



## Adesão de *Salmonella* Enteritidis envolvida em surtos alimentares sob diferentes superfícies e condições ambientais

*Salmonella* Enteritidis adhesion involved in food outbreaks under different surfaces and environmental conditions

A. P. de Oliveira<sup>1\*</sup>; B. Webber<sup>2</sup>; E. S. Pottker<sup>2</sup>; L. Daroit<sup>3</sup>; L. R. dos Santos<sup>1</sup>; L. B. Rodrigues<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo, 99052-900, Passo Fundo, RS, Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Estatística, Instituto de Ciências Exatas e Geoeconômicas, Universidade de Passo Fundo, 99052-900, Passo Fundo, RS, Brasil.

\*amauri\_po@hotmail.com

(Recebido em 18 de setembro de 2019; aceito em 08 de novembro de 2019)

*Salmonella* Enteritidis é capaz de formar biofilmes no ambiente de processamento de alimentos podendo levar a surtos de doenças transmitidas por alimentos. Neste trabalho, avaliou-se a capacidade da *S. Enteritidis* formar biofilme em corpos de prova de aço inoxidável, polietileno e poliuretano a 3±1°C, 9±1°C, 25±1°C, 36±1°C e 42±1°C, após 0, 4, 8, 12 e 24 horas de incubação. Foram realizados testes com o uso de água a 45°C e a 85°C, e com soluções de ácido peracético e amônia quaternária para remoção dos biofilmes. Ambas as cepas aderiram no aço inoxidável, no polietileno e no poliuretano, e em todas as temperaturas de exposição, inclusive a 3°C e 9°C. O ácido peracético revelou-se o melhor tratamento na remoção dos biofilmes. De maneira geral, os resultados demonstraram que esses materiais, utilizados na indústria de alimentos, propiciaram a aderência das *S. Enteritidis* nas diferentes condições ambientais. Os resultados são importantes para o desenvolvimento de estratégias de controle de biofilmes na indústria, já que a presença desse microrganismo aderido pode comprometer a qualidade do alimento processado e consequentemente ter impacto na saúde pública.

Palavras-chave: biofilmes, superfícies, *Salmonella* Enteritidis.

*Salmonella* Enteritidis is able to form biofilms in food processing environment and can lead to foodborne disease outbreaks. In this work, we evaluated the ability of *S. Enteritidis* to form biofilm in stainless steel, polyethylene and polyurethane specimens at 3±1°C, 9±1°C, 25±1°C, 36±1°C and 42±1°C, after 0, 4, 8, 12 and 24 hours incubation. Tests were performed using water at 45°C and 85°C, and with solutions of peracetic acid and quaternary ammonia to remove biofilms. Both strains adhered to stainless steel, polyethylene and polyurethane, and at all exposure temperatures, including 3°C and 9°C. Peracetic acid proved to be the best treatment for biofilm removal. In general, the results showed that these materials, used in food industry, provided adhesion of *S. Enteritidis* under different environmental conditions. The results are important for development of biofilm control strategies in industry, since the presence of this adhered microorganism may compromise the quality of processed food and consequently have an impact on public health.

Keywords: biofilms, surfaces, *Salmonella* Enteritidis.

### 1. INTRODUÇÃO

A *Salmonella* é uma das bactérias que mais causam doenças transmitidas por alimentos (DTA) em todo o mundo, estando relacionada frequentemente em surtos de origem alimentar, geralmente associados ao consumo de carne de aves e ovos, acarretando em prejuízos econômicos em vários países [1, 2]. Quando capazes de formar biofilmes em superfícies de contato, possuem maior chance de transmissão aos alimentos processados [3].

Por estes motivos, o controle da formação de biofilmes é importante para a segurança dos alimentos, devido à adesão das bactérias em superfícies e utensílios em contato com os alimentos

e sua difícil remoção com agentes sanitizantes. Como estes biofilmes liberam células planctônicas, que são células que se desprendem dos biofilmes, estas células livres contaminam o alimento, estando os biofilmes associados aos surtos de doenças alimentares [3].

Dos 598 surtos de DTA notificados no Brasil em 2017, com 9.426 doentes, 1.439 hospitalizados e 12 óbitos relacionados, dentre os agentes etiológicos identificados como únicos responsáveis pelos surtos confirmados laboratorialmente (89 surtos), está a *Salmonella* spp. (14,6%/13 surtos) [2].

