

JULIANA NUNES CARVALHO

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS,
DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA E PERFIL DE
RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS**

RECIFE

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JULIANA NUNES CARVALHO

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS PSICROTRÓFICAS,
DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA E PERFIL DE
RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do
grau de Doutor em Ciência Veterinária.

Orientadora: Profa. Dra. Emiko Shinozaki Mendes

RECIFE

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

C331i Carvalho, Juliana Nunes
Identificação molecular de bactérias psicrotróficas, detecção de genes de virulência e perfil de resistência a antimicrobianos / Juliana Nunes Carvalho. – Recife, 2019.
82 f.: il.

Orientador: Emiko Shinozaki Mendes.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Recife, BR-PE, 2019.

Inclui referências e anexo(s).

1. Microbiologia 2. Leite - Contaminação 3. Laticínios
4. Listeriose 5. Drogas - Resistência em micro-organismos
6. Antibióticos I. Mendes, Emiko Shinozaki, orient. II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS PSICOTRÓFICAS,
DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA E PERFIL DE RESISTÊNCIA A
ANTIMICROBIANOS**

Tese de Doutorado elaborada por JULIANA NUNES CARVALHO

Aprovada em 27/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. EMIKO SHINOZAKI MENDES
Orientadora – Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Prof. Dr. PAULO ROBERTO ELEUTÉRIO DE SOUZA
Departamento de Biologia da UFRPE

Profa. Dra. NEIDE KAZUE SAKUGAWA SHINOHARA
Departamento de Tecnologia Rural da UFRPE

Dra. ANDRÉA CHRISTIANNE GOMES BARRETTO
Instituto Federal de Pernambuco

Dra. MONIQUE MONTEIRO PINTO MARIZ
Núcleo de Apoio à Saúde da Família – Goiana/PE

DEDICATÓRIA

*A meus pais, Nely e Júlio, sempre!
Nada seria sem vocês.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua imensa sabedoria e infinita bondade nos planos que traça para cada um de nós.

Ao Programa de Pós-Gaduação em Ciência Veterinária e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade de formação e concessão da bolsa de doutorado.

À Professora Emiko Shinozaki Mendes, pelas orientações de todos esses anos e lições que levarei para a vida, sem a qual essa tese não teria sido possível.

Ao Professor Paulo Eleutério de Souza, por toda a paciência, disponibilidade, material e esclarecimentos prestados no âmbito da biologia molecular.

À Professora Anamélia Domingues e à equipe de profissionais e alunos da Unidade Acadêmica de Garanhuns pela colaboração imprescindível na realização do experimento.

A Rejane de Oliveira Luna, Carolina Notaro de Barros e Arthur Vinícius Lago pela colaboração direta na execução desse projeto.

A meu pai, Júlio Nunes e Silva, meu porto seguro, por ser o melhor pai que uma filha poderia desejar. Palavras são insuficientes para expressar o quão é importante.

A meus anjos da guarda, minha mãe, Nely Carvalho Ribeiro, e minha avó, Geresa da Silva Nunes, por me guiarem e protegerem de onde estão.

À minha família e amigos, por sempre me incentivarem ao estudo.

A “Vó” Josilda Notaro, que me acolheu em sua casa, quase como neta, durante a etapa do experimento realizada em Garanhuns.

A Luiz Diego de Albuquerque pela compreensão da ausência, força nos momentos de fraqueza e colo nos difíceis.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho de tese.

