.; NOGUEIRA, M.G.; Marisa, M.; FRATAMMICO, P.M.; Jeffrey E. CALL, J.E.; FEDORKA-CRAY, P.; LUCHANSKY, J.B. **Prevalence, distribution, and molecular characterization of *Salmonella* recovered from swine finishing herds and a**

slaughter facility in Santa Catarina, Brazil. International Journal of Food Microbiology, v.151, n. 3, p.307–313, 2011.

KOO, O.K., MERTZ, A.W., AKINS, E.L., SIRSAT, S.A., NEAL, J.A., MORAWICKI, R., CRANDALL, P.G.; RICKE, S.C. **Analysis of microbial diversity on deli slicers using polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis technologies.** Lett. Appl. Microbiol. v. 56, p.111-119, 2013.

KUMAR, S.; BALAKRISHNA, K.; BATRA, H.V.; **Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhi (S. Typhi) by selective amplification of *invA*, *viaB*, *fliC-d* and *prt* genes by polymerase chain reaction in multiplex format.** Lett Appl Microbiol, v. 42, n.2, p.149-54, 2006.

KWANG, J.; LITTLEDIKE, E.T.; KEEN, J.E. **Use of the polymerase chain reaction for *Salmonella* detection.** Lett Appl Microbiol, v. 22, n. 1. p. 46-51, 1996.

LAKICEVIC, B.; NASTASIJEVIC, I. ***Listeria monocytogenes* in retail establishments: Contamination routes and control strategies.** Food Rev. Int., v. 33, p. 247-269, 2017

LARIVIÈRE-GAUTHIER, G.; LETELLIER, A.; KÉROUANTON, A.; BEKAL, S.; QUESSY, S.; FOURNAISE, S.; FRAVALO, P. **Analysis of *Listeria monocytogenes* Strain Distribution in a Pork Slaughter and Cutting Plant in the Province of Quebec.** J Food Prot, v.77, n.12. p. 2121-2128, 2014.

LÁZARO, N. S.; TIBANA, A.; RODRIGUES, D. P.; REIS, E.M.F.; QUINTAES, B.R.; HOFER, E. **Antimicrobial resistance and R-plasmid in *Salmonella* spp. from swine and abattoir environments.** Pesquisa Veterinária Brasileira, v.24, n.2, p. 57–60, 2004.

LEWIS, K. **Riddle of biofilm resistance.** Antimicrob Agents Chemother, v. 45, n. 4, p. 999-1007, 2001.

LI, L.; OLSEN, R.H; YE, L.; YAN, H.; NIE, Q.; MEN, H.F; SHI, L. **Antimicrobial Resistance and Resistance Genes in Aerobic Bacteria Isolated from Pork at Slaughter.** Journal of Food Protection, v.79, n.4, p.589–597, 2016.

LI, Z.; CAO, Y.; YI, L.; LIU, J.; YANG, Q. **Emergent Polymyxin Resistance: End of an Era?** Open Forum Infectious Diseases, v. 6, n. 10, 2019.

LINDESTEDT, B.A.; FINTON, M.D.; PORCELLATO, D.; BRANDAL, L.T. **High frequency of hybrid *Escherichia coli* strains with combined Pathogenic *Escherichia coli* (IPEC) and Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) virulence factors isolated from human faecal samples.** BMC Infect. Dis., v. 18, p. 544, 2018.

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

LIU, Y.; HAIHONG, W.; SUN, Z.; XU, X.; LIU, F. **Contamination and Biofilm Formation of Foodborne and Opportunistic Pathogens in Yellow-Feathered Chicken Carcass.** Foodborne Pathogens and Disease. Mar v.18, n.3, p. 201-218, 2021.

LOPES, G.V.; MICHAEL, G.B.; SCHWARZB, M.C.S. **Antimicrobial resistance and class 1 integron-associated gene cassettes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from pigs at slaughter and abattoir environment.** Veterinary Microbiology, v. 194, p. 84-92, 2016.

LÓPEZ, H.S.; OLVERA, L.G. **Problemática del uso de enrofloxacin em la aviculture en México.** *Veterinaria México*, v. 31, n.2, p. 137-145, 2000.