A *S. Enteritidis* (SE) é o principal sorovar isolado de humanos e alimentos e um dos principais isolados em animais, rações e amostras ambientais, além de ser um grande causador de infecções alimentares [1, 2]. Por este motivo, avaliou-se a sua habilidade em formar biofilmes em superfícies de aço inoxidável, polietileno e poliuretano, em diferentes condições ambientais, assim como o agente de sanitização mais eficaz para a redução e/ou eliminação deste problema em abatedouros avícolas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Amostras de *Salmonella* Enteritidis

Foram analisadas duas amostras de *Salmonella* Enteritidis (SE), quanto à capacidade de adesão à superfícies comumente usadas na indústria de alimentos. As cepas de SE foram previamente isoladas e confirmadas geneticamente por Microarray pelo equipamento Check&Trace (R-Biopharm AG, Darmstadt, Germany). Ambas as cepas são provenientes de surtos, sendo uma isolada de fezes (coprocultura), identificada como SE 24 e a outra isolada de maionese com batatas, identificada como SE 69.

### 2.2 Preparação de corpos de prova

Foram utilizados, como corpos de prova, superfícies de aço inoxidável AISI 316, polietileno e poliuretano, com 1 cm<sup>2</sup> de diâmetro e 0,1 cm de espessura. Os materiais utilizados para a preparação dos corpos de prova foram obtidos do ambiente de processamento de cortes de aves. Os corpos de prova foram limpos manualmente com esponja, água e detergente líquido neutro, enxaguados com água destilada, imersos em álcool etílico 70% (v/v) por 1 hora a temperatura ambiente, enxaguados mais uma vez e esterilizados em autoclave a 121°C por 30 minutos.

### 2.3 Testes de adesão de *Salmonella* Enteritidis

Para a avaliação de adesão de SE, os corpos de prova foram colocados individualmente em microplacas estéreis de poliestireno com 12 poços (Nest@Biotech Co. Ltd, Rahway, NJ, USA). Foi adicionado 2,75 mL de caldo tripton de soja sem glicose (TSB without glucose, Difco@ Laboratories, Sparks, MD, EUA) e 250µL de culturas individuais de cada SE, com aproximadamente 10<sup>3</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> em cada poço. Esta população foi verificada, em todo o experimento, por semeadura em placas contendo Ágar Padrão de contagem (PCA, HiMedia@ Laboratories, Mumbai, Índia).

Os corpos de prova de aço inoxidável, polietileno e poliuretano foram imersos na cultura de cada microrganismo (SE 24 e SE 69) e incubados a 42±1°C, 36±1°C, 25±1°C, 9±1°C e 3±1°C, simulando as temperaturas do ambiente de processamento, ótimas dos microrganismos e de termotolerância, e avaliados nos tempos 0, 4, 8, 12 e 24 horas, simulando os períodos para higiene operacional e pré-operacional em abatedouros de aves em triplicata [4, 5].

Nos tempos determinados, os cupons foram removidos dos meios de cultivo com o auxílio de pinças esterilizadas, imersos em 5 mL de Água Peptonada 0,1% (AP, HiMedia@ Laboratories, Mumbai, Índia), por 1 minuto, para a remoção de células planctônicas, colocados em tubos com Água Peptonada 0,1%, e sonicados por 10 minutos em banho de ultrassom (frequência de 40 kHz e potência de 81 W) para desadesão de células sésseis [6]. Cinco gotas de 10 µL de cada diluição foram inoculadas em placa de Petri contendo Ágar PCA, utilizado o método de contagem em gota (*drop plate*) e incubadas por 24 horas a 37 ± 1°C.

Para o cálculo dos resultados, foi utilizada a seguinte fórmula:  $UFC.cm^{-2} = (VD/VA) \cdot Av$ . Av, D/A, em que VD foi o volume do diluente usado no enxágue (5 mL), VA o volume da alíquota usada no plaqueamento (0,05 mL ou 0,1 mL), Av a média de contagem obtida nas placas (UFC), D a diluição utilizada na contagem, e A a área do corpo de prova (2 cm<sup>2</sup>) expressa em log<sub>10</sub>. UFC.cm<sup>-2</sup> [7, 8].

#### 2.4 Avaliação dos procedimentos de higienização

Após a retirada das células planctônicas, os corpos de prova foram colocados em 5 mL de água estéril e aquecida a 45°C ou 85°C por 3 minutos e em solução de ácido peracético a 0,5% (Kalykim®, Alvorada, RS) ou 1% quaternária amônia (Kalykim®, Alvorada, RS, Brasil) por 5 minutos, e o controle era água estéril à temperatura ambiente.