RESUMO

A refrigeração do leite na propriedade produtora constitui importante método de conservação da matéria-prima, porém, pode favorecer o desenvolvimento de bactérias psicotróficas deteriorantes e patogênicas oportunistas, como *Listeria monocytogenes*. Objetivou-se avaliar o leite produzido no agreste de Pernambuco quanto à concentração de bactérias psicotróficas e suas características enzimáticas, identificando aquelas com potencial deteriorante, bem como verificar a ocorrência de *Listeria* spp. potencialmente patogênicas qualificando-as quanto ao perfil de resistência a antimicrobianos. A concentração média de bactérias psicotróficas foi de $2,1 \times 10^5$ UFC/mL de leite cru refrigerado. Apesar disso, em 58,3% das fazendas, as contagens foram abaixo de 10 UFC/mL. A atividade lipolítica e/ou proteolítica foi demonstrada por 38% dos isolados psicotróficos, que foram identificados em 13 espécies. *Aeromonas*, *Exiguobacterium* e *Staphylococcus* foram gêneros dominantes, cobrindo 77% dos isolados e, em menor frequência, *Macrococcus*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Enterococcus* e *Lactococcus*. Quanto à pesquisa de *Listeria* spp., foram obtidos 140 isolados presuntivos, dos quais 32,85% foram confirmados para o gênero *Listeria*. Desses, 8,69% apresentaram os três genes de virulência pesquisados – *hlyA*, *inlA* e *actA*, indicando que esses isolados possuem propriedades de uma cepa virulenta. O perfil de resistência a antimicrobianos das *Listeria* spp. testadas demonstrou que vancomicina, gentamicina e tetraciclina são as drogas mais eficientes contra essas bactérias. A ampicilina foi o antimicrobiano com maior índice de resistência, apresentada por 60,87% dos isolados. Os resultados deste trabalho permitem inferir possíveis falhas na produção e armazenamento de leite cru e adequar os procedimentos higiênico-sanitários e de controle, a fim de evitar alta concentração de bactérias psicotróficas e consequente produção de enzimas deteriorantes. Infere-se ainda que o leite produzido e estocado a frio no agreste de Pernambuco constitui um risco à saúde pública e à cadeia produtiva leiteira do Estado pela presença de *Listeria* spp. potencialmente patogênicas e multirresistentes a antimicrobianos.

Palavras-chave: Microbiologia, produtos lácteos, deterioração, listeriose, resistência a antibióticos.

ABSTRACT

The cooling of the milk in the producing property is an important method of preserving the raw material, but may favor the development of psychotrophic deteriorating and opportunistic pathogenic bacteria, such as *Listeria monocytogenes*. The objective of this study was to evaluate the milk produced in agreste region of Pernambuco regarding the concentration of psychrotrophic bacteria and their enzymatic characteristics, identifying those with deteriorating potential, as well as to verify the occurrence of *Listeria* spp. potentially pathogenic, qualifying them for antimicrobial resistance profile. The mean concentration of psychrotrophic bacteria was 2.1×10^5 CFU/mL of refrigerated raw milk. However, in 58.3% of the farms psychrotrophic counts were below 10 CFU/mL. Lipolytic and/or proteolytic activity was demonstrated by 38% of the psychrotrophic isolates, which were identified in 13 species. *Aeromonas*, *Exiguobacterium* and *Staphylococcus* were dominant genera, covering 77% of the isolates and, to a lesser extent, *Macrococcus*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Enterococcus* and *Lactococcus*. Regarding occurrence of *Listeria* spp., 140 presumptive isolates were obtained, of which 32.85% were confirmed for the genus *Listeria*. Of these, 8.69% presented the three virulence genes investigated - *hlyA*, *inlA* and *actA*, indicating that these isolates possess properties of a virulent strain. The antimicrobial resistance profile of *Listeria* spp. demonstrated that vancomycin, gentamicin and tetracycline are the most effective drugs against these bacteria. Ampicillin was the antimicrobial with the highest resistance index, presented by 60.87% of the isolates. The results of this work allow us to infer possible failures in the production and storage of raw milk and to adjust hygienic-sanitary and control procedures in order to avoid high concentration of psychrotrophic bacteria and consequent production of deteriorating enzymes. It is also inferred that milk produced and stored cold in the agreste of Pernambuco constitutes a risk to public health and to the milk production chain of the State for the presence of *Listeria* spp. potentially pathogenic and multi-resistant to antimicrobials.

Key-words: Microbiology, dairy, food spoilage, listeriosis, antibiotic resistance

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema do ciclo intracelular de <i>Listeria monocytogenes</i>	24
Figura 2.	Papel do ativador transcricional PrfA na transformação da <i>Listeria monocytogenes</i> de saprófito para patógeno intracelular.....	26
 ARTIGO I		
Figura 1.	Susceptibilidade de <i>Listeria</i> spp. isoladas de leite cru refrigerado a antimicrobianos.....	50
 ARTIGO II		
Figura 1.	Taxa de relações evolucionárias entre bactérias psicrotróficas com potencial deteriorante isoladas de leite cru refrigerado produzido no agreste de Pernambuco, Brasil.....	60
Figura 2.	Atividade proteolítica e/ou lipolítica de bactérias psicrotróficas isoladas de leite cru refrigerado produzido no Agreste de Pernambuco, Brasil.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Requisitos microbiológicos, CCS e resíduos químicos para o leite cru refrigerado.....	15
------------------	---	----