MACHADO, L.R.; LUCCA, F.; ALVEZ, J.; POZZOBON, A.; BUSTAMANTE-FILHO, I.C. **Prevalência e genotipagem de *Escherichia coli* patogênica em carcaças de suínos abatidos em frigoríficos comerciais na Região Sul do Brasil.** *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*, v. 08, n. 1, p. 128 - 145, 2014.

MAY, A.K.; GLEASON, T.G.; SAWYER, R.G.; PRUETT, T.L. **Contribution of *Escherichia coli* alpha-hemolysin to bacterial virulence and to intraperitoneal alterations in peritonitis.** *Infect Immun.* v.

MARINS, B.R. **Segurança alimentar no contexto da vigilância sanitária: reflexões e práticas.** Rio de Janeiro: EPSJV, 2014. 288 p.

MARTINS, R.P.; DA SILVA, M.C.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; LEITE, D.S. **Preliminary virulence genotyping and phylogeny of *Escherichia coli* from the gut of pigs at slaughtering stage in Brazil.** *Meat Science*, v.93, n.3, p. 437-440, 2012.

MATEREKE, L.T.; OKOH, A.I. ***Listeria monocytogenes* Virulence, Antimicrobial Resistance and Environmental Persistence: A Review.** *Pathogens*, v. 9, p. 528, 2020.

MCMILLAN, E.A.; GUPTA, K.S.; WILLIAMS, E.L.; JOVÉ, HIOTT, L.M.; WOODLEY, T.A.; BARRET, J.B.; JACKSON, C.R.; WASILENKO, J.L.; SIMONS, M.; TILLMAN, G.; MCCLELLAND, M.; FRYE, J.G. **Antimicrobial Resistance Genes, Cassettes, and Plasmids Present in *Salmonella enterica* Associated With United States Food Animals.** *Frontiers in Microbiology*, v.10, 2019, p.832.

MELO, E.S.; WENDERSON, R.A.; PINHEIRO, R.E.E. CORRÊA, P.G.N.; CARVALHO, S.M.R.; MENG, Q.; BAI, X.; ZHAO, A. **Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from healthy pigs in China.** *BMC Microbiol.* v.14, n.5, 2014.

MENRATH, A.; WIELER, L.H.; HEIDEMANN, K. **Shiga toxin producing *Escherichia coli*: identification of non-O157:H7-Super-Shedding cows and related risk factors.** *Gut Pathogens*, v.2, p.1-9, 2010.

MELONI, D.; PIRAS, F.; MUREDDU, A.; FOIS, F.; CONSOLATI, S.G.; LAMON, S.; MAZZETTE, R. ***Listeria monocytogenes* in Five Sardinian Swine Slaughterhouses: Prevalence, Serotype, and Genotype Characterization.** *Journal of Food Protection*, v. 76, n.11, p.1863–1867, 2013.

MENDONÇA, E.P.; MELO, R.T.; OLIVEIRA, M.R.M; MONTEIRO, G.P.; FONSECA, P.A.B.; ROSSI, A.G.D. **Characteristics of virulence, resistance and genetic diversity of strains of *Salmonella* *Infantis* isolated from broiler chicken in Brazil.** *Pesq. Vet. Bras.*, v.40, n.1, 2020.

MORENO, L.Z.; PAIXÃO, R.; DE GOBBI, D.D.; RAIMUNDO, D.C.; PORFIDA FERREIRA, T.S.; MICKE MORENO, A.; HOFER, E.; DOS REIS, C.M.; MATTÉ, M.H. **Phenotypic and genotypic characterization of atypical *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* isolated from swine slaughterhouses and meat markets.** *Biomed Res Int.* v.1, article 742032, 2014.

MORGANTI, M., SCALTRITI, E.; CAZZOLINO, P.; BOLZONI, L.; CASADEI, G., PIERANTONI, M., FONI, E.; PANGOLINI, S. **Processing-Dependent and Clonal Contamination Patterns of *Listeria monocytogenes* in the Cured Ham Food Chain Revealed by Genetic Analysis.** *Applied and environmental microbiology*, v.82, n.3, p.822–831, 2016.

NAMVAR, A.; WARRINER, K. **Application of enterobacterial repetitive intergenic consensus-polymerase chain reaction to trace the fate of generic *Escherichia coli* within a high capacity pork slaughter line.** *Int J Food Microbiol.* v.108, n.2, p.155-63, 2006.