Em seguida, os corpos de prova foram imersos em 5 mL de Água Peptonada 0,1% com neutralizador universal (0,2% de lecitina de soja, 2% de tween, 0,25% de tiosulfato de sódio, 0,1% de água peptonada e 1 L de água destilada) por 1 minuto, a fim de parar a ação do sanitizante [8, 9]. Individualmente cada cupom foi colocado em tubos com 5 mL de Água Peptonada 0,1% e sonificados em banho de ultrassom para desadesão de células sésseis. O líquido remanescente foi inoculado em placa de ágar com a técnica da gota, como descrito anteriormente no item 2.3.

#### 2.5 Análise estatística

A comparação das médias foi realizada com o teste de Tukey a 5% de probabilidade, e os resultados foram analisados por variância [10, 11].

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Adesão nas diferentes superfícies

Houve adesão de SE no aço inoxidável, no polietileno e no poliuretano. Entretanto, houve maior adesão no polietileno em ambas as amostras, conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Adesão de *Salmonella Enteritidis* sob diferentes superfícies.

CEPA	SUPERFÍCIES*		
	Aço inoxidável	Polietileno	Poliuretano
SE 24	6,19 Aa	7,12 Ba	6,50 Aa
SE 69	6,22 ABa	6,56 ABb	5,94 Ab

\*Resultados em log<sub>10</sub>.UFC.cm<sup>-2</sup>. As médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas linhas, e das mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

A adesão de microrganismos a uma superfície está intimamente relacionada com as propriedades do material testado. Relatos têm demonstrado que a *Salmonella* consegue formar biofilmes em superfícies abióticas, como plástico, borracha, cimento, vidro e aço inoxidável [9, 12, 13, 14, 15, 16].

Na indústria de alimentos, o aço inoxidável tem sido o material mais utilizado por ter maior facilidade no processo de limpeza e desinfecção, quando comparado com a ampla variedade de polímeros. Porém, sua aplicabilidade é limitada em locais que são necessários materiais flexíveis [4, 17]. Em abatedouros de frangos de corte, se destacam as esteiras de poliuretano e os utensílios fabricados com polietileno, principalmente as placas de corte [18, 19, 20].

Algo preocupante para a indústria de alimentos foi a capacidade das SE aderirem no aço inoxidável e formarem biofilme com a mesma capacidade de adesão ao poliuretano em ambas amostras. Vale ressaltar que por ser uma superfície menos irregular, o aço inoxidável possui maior adequação aos processos de higienização.

Houve maior adesão de SE no polietileno, possivelmente por ser uma superfície de natureza polimérica. Sinde e Carballo (2000) [21] afirmam que as placas de corte de polietileno apresentam superfícies irregulares, o que facilita a deposição de material orgânico dificultando a ação dos

agentes desinfetantes. Em contrapartida, o polietileno é muito usado por ser atóxico e proporcionar menor desgaste das facas de corte [22].

Stepanovic et al. (2004) [23], observaram a formação de biofilme por *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* em superfície de plástico e ambos microrganismos produziram biofilme. Ao observar o meio de crescimento, a *Salmonella* spp. produziu mais biofilme em meio mais limitado em nutrientes, enfatizando o uso do TSB sem glicose em nossa pesquisa. Rodrigues et al. (2009) [24] corroboram com estudos sobre a capacidade de desenvolvimento de biofilme por *Salmonella* spp. em ambiente sem glicose, observaram que nessas condições amostras de *S. Heidelberg* foram capazes de formar biofilme em poliestireno.

Os resultados demonstram que tanto o aço inoxidável, quanto o polietileno e o poliuretano, materiais presentes na indústria de alimentos, propiciaram a aderência de *S. Enteritidis*. Fato preocupante para a indústria de alimentos e para a saúde dos consumidores, devido à potencial contaminação cruzada durante o processamento de alimentos.

### 3.2 Efeito das temperaturas na adesão de *Salmonella* Enteritidis

Os abatedouros avícolas brasileiros que exportam seus produtos para a União Europeia (UE) devem garantir no resfriamento dos produtos temperatura de no máximo 4°C e na sala de cortes temperatura ambiente não superior a 10°C, respeitando, assim, o regulamento técnico da inspeção tecnológica e higiênico-sanitária, conforme a Portaria nº 210 [25].

Partindo deste pressuposto, mimetizou-se as temperaturas preconizadas em abatedouros avícolas: 3±1°C, temperatura de resfriamento; 9±1°C, temperatura da sala de cortes para EU; 25±1°C, temperatura ambiente; 36±1°C, padrão ótimo para crescimento de mesófilos; e 42±1°C, temperatura de enriquecimento seletivo para *Salmonella*, devido à termotolerância.