ARTIGO I

Tabela 1.	Pares de primers utilizados nas reações de PCR.....	50
------------------	---	----

ARTIGO II

Tabela 1.	Contagem de bactérias psicrotróficas em amostras de leite do Agreste de Pernambuco.....	57
Tabela 2.	Frequência de bactérias isoladas de leite cru refrigerado de 12 propriedades do Agreste de Pernambuco, Brasil.....	61

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. Objetivo geral	14
2.2. Objetivos específicos	14
3. REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1. Produção de leite.....	15
3.2. Qualidade microbiológica do leite cru.....	15
3.3. Fontes de contaminação do leite na fazenda.....	17
3.4. Bactérias psicotróficas	18
3.5. <i>Listeria</i> spp.	21
3.5.1. Listeriose	23
3.5.2. Patogenia e fatores de virulência.....	24
3.5.3. Resistência a antimicrobianos	27
4. REFERÊNCIAS	30
5. ARTIGO I	35
6. ARTIGO II.....	52
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	72
8. ANEXOS.....	73
8.1. Instruções aos autores para submissão ao periódico <i>Ciência Rural</i>	73
8.2. Instruções aos autores para submissão no <i>Brazilian Journal of Microbiology</i>	78

1. INTRODUÇÃO

A produção e o consumo de leite e derivados crescem em todo mundo, tendo, a cada dia, mais impacto na economia mundial. Esses produtos tem merecido especial atenção dos órgãos de fiscalização sanitária por serem altamente perecíveis e consumidos por toda a população, principalmente crianças e idosos, devido à sua riqueza em nutrientes, constituindo-se, por isso, ótimos meios de cultura para micro-organismos.

A contaminação do leite pode acontecer em todas as etapas da cadeia produtiva, desde a ordenha até a mesa do consumidor, seja enquanto leite fluido ou derivado. Além das condições de higiene na obtenção, a relação entre tempo e temperatura de armazenamento do leite cru exerce grande influência na quantidade e no tipo de bactérias predominantes no produto. A refrigeração do leite cru por até 48 h na propriedade rural foi determinada desde 2002 pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), e com essa medida, pretendeu-se reduzir as perdas de matéria-prima por ação de mesófilos. No entanto, trouxe uma nova problemática, uma vez que o leite estando sob temperaturas baixas favorece o desenvolvimento de micro-organismos psicrotróficos.

A importância das bactérias psicrotróficas encontra-se em sua ação deteriorante em vários alimentos normalmente armazenados sob temperatura de refrigeração de forma prolongada. Em derivados lácteos, as psicrotróficas estão associadas à deterioração de produtos após tratamento térmico, devido à ação das enzimas termorresistentes produzidas por essas bactérias. Sob a ótica da saúde pública, os psicrotróficos agregam bactérias patogênicas importantes consideradas oportunistas, como a *Listeria monocytogenes*, principal agente causador da listeriose em humanos.

Bactérias do gênero *Listeria* estão amplamente distribuídas no meio ambiente, podendo assim, facilmente contaminar alimentos. A ingestão de alimentos contaminados é apontada como a principal via de transmissão da listeriose, que pode causar quadros graves de encefalite, meningite e septicemia entre indivíduos imunocomprometidos, e levar a óbito. Em gestantes, ocorrem problemas reprodutivos, como aborto, natimortos e nascimento prematuro.

Listeria spp. já foram isoladas no Brasil de diversos alimentos, entretanto, não há registros de listeriose de origem alimentar no país. É provável que isso se deva a subdiagnóstico e/ou subnotificação de casos e não a sua inexistência, uma vez que o longo período de incubação e os sintomas iniciais inespecíficos, semelhantes a uma gripe ou gastroenterite leve, são características da doença, dificultando a associação com alimento após diagnóstico de listeriose.