NEWELL, D.G.; KOOPMANS, M.; VERHOEF, L.; DUIZER, E.; AIDARA-KANE, A.; SPRONG, H.;

OPSTEEGH, M.; LANGELAAR, M.; THREFALL, J.; SCHEUTZ, F. **Food-borne diseases - The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge.** Int. J. Food Microbiol., v. 139, p.3-15, 2010.

NICOLAU, A.I. BOLOCAN, A.S. **Sampling the Processing Environment for *Listeria*.** In: JORDAN, K.; FOX, E.M.; WAGNER, M. ***Listeria monocytogenes: Methods and Protocols***, Methods in Molecular Biology. New York: Humana Press, 2014. p. 3-14.

OLIVEIRA, M.M.M.; BRUGNERA, D.F.; PICCOLI, R.H. **Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão.** Rev Inst Adolfo Lutz, São Paulo, v.69, p. 277-84, 2010. PACHECO-SILVA, E.; SOUZA, J.R.; CALDAS, E.D. **Resíduos de medicamentos veterinários em leite e ovos.** Quím. Nova v. 37, n.1, 2014.

PAILLARD, D.; DUBOIS, V.; DURAN, R.; NATHIER, F.; GUITTET, C.; CAUMETTE, P.; QUENTIN, C. **Rapid identification of *Listeria* species by using restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 23S rRNA gene fragments.** Applied and environmental microbiology, v. 69, n.11, p.6386-92, 2003.

PAL, M.; MERERA, O.; ABERA, M.T.F.; RAHMAN, R.A. **Salmonellosis: A major foodborne disease of Global significance.** Beverage & Food World , v. 42, n. 12, 2015.

PALMA, J.M.; LISBOA, R.C.; RODRIGUES, D.P.; SANTOS, A.F.M.; HOFER, E.; SANTANA, A.P. **Caracterização molecular de *Listeria monocytogenes* oriundas de cortes cárneos bovinos e de abatedouros frigoríficos de bovinos localizados no Distrito Federal, Brasil.** Pesquisa Veterinária Brasileira, v.36, n.10, p.957-964, 2016.

PAN, Y.; BREIDT JR, F.; KATHARIOU, S. **Resistance of *Listeria monocytogenes* Biofilms to Sanitizing Agents in a Simulated Food Processing Environment.** Applied and Environmental Microbiology, v. 72, n. 12, p. 7711-7717, 2006.

PATON, A. W.; PATON, J. C. **Direct Detection and Characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by Multiplex PCR for stx1, stx2, eae, ehxA and saa.** Journal of clinical microbiology. v. 40, n.1, p. 271-274, 2002.

PATON, A.W.; SRIMANOTE, P.; WOODROW, M.C.; PATON, C. **Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans.** Infect Immun. v.69, n.11, p.6999-7009, 2001.

PATON, A. W.; PATON. J. C. **Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157.** J. Clin. Microbiol. v.36, n.2, p. 598-602, 1998.

PENG, Z.; LIANG, W.; HU, Z. **O-serogroups, virulence genes, antimicrobial susceptibility, and MLST genotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from swine and cattle in Central China.** BMC Vet Res v.15, p.427, 2019.

PIRAS, F.; FOIS, F.; MAZZA, R.; PUTZOLU, M.; DELOGU, M.L.; LOCHI, P.G.; PANI, S.P.; MAZZETTE, R. ***Salmonella* prevalence and microbiological contamination of pig carcasses and slaughterhouse environment.** Italian Journal of Food Safety, v.3, n.4, 2014.

PÉRICHON, B.; COURVALIN, P.; STRATTON, C.W. **Antibiotic Resistance.** Encyclopedia of Microbiology (4th edition), Academic Press, p. 127-139, 2019.

PISSETTI, P.; WERLANG, G.O.; KICH, J.D.; CARDOSO, M. **Detecção de isolados *Escherichia coli* multirresistentes e genotipicamente relacionados em fezes e carcaças suínas.** Scientiae Veterinariae, v.44, n.1376, 2016.