Ambas SE tiveram a capacidade de aderir nas temperaturas de 3°C, 9°C, 25°C, 36°C e 42°C. No entanto, observou-se uma maior adesão da *S. Enteritidis* com o aumento das temperaturas de incubação, conforme a Tabela 2 e as Figuras 1 e 2.

Tabela 2: Adesão de *Salmonella* Enteritidis sob diferentes temperaturas.

CEPA	TEMPERATURAS*				
	3°C	9°C	25°C	36°C	42°C
SE 24	6,08 Aa	6,41 ABa	6,84 Ba	6,88 Ba	6,80 Ba
SE 69	5,77 Aa	5,91 Ab	6,47 ABCa	6,81 BCa	6,23 ABCb

\* Resultados em  $\log_{10}$ .UFC.cm<sup>-2</sup>. As médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas linhas, e das mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

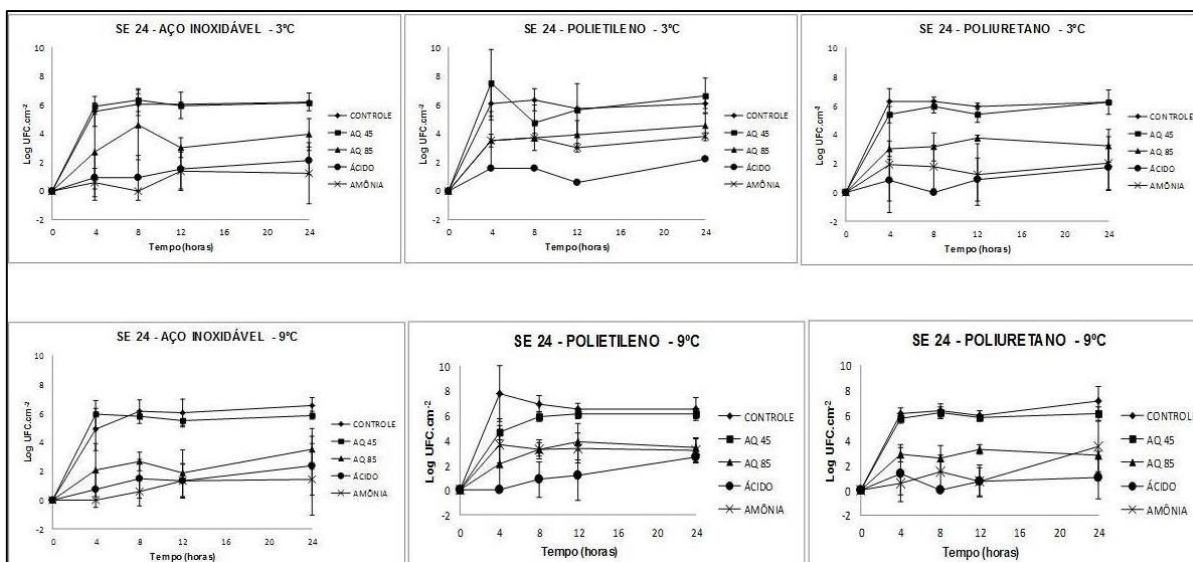


Figura 1: Adesão de *Salmonella Enteritidis* 24 em diferentes superfícies sob temperaturas de refrigeração e frente a procedimentos de higienização.