Em razão dos problemas econômicos ocasionados à indústria do leite pelas psicrotróficas, é importante identificá-las para buscar medidas eficazes para prevenir a contaminação. No âmbito da saúde pública, tendo em vista a ubiquidade de bactérias do gênero *Listeria*, tornam-se importantes maiores pesquisas quanto ao potencial patogênico de cepas presentes em alimentos, bem como uma caracterização quanto à resistência a antimicrobianos rotineiramente utilizados no combate à infecções.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Contribuir para o aumento da qualidade dos produtos lácteos ofertados em Pernambuco, a partir do conhecimento das bactérias psicrotróficas deteriorantes e de cepas de *Listeria* potencialmente patogênicas e resistentes a antimicrobiano presentes no leite cru refrigerado da bacia leiteira pernambucana.

2.2. Objetivos específicos

- Isolar *Listeria* spp.;
- Traçar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos dos isolados de *Listeria* spp.;
- Pesquisar genes associados a fatores de virulência em *Listeria* spp.;
- Quantificar e isolar micro-organismos psicrotróficos;
- Testar *in vitro* a capacidade proteolítica e lipolítica dos isolados psicrotróficos;
- Identificar isolados psicrotróficos com potencial para deterioração.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Produção de leite

Em 2017, a produção brasileira de leite foi a quinta maior no mundo, com 33,5 bilhões de litros, ficando atrás somente da União Europeia, Estados Unidos, Índia e China. Do total nacional, a região Nordeste contribuiu com 11,6% do total da produção (IBGE, 2017; USDA, 2018).

O agreste de Pernambuco constitui a principal bacia leiteira do Estado, contribuindo com mais de 70% da produção. É composto por três regiões - Agreste Setentrional, Agreste Central e Agreste Meridional – entretanto é a porção Meridional que tem na pecuária leiteira sua principal base de sustentação econômica, com produção de leite e derivados de forma artesanal e industrial, de modo que sozinha contribui com quase 50% da produção pernambucana (YAMAGUCHI et al., 2009). No entanto, um dos principais desafios da cadeia produtiva de leite consiste principalmente às condições de higiene e saneamento. A qualidade do leite cru produzido em várias regiões brasileiras continua insatisfatória devido às taxas de multiplicação de microrganismos (MOURA et al., 2018).

3.2. Qualidade microbiológica do leite cru

Por sua composição rica em nutrientes, o leite torna-se um substrato ideal para a proliferação diversos micro-organismos, dentre os quais as bactérias tem maior representatividade (TRONCO, 2013).

Para que o leite cru seja considerado de boa qualidade, deve apresentar baixa carga bacteriana, ausência de micro-organismos patogênicos, reduzida contagem de células somáticas e ausência de resíduos de substâncias químicas (SILVA et al., 2011). Entre as características relacionadas com a qualidade do leite, destaca-se a qualidade microbiológica, que pode ser um bom indicativo da saúde da glândula mamária do rebanho, das condições gerais de manejo animal e higiene na fazenda (TRONCO, 2013). Na Tabela 1 encontram-se os requisitos mínimos vigentes de qualidade microbiológica, contagem de células somáticas (CCS) e resíduos químicos que deve apresentar o leite cru refrigerado, definidos no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade (RTIQ) desse produto a partir de sua implementação pela Instrução Normativa (IN) nº 62 de 29 de dezembro de 2011 (BRASIL, 2011).

Tabela 1. Requisitos microbiológicos, CCS e resíduos químicos para o leite cru refrigerado (Adaptado de Brasil, 2011).

Índice medido (por propriedade rural ou por tanque comunitário)	A partir de 01/07/2008 Até 31/12/2011 Regiões: S/SE/CO A partir de 01/07/2010 até 31/12/2012 Regiões: N/NE	A partir de 01/01/2012 até 30/06/2014 Regiões: S/SE/CO A partir de 01/01/2013 até 30/06/2015 Regiões: N/NE	A partir de 01/07/2014 até 30/06/2019 Regiões: S/SE/CO A partir de 01/07/2015 a 30/06/2019 Regiões: N/NE*	A partir de 01/07/2019 Regiões: S/SE/CO A partir de 01/07/2019 Regiões: N / NE*
Contagem Padrão em Placas (CPP), expressa em UFC/mL (mínimo de 01 análise mensal, com média geométrica sobre período de 03 meses)	Máximo de $7,5 \times 10^5$	Máximo de $6,0 \times 10^5$	Máximo de $3,0 \times 10^5$	Máximo de $1,0 \times 10^5$
Contagem de Células Somáticas (CCS), expressa em CS/mL (mínimo de 01 análise mensal, com média geométrica sobre período de 03 meses)	Máximo de $7,5 \times 10^5$	Máximo de $6,0 \times 10^5$	Máximo de $5,0 \times 10^5$	Máximo de $4,0 \times 10^5$

Pesquisa de Resíduos de Antibióticos/outras Inibidores do crescimento microbiano: Limites Máximos previstos no Programa Nacional de Controle de Resíduos – MAPA

(*) Prazos atualizados, alterados pelas Instruções Normativas nº 7, de 3 de maio de 2016, e nº 31, de junho de 2018.