- PRITCHETT, L.C.; KONKEL, M.E.; GAY, J.M.; BESSER, T.E. **Identification of DT104 and U302 phage types among *Salmonella enterica* serotype typhimurium isolates by PCR.** J Clin Microbiol., v.38, n.9, p. 3484-3488, 2000.
- QUADROS, C.L.; MANTO, L.; MISTURA, E.; WEBBER, B.; RITTERBUCH, G.A.; BORGES, K.A.; FURIAN, T.Q.; RODRIGUES, L.B.; DOS SANTOS, L.R. **Antimicrobial and Disinfectant Susceptibility of Salmonella Serotypes Isolated from Swine Slaughterhouses.** Curr Microbiol. v.77, n.6, p.1035-1042, 2020.
- RAHEEM, D. **Outbreaks of listeriosis associated with deli meats and cheese: an overview.** AIMS Microbiology, v.2, n.3, p.230-250, 2016.
- RAMOS, S.; SILVA, V.; DAPKEVICIUS, M.L.E.; CANI, M.; JUNCO-TEJEDOR, M.T.; IGREJAS, G.; POETA, P. ***Escherichia coli* as Commensal and Pathogenic Bacteria among Food-Producing Animals: Health Implications of Extended Spectrum-Lactamase (ESBL) Production.** Animals, v. 10, p. 2239, 2020.
- RIVAS, T.; VIZCAÍNO, J.; HERRERA, J.F. **Microbial Contamination of Carcasses and Equipment from an Iberian Pig Slaughterhouse.** Journal of Food Protection, v. 63, n. 12, p. 1670-1675, 2000.
- ROSENGREN, L.B.; WALDNER, C.L.; REID-SMITH, R.J. **Associations between Antimicrobial Resistance Phenotypes, Antimicrobial Resistance Genes, and Virulence Genes of Fecal *Escherichia coli* Isolates from Healthy Grow-Finish Pigs.** Appl. Environ. Microbiol, v.75, p.1373-1380, 2009.
- ROSSI, M. **Desenvolvimento do processo de cultivo de *Escherichia coli*.** 2001. 100p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Escola Politécnica da Universidade de São Paulo.
- RYSER, E.T.; DONNELLY, C.W. **Listeria.** In: SALFINGER, Y.; TORTORELLO, M.L. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 5 ed. American Public Health Association, 2015.
- SALA, C.; MORAR, A.; TÂRZIU, E.; NICHITA, I.; IMRE, M.; IMRE, K. **Environmental Occurrence and Antibiotic Susceptibility Profile of *Listeria monocytogenes* at a Slaughterhouse Raw Processing Plant in Romania.** Journal of Food Protection, v.79, n.10, p. 1794–1797, 2016.
- SANDRINI, C.N.M.; PEREIRA, M.A.; BROD, C.S.; CARVALHAL, J.B.; ALEIXO, J.A.G. ***Escherichia coli* verotoxigênica: isolamento e prevalência em 60 propriedades de bovinos de leite da região de Pelotas, RS, Brasil.** Rev. Ciência Rural, v.37, n.1, p.175-182, 2007.
- SANTOS, A.R.S.S.; BARROS, D.S.; OLIVEIRA, E.T.A.C.; MENDES, C.M.; SOUSA, F.V. **Doenças transmitidas por alimentos e principais agentes bacterianos envolvidos em surtos no Brasil: revisão.** PUBVET, v. 12, n. 10, p. 1-9, 2018.
- SANTOS, R.P.; FERREIRA, L.C. **Microbiological evaluation of the environment, utensils, surfaces and hands of the manipulators in a swine slaughtering unit in the city of Januária - MG.** Cad. Ciênc. Agra., v. 9, n. 1, p. 44-48, 2017.
- SATPATHY, S.; SEN, S. K.; PATTANAIK, S.; RAUT, S. **Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination.** Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, v. 7, p. 56-66, 2016.
- SCHLEGELOVA, J., NAPRAVNIKOVA, E., DENDIS, M., HORVATH, R., BENEDIK, J., BABAK, V., KLIMOVA, E. NAVRATILOVA, P. and SUSTACKOVA, A. **Beef carcass contamination in a slaughterhouse and prevalence of resistance to antimicrobial drugs in isolates of selected microbial species.** Meat Sci. v. 66, p. 557-565, 2004.