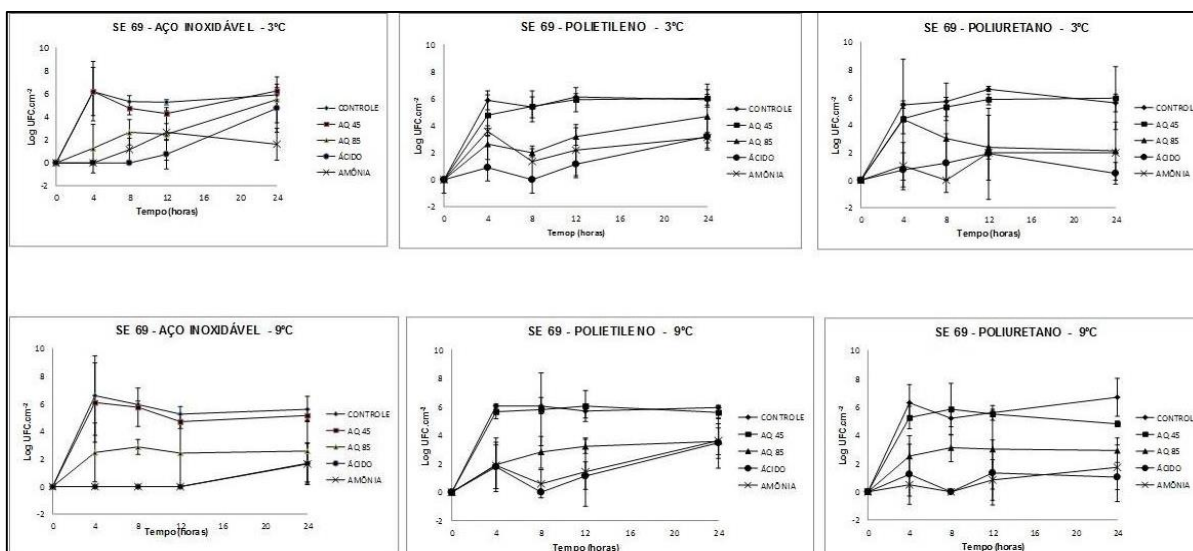


Figura 2: Adesão de *Salmonella Enteritidis* 69 em diferentes superfícies sob temperaturas de refrigeração e frente a procedimentos de higienização.

Enfatiza-se a adesão de *S. Enteritidis* na temperatura de 3°C nas superfícies de aço inoxidável, polietileno e poliuretano, descrita anteriormente como possível para crescimento de *Salmonella* spp. [26]. Fato este preocupante, uma vez que as temperaturas de refrigeração atuam na conservação dos alimentos inibindo o crescimento microbiano.

Morey e Singh (2012) [27] salientam que temperaturas baixas, como 4°C e 8°C, foram fatores importantes na determinação da sobrevivência e crescimento de *S. Typhimurium* e *S. Heidelberg*. Em nosso estudo destaca-se, também, a importância da manutenção de alimentos a temperaturas de refrigeração o mais próximo possível de 0°C, pois a adesão a 9°C foi semelhante à temperatura ótima na SE 24 e à temperatura ambiente e de termotolerância na SE 69.

Rode et al. (2007) [28] e Reuter et al. (2010) [29] citam que os microrganismos na forma de vida sésil adaptam-se melhor ao meio, e isso permite a sobrevivência e crescimento sob condições prejudiciais e estressantes. Os resultados reportados corroboram com esta possibilidade de desenvolvimento de biofilmes de SE em condições inóspitas de temperaturas baixas.

### 3.3 Efeito do tempo na adesão de *Salmonella* Enteritidis

Os abatedouros avícolas devem ser limpos e sanificados após o término do processo produtivo. Esse processo é realizado no final do turno de abate, sendo conhecido como higiene pré-operacional, e ocorre a cada 12 e 24 horas. Durante o processo produtivo, em tempos de 4 e 8 horas costuma-se realizar a chamada higiene operacional.

Ao mimetizar os tempos preconizados no processo de higienização operacional, 4 e 8 horas, e pré-operacional, 12 e 24 horas, ambas SE não revelaram diferença significativa na adesão de SE após 4, 8, 12 e 24 horas de incubação, conforme a Tabela 3.

Tabela 3: Adesão de *Salmonella Enteritidis* sob diferentes tempos.

CEPA	TEMPOS*				
	0 horas	4 horas	8 horas	12 horas	24 horas
SE 24	0,00 Aa	6,57 Ba	6,65 Ba	6,66 Ba	6,53 Ba
SE 69	0,00 Aa	6,56 Ba	5,99 Bb	6,08 Bb	6,32 Ba

\* Resultados em  $\log_{10}$ .UFC.cm<sup>-2</sup>. As médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas linhas, e das mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

Ressalta-se a importância do processo de higiene operacional em intervalos de poucas horas durante o processo produtivo, evitando que resíduos aderidos se tornem fontes de contaminação, e não somente o término do processamento para que seja realizada apenas a higiene pré-operacional. Parizzi e Andrade (2004) [30] salientam que o número de células aderidas nas superfícies aumentarão com o tempo de contato do microrganismo, consequentemente, quanto maior a taxa de contaminação mais prejudicada a higienização.

As falhas nos procedimentos de higienização permitem que os resíduos aderidos aos equipamentos e superfícies transformem-se em potencial fonte de contaminação. Sob determinadas condições, os microrganismos se aderem, interagem com as superfícies e iniciam crescimento celular [30].