Em termos gerais, a carga microbiana do leite cru é uma variável dependente da carga bacteriana inicial e da taxa de proliferação dos micro-organismos. A carga bacteriana inicial depende diretamente de fatores como sanidade do rebanho, limpeza e desinfecção dos tetos, qualidade da água empregada e do processo de higienização de equipamentos e utensílios da ordenha. O leite proveniente de animais sadios e obtido de forma asséptica contém poucos micro-organismos, mas pode sofrer contaminação a partir do ambiente e do homem (TRONCO, 2013). Nessas condições, é consenso que as bactérias ácido-láticas (LAB, do inglês *Lactic-*

acid bacteria), um grupo de bactérias que fermentam a lactose, são a população dominante em leite antes da pasteurização, seja bovino, caprino, ovino e bubalino. Os gêneros mais comuns de LAB no leite incluem *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus* e *Enterococcus* (QUIGLEY et al., 2013).

A qualidade microbiológica do leite possui dois aspectos principais a serem considerados: a qualidade industrial e os riscos à saúde do consumidor (TRONCO, 2013). Alguns micro-organismos indicadores são utilizados como parâmetro da qualidade microbiológica do leite e são relacionados à possível presença de outro micro-organismo patogênico, com características ecologicamente similares. São considerados indicadores de condições higiênico-sanitárias os coliformes (totais e termotolerantes), enterococos e enterobactérias totais. A presença de *Escherichia coli* indica contaminação de origem fecal, de humanos ou animais de sangue quente. Micro-organismos aeróbios mesófilos, psicrotróficos, termófilos, bolores e leveduras são indicadores da condição de deterioração do alimento e das condições ambientais (SILVA et al., 2011).

3.3. Fontes de contaminação do leite na fazenda

A contaminação do leite pode acontecer por duas vias: a endógena, no caso de o animal apresentar uma doença sistêmica ou mastite, e exógena, quando acontece após a saída do úbere (TRONCO, 2013). Imediatamente após a ordenha, quando realizada de forma higiênica, leite cru fresco contém menos de 5000 UFC/ mL, onde predominam bactérias dos gêneros *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* e *Corynebacterium*, e reduzida concentração de outras bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (SAMARZIJA et al., 2012).

A pele do úbere é fonte frequente de contaminações, principalmente quando não se realiza uma lavagem preliminar ou quando esta é realizada de maneira incorreta (TRONCO, 2013). A superfície da teta bovina pode conter uma alta diversidade de bactérias, cuja composição varia quantitativa e qualitativamente de uma fazenda para outra, sendo influenciada por exemplo pela microbiota presente na cama onde o animal deita (QUIGLEY et al., 2013).

A atmosfera dos estábulos geralmente está carregada de micro-organismos procedentes de excrementos, palhas e alimentos. Excrementos são o principal foco de enterobactérias, associadas a fermentações indesejáveis e produção de sabor desagradável na matéria-prima. Enquanto palhas, alimento e solo podem conter bactérias esporuladas, como bacilos e clostrídios (TRONCO, 2013). Feno, poeira e tetas sujas de solo são consideradas fontes de *Bacillus* spp. para o leite (SAMARZIJA et al., 2012).

A utilização de água não-potável, seja na lavagem das tetas ou de utensílios de ordenha, pode resultar na introdução de bactérias psicrotólicas no leite, tais como *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Achromobacter* e *Alcaligenes*. O ordenhador, quando não goza de boa saúde ou não possui hábitos higiênicos, pode carrear agentes patogênicos ao leite, como estreptococos e estafilococos (TRONCO, 2013). Máquinas, utensílios de coleta e armazenamento constituem fonte de contaminação das mais significativas, sendo mais frequentemente isolados nesses locais micro-organismos termorresistentes e os grupos *Escherichia* e *Enterobacter*. A limpeza eficiente dos equipamentos utilizados na ordenha colabora diretamente para baixas contagens bacterianas (TRONCO, 2013).