- SCHWAIGER, K.; HUTHER, S.; HOLZEL, C.; KAMPF, P.; BAUER, J. **Prevalence of antibiotic-resistant enterobacteriaceae isolated from chicken and pork meat purchased at the slaughterhouse and at retail in Bavaria, Germany.** J Food Microb. v.154, n.3, p.206–211, 2012.
- SCHWARTZ, T.; KOHNEN, W.; JANSEN, B.; OBST, U. **Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms.** FEMS Microbiology Ecology, v. 43, n. 3, p. 325-335, 2003.
- SERENO, M.J., VIANA, C.; PEGORARO, K.; LOPES DA SILVA, D.; YAMATOOGI, R.S.; NERO, L.A.; BERSOT, L.S. **Distribution, adhesion, virulence and antibiotic resistance of persistent *Listeria monocytogenes* in a pig slaughterhouse in Brazil.** Food Microbiology, 2019.
- SERENO, M.J.; ZIECH, R.E.; DRUZIANI, J.T.; PEREIRA, J.G.; BERSOT, L.S. **Antimicrobial Susceptibility and Biofilm Production by *Salmonella* sp. Strains Isolated from Frozen Poultry Carcasses.** Rev. Bras. Cienc. Avic., v.19, n.1, 2017.
- SHINOHARA, N.K.S.; BARROS, V.B.; JIMENEZ, S.M.C.; MACHADO, E.C.L.; DUTRA, R.A.F.; LIMA FILHO, J.L. ***Salmonella* spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos.** Ciência & Saúde Coletiva, v.13, n.5, p.1675–1683, 2008.
- SOUZA, C.O.; MELO, T.R.B.; MELO, C.S.B.; MENEZES, E.M.; CARVALHO, A.C.; MONTEIRO, L.C.R. ***Escherichia coli* enteropatôgena: uma categoria diarreogênica versátil.** Rev Pan-Amaz Saude v.7, n.2, 2016.
- STANFORD, K.; TRAN, F.; ZHANG, P.; YANG, X. **Biofilm-forming capacity of *Escherichia coli* isolated from cattle and beef packing plants: relation to virulence attributes, stage of processing, antimicrobial interventions, and heat tolerance.** Appl Environ Microbiol, 2021.
- STEENACKERS, H.; HERMANS, K.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S.C.J. **Salmonella biofilms: an overview on occurrence, structure, regulation and eradication.** Food Res. Int. v. 45, p. 502-531, 2012
- STEPANOVIĆ, S. VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. **A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation.** Journal of microbiological methods, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.
- STOCCO, C.W.; ALMEIDA, L.; BARRETO, E.H.; BITTENCOURT, J.V.M. **Microbiological quality control in beef cattle processing.** Rev Espacius, v. 38, n. 22, p. 9, 2017.
- STOCCO, C.W.; SECCHI, L.; SALAZAR, L.N.; WENDT, R. **Avaliação microbiológica em serras e facas em um frigorífico da Região Norte do Rio Grande do Sul.** Rev. Ciência e Tecnologia, v.1, n. 1, p. 40-43, 2015.
- SUTCLIFFE, J.; GREBE, T.; TAIT-KAMRAD, A.; WONDRACK, L. **Detection of erythromycin-resistant determinants by PCR.** Antimicrob Agents Chemother, v. 40, n. 11, p. 2562–2566, 1996.
- SWANENBURG, M.; URLINGS, H.A.P.; SNIJDERS, J.M.A.; KEUZENKAMP, D.A.; VAN KNAPEN, F. ***Salmonella* in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control points during slaughter in two slaughterhouses.** v.70, n. 3, p. 243-254, 2001.
- TAJBAKSH, E., AHMADI, P., ABEDPOU-DEHKORDI, E., ARBAB-SIKEIMANI, N., KHAMESIPOUR, F. **Biofilm formation, antimicrobial susceptibility, serogroups and virulence genes of uropathogenic *E. coli* isolated from clinical samples in Iran.** Antimicrob Resist Infect Control, v.1, p.5-11, 2016

TOLEDO, A.; GÓMEZ, D.; CRUZ, C.; CARREÓN, R.; LÓPEZ, J.; GIONO, S.; CASTRO, A.M. **Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from piglets in the suckling and weaning period in Mexico.** J Med Microbiol. v.61, pt. 1, p.148-156, 2012.