### 3.4 Tratamentos de higienização

Entre os tratamentos testados o ácido peracético 0,5% se mostrou o melhor na remoção dos biofilmes nas três superfícies, em todas as temperaturas e tempos de adesão, seguido pela ação da amônia quaternária a 1%, da água estéril aquecida a 85°C e da água estéril aquecida a 45°C, conforme a Tabela 4. Nossos resultados corroboram ao relatado por Webber et al. (2019) [26], que obteve melhor redução de biofilmes em *S. Enteritidis*, de origem avícola, em diferentes superfícies com o uso do ácido peracético.

Tabela 4: Remoção de biofilmes de *Salmonella Enteritidis* provenientes de surtos de DTA, nas superfícies de aço inoxidável, polietileno e poliuretano frente a diferentes procedimentos de higienização.

CEPA	TRATAMENTOS*				
	CONTROLE	H2O 45°C	H2O 85°C	ÁCIDO PERACÉTICO 0,5%	AMÔNIA QUATERNÁRIA 1%
SE 24	6,60 Aa	6,18 Ba	2,86 Ca	1,18 Da	2,17 Ea
SE 69	6,24 Ab	5,57 Bb	2,37 Cb	1,33 Da	1,69 Db

\* Resultados em  $\log_{10}$ .UFC.cm<sup>-2</sup>. As médias seguidas das mesmas letras maiúsculas nas linhas, e das mesmas letras minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey (P>0,05).

Na Diretiva 471/2001 da UE, no teste de superfícies, o nível aceitável é até no máximo 10 UFC.cm<sup>-2</sup> (1,5  $\log_{10}$ UFC.cm<sup>-2</sup>) de microrganismos mesófilos e 1 UFC.cm<sup>-2</sup> (0,15  $\log_{10}$ UFC.cm<sup>-2</sup>) de enterobactérias. Os estabelecimentos habilitados à exportação para a União Europeia devem atender a esta diretiva [31]. Entretanto, para testes de superfícies em contato com alimentos, de acordo com a norma EN 13697:2001 da União Europeia, os procedimentos de sanitização devem realizar uma redução de no mínimo 4 log na contagem bacteriana [15, 32].

Ao avaliar a média de redução em todas as superfícies e tempos de incubação, na amostra SE 24 obteve-se uma redução de 5,42  $\log_{10}$ UFC.cm<sup>-2</sup> após contato com o ácido peracético, 4,43

$\log_{10}\text{UFC.cm}^{-2}$  com uso de amônia quaternária e  $3,74 \log_{10}\text{UFC.cm}^{-2}$  com a água estéril a  $85^{\circ}\text{C}$ . A SE 69 obteve redução de  $4,91 \log_{10}\text{UFC.cm}^{-2}$  com o uso do ácido peracético,  $4,55 \log_{10}\text{UFC.cm}^{-2}$  após o a amônia quaternária e  $3,87 \log_{10}\text{UFC.cm}^{-2}$  após a água a  $85^{\circ}\text{C}$ . Os sanitizantes demonstraram eficácia na redução dos biofilmes e o uso da água a  $85^{\circ}\text{C}$  ficou muito próximo da redução de 4 log exigida [32].

Vale ressaltar que a água estéril aquecida a  $45^{\circ}\text{C}$  não atendeu as recomendações para higienização de uma superfície conforme norma EN 13697:2001 [32], para ambas SE. Destaca-se a necessidade do uso de pressão junto com a água estéril aquecida a  $45^{\circ}\text{C}$ , conforme Contreras et al. (2002) [33], para obter uma boa eficácia da etapa de pré-enxágue.

Silva et al. (2014) [34] e Sinde e Carballo (2000) [21] relatam a eficácia dos sanitizantes frente à SE, e ressaltam que a redução da aderência depende das propriedades do material testado. Já Borowsky et al. (2006) [35] demonstraram a resistência de amostras de *S. Typhimurium* após 5 minutos de exposição aos sanitizantes, mas, após 15 minutos de contato nenhuma foi resistente.

A sobrevivência dos microrganismos à desinfecção é frequentemente associada com a presença de biofilmes em superfícies [36]. Os biofilmes constituem uma forma privilegiada de vida para as bactérias, e uma compreensão mais clara dos processos envolvidos é crucial para o seu controle.

A melhor opção para a remoção de biofilmes de SE, em superfícies usadas comumente em abatedouros, é a utilização de ácido peracético como agente sanitizante e o uso da água aquecida a  $85^{\circ}\text{C}$  para os utensílios. Além disso, esses resultados salientam a necessidade de emprego de ação mecânica em conjunto à ação química na remoção dos biofilmes. Os resultados demonstraram a importância dos procedimentos de higiene, já que a formação de biofilme pode ocorrer em um curto período, o que enfatiza a necessidade de bons procedimentos de higienização durante todo o processamento de alimentos.