A persistência da microbiota contaminante do leite em água, teteiras e equipamento de ordenha pode ser explicada pela formação de biofilme e, com ele, alta resistência à desinfecção (MACHADO et al., 2017). Dutos e tanques de armazenamento de leite têm sido associadas com a contaminação com espécies de *Bacillus* a partir de biofilmes formados nesses locais (SAMARZIJA et al., 2012). Biofilmes são comunidades bacterianas incorporadas em uma matriz auto-produzida de substâncias poliméricas extracelulares (EPS), constituída por ácidos nucleicos, oligossacarídeos, lipídios e proteínas, resultante da fixação bem sucedida e subsequente crescimento microbiano em uma superfície (OLIVEIRA et al., 2015).

A limpeza adequada e desinfecção de todos os equipamentos utilizados na coleta, transporte e armazenamento de leite evita a incrustação de resíduos de leite nas superfícies, que servem de apoio para a adesão e o crescimento de bactérias como biofilmes de múltiplas espécies (OLIVEIRA et al., 2015). Uma vez formado, é particularmente difícil de remover por meio de qualquer limpeza convencional, agindo, na indústria de laticínios, como uma fonte contínua de contaminação do produto (SAMARZIJA et al., 2012).

3.4. Bactérias psicrotólicas

Visando diminuir os prejuízos causados por ação acidificante de mesófilos, a prática de estocagem do leite cru refrigerado na fonte de produção foi instituída pelo Ministério da Agricultura em 2002, por meio da IN nº 51 (BRASIL, 2002). Essa prática possibilitou a descentralização da recepção em entrepostos, permitindo a coleta a granel em diferentes regiões e diluiu o custo do transporte com a coleta da matéria-prima em dias alternados (REIS et al., 2013).

Um dos maiores avanços obtidos pela implantação da IN nº 51 foi a refrigeração do leite durante toda cadeia produtiva. Tal procedimento reduziu a perda do leite por acidificação,

porém acarretou a seleção térmica da microbiota contaminante, favorecendo a multiplicação de bactérias psicrotróficas e produção de enzimas termoestáveis, resultantes de sua atividade metabólica (REIS et al., 2013).

São definidas como bactérias psicrotróficas (ou psicrotolerantes) diferentes espécies capazes de crescer a 7° C ou menos, mesmo apresentando temperatura ótima de desenvolvimento entre 20 e 30° C (SAMARZIJA et al., 2012). Sob baixa temperatura, bactérias psicrotróficas sintetizam lipídios e fosfolipídios para a membrana celular contendo maiores proporções de ácidos graxos insaturados, resultando em uma redução no ponto de fusão dos lipídios. Esse fenômeno serve para manter fluidez da membrana, assegurando permeabilidade suficiente para o transporte de metabólitos necessários para crescimento e reprodução dessas bactérias (OLIVEIRA et al., 2015).

Micro-organismos psicrotróficos Gram-negativos tem maior incidência em leite cru refrigerado e derivados, sendo mais descritos os gêneros: *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Chromobacterium*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Achromobacter*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Salmonella* e *Yersinia*. Bactérias Gram-positivas, ainda que com menor incidência, também são encontrados em leite cru refrigerado, sendo *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus* e *Streptococcus* os gêneros mais referenciados (REIS et al., 2013).

Em geral, a maioria dos microrganismos psicrotróficos isolados do leite têm a capacidade de produzir enzimas hidrolíticas que quebram principais constituintes do leite, como proteína e gordura. Apesar de a pasteurização ser capaz de inativar a maioria dessas bactérias, muitas das enzimas são termorresistentes e retêm parte de sua atividade mesmo após pasteurização e tratamento UHT (MACHADO et al., 2017). Dessa forma, acarretam grandes perdas econômicas na indústria por causar redução de rendimento e deterioração nos derivados lácteos após o tratamento térmico. A secreção das enzimas ocorre no final da fase log de crescimento em densidades populacionais iguais ou superiores a 10⁶ UFC/mL (SAMARZIJA et al., 2012; MARQUES et al., 2012).