TODD, E.C.D.; NOTERMANS, S. **Surveillance of listeriosis and its causative pathogen *Listeria monocytogenes*.** Food Control, v. 22, p. 1484-1490, 2011.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (U.S. FDA). **Food Code**, 2013.

VALLIM, D.C.; HOFER, C.B. LISBOA, R.C.; BARBOSA, A.V.; RUSAK, L.A.; REIS, C.M.F.; HOGER, E. 2015 **Twenty Years of *Listeria* in Brazil: Occurrence of *Listeria* Species and *Listeria monocytogenes* Serovars in Food Samples in Brazil between 1990 and 2012.** BioMed Research International, v. 2015, article 540204, 2015.

VAN, T.T.; CHIN, J.; CHAPMAN, T.; TRAN, L.T.; COLOE, P.J. **Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes.** Int J Food Microbiol., v. 10, n. 124, p.217-23, 2008.

VASUDEVAN, R. **Biofilms: microbial cities of scientific significance.** J Microbiol Exp., v. 1, n. 3, p. 84-98, 2014.

VAZQUEZ-BOLAND, J.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMÍNGUEZ-BERNAL, G.; GONZÁLEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J.; KREFT, J. ***Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants.** Clin Microbiol Rev, v. 14, n. 3, p. 584-640, 2001.

VESTBY, L.K.; MØRETRØ, T.; LANGSRUD, S.; HEIR, E.; NESSE, L.L. **Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal and feed factories.** BMC Veterinary Research, v. 5, n. 20, 2009.

VIANA, C.; SERENO, M.J.; PEGORARO, K., YAMATOIGI, R.S.; CALL, D.R.; DOS SANTOS BERSOT, L.; NERO, L.A. **Distribution, diversity, virulence genotypes and antibiotic resistance for *Salmonella* isolated from a Brazilian pork production chain.** International Journal of Food Microbiology, v. 310, article 108310, 2019.

VIVIAN, C.C.U.; GANDRA, E.A.; CARVALHO, I.R.; DEMARI, A.C.D.; RODRIGUES, G.R.; PRETTO, S.M.S.; SCHEER, E.H.; MARCHI, G.M.M.; LAUTENCHLEGER, F.; MOURA, N.B.; HUTRA, D.J. ***Salmonella* spp. in liver processing in a pig slaughterhouse in the south of Brazil.** Research, Society and Development, v.10, n.2, 2021.

WANG, R. **Biofilms and Meat Safety: A Mini-Review.** J Food Prot, v. 82, n. 1, p. 120-127, 2019. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-311>

WANG, H.; YE, K.; WEI, X.; CAO, J.; XU, X.; ZHOU, G. **Occurrence, antimicrobial resistance and biofilm formation of *Salmonella* isolates from a chicken slaughter plant in China.** Food Control, v. 3, n. 1, p. 384, 2013.

WANG, R.; KALCHAYANAND, N.; SCHMIDT, J.W.; HARHAY, D.M. **Mixed biofilm formation by Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and *Salmonella* enterica serovar Typhimurium enhanced bacterial resistance to sanitization due to extracellular polymeric substances** Journal of Food Protection, v. 76, n.9, p.1513-1522, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Critically important antimicrobials for human medicine, Ranking of medically important antimicrobials for risk management of antimicrobial resistance due to non-human use - 6th rev.** Geneva, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Salmonella (non-typhoidal).** Fact sheets, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Listeriosis**. Fact sheets, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (WHO/FAO). **Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods**. Technical report, MRA Series 5, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Background document: the diagnosis, treatment and prevention of typhoid fever**. Geneva, 2003.

WU, B.; ED-DRA, A.; PAN, H.; DONG, DONG, C.; JIA, C.; YEU, M. **Genomic Investigation of *Salmonella* Isolates Recovered From a Pig Slaughtering Process in Hangzhou, China**. *Front. Microbiol.*, v. 12, article 704636, 2021.

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

YANG, S.C.; LIN, C.H.; ALJUFALLY, I.A. **Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development**. *Arch Microbiol.* v. 199, p. 811–825, 2017.

YIN, W.; LI, H.; SHEN, Y.; LIU, Z.; WANG, S.; SHEN, Z.; ZHANG, R.; WALSH, T.R.; SHEN, J.; WANG, Y. **Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli***. *mBio.* v. 8, n. 3, p. 1-6, 2017.