#### 4. CONCLUSÃO

*Salmonella* Enteritidis foi capaz de aderir nas superfícies testadas, sendo o polietileno a superfície com maior adesão. A SE 24 e SE 69 aderiram em todas as temperatura, inclusive nas propícias para a conservação dos alimentos,  $3^{\circ}\text{C}$  e  $9^{\circ}\text{C}$ . Comparando os sanitizantes testados, o ácido peracético foi o melhor tratamento na remoção de *Salmonella* Enteritidis.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WHO-World Health Organization. *Salmonella*. 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/salmonella/en/>>. Acesso em: 20 fev. 2018.
2. BRASIL. Ministério da Saúde. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil Informe (2018). Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresentacao-Surtos-DTA-Fevereiro-2019.pdf>>. Acesso em: 20 jun. 2019.
3. Van Houdt R, Michiels CW. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *J Appl Microbiol*. 2010;109:1117-1131. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04756.x
4. Rossoni EMM, Gaylarde CC. Comparison of sodium hypochlorite and peracetic acid as sanitising agents for stainless steel food processing surfaces using epifluorescence microscopy. *Int J Food Microbiol*. 2000;61:81-85.doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00369-X
5. Kusumaningrum HD, Riboldi G, Hazeleger WC, Beumer RR. Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *Int J Food Microbiol*. 2003;83(3):227-236. doi:10.1016/s0168-1605(02)00540-8
6. Scherba G, Eigel RM, O'Brien WD. Quantitative assessment of the germicidal efficacy of ultrasonic energy. *Appl Environ Microbiol*. 1991;57:2079-2084. PubMed PMID: 1892396
7. Gibson H, Taylor JH, Hall KE, Holah JT. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. *J Appl Microbiol*. 1999;87:41-48. doi:10.1046/j.1365-2672.1999.00790.x
8. ISO 18593:2012. (2012). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs. ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. 8 p.
9. Joseph B, Otta SK, Karunasagar IV. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. *Int J Food Microbiol*. 2001;64:367-372. doi:10.1016/s0168-1605(00)00466-9