As lipases microbianas podem somar-se à lipase natural do leite e, ao hidrolisar a gordura do leite, liberam ácidos graxos e glicerol (TRONCO, 2013). A ação da lipase na gordura do leite pode liberar ácidos graxos de cadeia curta, de cadeia média e de cadeia longa. Os ácidos graxos de cadeia curta (por exemplo, os ácidos butírico, caprílico e capróico) podem transmitir sabor e odor desagradáveis, como ranço, amargo, butírico, “sujo” ou adstringente aos produtos, principalmente creme, manteiga, queijos e produtos UHT. Já ácidos graxos de cadeia

média são responsáveis por um sabor como sabão, enquanto os de cadeia longa exercem pouca influência no sabor (MACHADO et al., 2017; SAMARZIJA et al., 2012).

As modificações induzidas pelas lipases no leite dependem da especificidade da enzima e da condição da gordura. Agitação excessiva, adição de ar, choques térmicos repetidos e homogeneização, que podem ocorrer em diferentes estágios de produção e processamento, afetam a integridade do glóbulo de gordura, modificam as interfaces entre a fase gordurosa e a não gordurosa, resultando num aumento de lipólise (MACHADO et al., 2017).

As proteases termoestáveis produzidas pelos psicrotróficos ocasionam hidrólise da fração k-caseína, liberando peptídeos menores, os glicomacropetídeos (GMP), de forma bem similar à ação proteolítica da quimosina. Na fase primária da coagulação, a quimosina sobre a fração k-caseína das micelas de caseínas, liberando peptídeos diferentes: o *para*-k-caseína fica retido na massa do queijo e o caseinomacropetídeo (CMP) é liberado para o soro. Leites teor de CMP igual ou superior a 30mg/L podem ser considerados como fraudados ou de má qualidade pelo desenvolvimento de psicrotróficos, levando a aproveitamento condicional ou condenação (MACHADO et al., 2017).

O resultado dessa reação leva ao aparecimento de coloração cinzenta e sabor amargo nos produtos, além de geleificação ou coagulação do leite UHT durante a estocagem (MARQUES et al., 2012). Na produção de queijos, ocorre significativo decréscimo do rendimento pois os produtos solúveis da degradação da caseína (peptídeos e aminoácidos) são perdidos na dessoragem (OLIVEIRA et al., 2015).

A compreensão da regulação de peptidases e lipases produzidas por bactérias psicrotróficas em amostras de leite ainda é limitada. Sabe-se que muitos fatores como a temperatura, fase de crescimento, quorum sensing, teor de ferro estão envolvidos nesse processo. Em *Pseudomonas*, gênero psicrotrófico mais estudado, a produção de enzimas parece estar relacionada à expressão dos genes *apr-X* e *lipA*, fortemente relacionada à densidade celular e mediada por *quorum sensing* (MACHADO et al., 2017), forma de comunicação entre bactérias por sinalização de moléculas N-acil-homoserina lactonas (AHLs). Estas moléculas são produzidas por numerosas bactérias Gram-negativas e estão implicados no controle genético de uma ampla gama de atributos fenotípicos, como produção de pigmento, formação de biofilme, transferência de plasmídeos, esporulação, expressão de virulência e produção de toxinas e enzimas extracelulares (OLIVEIRA et al., 2015).

3.5. *Listeria* spp.

O leite e os produtos lácteos, devido ao seu valor nutricional, são adequados para o desenvolvimento de micro-organismos, incluindo bactérias patogênicas, como as espécies de *Listeria* (ELSHINAWY et al., 2017). Entre as espécies de interesse, *L. monocytogenes* é de particular importância em termos de suas implicações na saúde humana e na economia, uma vez que pode infligir doenças graves em humanos e animais, com taxas de fatalidade variando de 20 a 30% entre o grupo de risco, (OLAIMAT et al., 2018), sendo, por isso, um agente que detém a atenção dos órgãos governamentais de controle sanitário e da comunidade científica na área de alimentação (ROSA et al., 2018).

De acordo com a classificação mais recente, o gênero *Listeria* é composto por 18 espécies conhecidas, e está organizado em dois grupos baseados na sua relação com *L. monocytogenes*. O primeiro grupo é o clado “*Listeria sensu stricto*” que consiste de seis espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* e *L. marthii*. Essas espécies são comumente isoladas do trato intestinal de animais assintomáticos e de produtos alimentícios de origem animal. O segundo grupo é o “*Listeria sensu lato*”, que consiste em 12 espécies, incluindo: *L. weihenstephanensis*, *L. fleischmannii*, *L. rocourtiae*, *L. booriae*, *L. riparia*, *L. grayi*, *L. floridensis*, *L. aquatica*, *L. newyorkensis*, *L. cornellensis*, *L. grandensis*, e *L. costaricensis*, que foram isoladas do meio ambiente ou matrizes de alimentos, mas eles são incapazes de colonizar hospedeiros mamíferos (OLIMAT et al., 2018).