10. Assitat: Versão 7.7 beta. DEAG-CTRN-UFCG - Atualizado em 01 de abril de 2014. Disponível em: <www.assitat.com>. Acesso em: 20 fev. 2018.
11. Silva FAS. ASSISTAT: Versão 7.7 beta. DEAG-CTRN-UFCG - Atualizado em 01 de abril de 2014. Disponível em: <www.assitat.com>. Acesso em: 20 fev. 2018.
12. Solano C, Garcia B, Valle J, Berasain C, Ghigo JM, Gamazo C, Lasa I. Genetic analysis of *Salmonella* Enteritidis biofilm formation: critical role of celucose. *Mol Microbiol.* 2002;43(3):793-808. doi:/doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02802.x
13. Prouty AM, Gunn JS. Comparative analysis of *Salmonella enteric* serovar Typhimurium biofilm formation in gallstones and on glass. *Infect Immun.* 2003;70(5):2640-2649. doi:10.1128/IAI.71.12.7154-7158.2003
14. Arnold JW, Yates IE. Interventions for control of *Salmonella*: clearance of microbial growth from rubber picker fingers. *Poultry Sci.* 2009;88(6):1292-1298. doi:10.3382/ps.2008-00391
15. Moreto T, Vestby LK, Nesse LL, Hannevik S, Koltarz K, Lansurd S. Evaluation of efficiency of disinfectants against *Salmonella* from the feed industry. *J Appl Microbiol.* 2009;106:1005-1012. doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04067.x
16. O'Leary D, McCabe EM.; Mccusker MP, Martins M, Fanning S, Duffy G. Microbiological study of biofilm formation in isolates of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104 and DT104b cultured from the modern pork chain. *International J Food Microbiol.* 2013;161:36-43. Doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.11.021
17. Holah JT, Thorpe RH. Cleanability in relation to bacterial retention on unused abraded domestic sink materials. *J Appl Microbiol.* 1990;69(4):599-608. doi:10.1111/j.1365-2672.1990.tb01554.x
18. Carpentier B. Sanitary quality of meat chopping board surfaces: a bibliographical study. *Food Microbiol.* 1997;14: 31-37. doi:10.1006/fmic.1996.0061
19. Steenackers H, Hermans K, Vanderleyden J.; Keersmaecker SCJ. *Salmonella* biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. *Food Res Int.* 2012;45:502-531. doi:10.1016/j.foodres.2011.01.038
20. Rodrigues LB, Santos LR, Rizzo NN, Tagliari VZ, Trenhago G, Oliveira AP, Ferreira D, Pilotto F, Nascimento VP. *Salmonella* and *Listeria* from Stainless Steel, Polyurethane and polyethylene Surfaces in the Cutting Room of a Poultry Slaughterhouse. *Acta Sci Veterin.* 2013;41:1-7.
21. Sinde E, Carballo J. Attachment of *Salmonella* sp. and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiol.* 2000;17(4):439-447. doi:10.1006/fmic.2000.0339
22. Oliveira FA, Brandelli A, Tondo EC. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis from foods involved in human salmonellosis outbreaks in southern Brazil. *New Microbiolog.* 2006;29:49-54.
23. Stepanovic S, Irkovic IC, Ranin L, Svabic-Vlahovic M. Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett Appl Microbiol.* 2004;38:428-432. doi:10.1111/j.1472-765x.2004.01513.x
24. Rodrigues LC, Santos LR, Rizzo NN, Tagliari VZ, Oliveira AP, Trenhago G, Rodegheri SC, Tagliati RM, Dickel EL, Nascimento VP. Hydrophobicity and biofilm formation on polystyrene by *Salmonella* Heidelberg isolated from a poultry slaughterhouse. *Acta Sci Veterin.* 2009;37:225-230.
25. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (1998). Portaria nº 210, de 10 de novembro de 1998. Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiênico-Sanitária de Carne de Aves. Diário Oficial da União de 26 nov., seção 1, p. 226.
26. Webber B, Oliveira AP, Pottker, ES, Daroit L, Levandowski R, Santos LR, Nascimento VP, Rodrigues LB. *Salmonella* Enteritidis forms biofilm under low temperatures on different food industry surfaces. *Ci Rural.* 2019;49(7).doi:10.1590/0103-8478cr20181022
27. Morey A, Singh S. Low-Temperature Survival of *Salmonella* spp. in a Model Food System with Natural Microflora. Department of Poultry Science, Auburn University, Auburn, Alabama. *Foodborne Pathog Dis.* 2012;9(3).doi:10.1089/fpd.2011.1016
28. Rode TM, Langsrud S, Holck A, Moretro T. Different patterns of biofilm formation in *Staphylococcus aureus* under food-related stress conditions. *Int J Food Microbiol.* 2017;116:372-383. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.02.017
29. Reuter M, Mallett A, Pearson BM, Van Vliet AH. Biofilm formation by *Campylobacter jejuni* is increased under aerobic conditions. *Appl Environm Microbiol.* 2010;76:2122-2128. doi:10.1128/aem.01878-09
30. Parizzi SQF, Andrade NJ. Bacterial Adherence to Different Inert Surfaces Evaluated by Epifluorescence Microscopy and Plate Count Method. *J Braz Arch Biol Techn.* 2004;47:77-83. doi:10.1590/s1516-89132004000100011
31. União Europeia. Diretiva 2001/471/CE de 21 de junho de 2001. Regras para os controles regulares à higiene geral dos estabelecimentos. Comissão da Comunidades Europeias, Europa, 2001a.



32. União Europeia. NS-EN 13697:2001: Quantitative Non-Porous Surface Test for the Evaluation of Bactericidal and/or Fungicidal Activity of Chemical Disinfectants used in Food, Industrial, Domestic and Institutional Areas. Test Method and requirements without Mechanical Action. Brussels, Belgium: European Committee for standardization. Europa, 2001b.
33. Contreras CJ, Bromberg R, Cipolli KMVAB, Miyagusku L. Higiene e sanitização na indústria de carnes e derivados. São Paulo: Varela, 2002. 181 p.
34. Silva CF, Gehlen SS, Webber B, Diedrich LN, Pilotto F, Santos LR, Tondo EC, Nascimento VP, Rodrigues LB. Biofilm Former *Salmonella* Enteritidis are Multiresistant to Antibiotics. Acta Sci Veterin. 2014;42:1-8.
35. Borowsky LM, Bessa MC, Cardoso MI, Avancini CAM. Sensibilidade e resistência de amostras de *Salmonella* Typhimurium isoladas de suínos abatidos no Rio Grande do Sul/Brasil frente aos desinfetantes químicos quaternário de amônio e iodoform. Cia Rural. 2006;36:76-79.doi:10.1590/s0103-84782006000500020
36. Bressler DC, Balzer M, Dannehl A, Flemming HC, Wingender J. Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in drinking-water biofilms on elastomeric material. Water Sci Technol. 2009;9:81-87.doi:10.2166/ws.2009.026