Espécies patogênicas e não-patogênicas de *Listeria* são ubíquas na natureza e podem ser isoladas de solo, vegetais, água e também animais e humanos saudáveis. Por sua ampla distribuição no ambiente, essa bactéria pode ser facilmente encontrada em alimentos de origem animal e vegetal, “in natura” ou processados, sendo sua presença indicador de higiene insuficiente na produção (BRANKICA et al., 2011). De todas essas espécies, apenas *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* são reconhecidamente patogênicas, sendo *L. monocytogenes* patogênica para o homem e *L. ivanovii* patogênica para bovinos e pequenos ruminantes (VERA et al., 2013). Muito embora existam relatos de casos esporádicos de listeriose humana causada por *L. ivanovii* (CUMMINS et al., 2004), assim como por *L. seeligeri* e *L. innocua* (ROCOURT et al., 1986; PERRIN et al., 2003).

Para a indústria alimentícia e agências de saúde em todo o mundo, *L. monocytogenes* constitui um grande fardo devido à sua capacidade de suportar condições severas. Embora tenha temperatura ótima de 30 a 37°C, o organismo consegue se desenvolver entre 0,5 e 45 °C, sendo capaz de sobreviver por longos períodos em alimentos congelados. Além disso, é capaz de crescer em pH de 4,3 a 9,6 e sobrevive em 20% NaCl. *L. monocytogenes* é capaz de formar de

biofilme em várias superfícies de contato com alimentos, incluindo aço inoxidável e plástico que podem proteger o organismo das tensões ambientais e aumenta sua resistência a limpadores e desinfetantes usados na indústria alimentícia (OLAIMAT et al., 2018).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a listeriose é uma doença de origem alimentar e estima-se que aproximadamente 30% da população em países desenvolvidos seja afetada por essa doença (ROSA et al., 2018). Nesses países, surtos de listeriose têm sido descritos desde o início dos anos 80. Dentre os alimentos já relacionados a esses surtos, têm-se leite cru e pasteurizado, queijos, carnes bovina, suína e de aves e seus derivados, frutos do mar, além de produtos de origem vegetal, crus ou processados, e refeições preparadas (SILVA et al., 2011).

Os alimentos associados com a transmissão do agente da listeriose, na maioria das vezes, são processados industrialmente, têm vida de prateleira longa em temperatura de refrigeração, permitindo a multiplicação de *L. monocytogenes*, e são consumidos sem cocção prévia (SILVA et al., 2011). Embora uma grande variedade de alimentos prontos para consumo estejam implicados na transmissão da doença, aproximadamente metade dos surtos estão ligados a produtos lácteos contaminados (CASTRO et al., 2018). O leite e seus derivados estão entre os produtos alimentícios mais frequentemente envolvidos na transmissão de *L. monocytogenes*, pois além de rico em nutrientes, sua cadeia de produção de leite e derivados oferece diversas possibilidades de contaminação, como ordenha, transporte, armazenamento e beneficiamento (BARANCELLI et al., 2011).

No Brasil, são raros os relatos de casos de listeriose e nenhum deles foi relacionado ao consumo de um determinado alimento (SILVA et al., 2011). No entanto, investigações epidemiológicas de listeriose são desafiadoras pelo pequeno número de casos detectados, altamente dispersos geograficamente e pelo período de incubação que pode ser longo, dificultando a relação do paciente o alimento ao qual foi exposto (CARTWRIGHT et al., 2013). Sendo assim, é possível que haja uma subnotificação de listeriose de origem alimentar, uma vez que esse micro-organismo está presente em vários alimentos produzidos no país

Por todas essas características, por ser agente quase exclusivo da listeriose e devido às altas taxas de mortalidade pela doença, *L. monocytogenes* tem sido o foco dos critérios microbiológicos em legislações concernentes à inocuidade dos alimentos (FERRONATO et al., 2012). Na Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 12 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) estão estabelecidos padrões microbiológicos para alimentos, nos quais é determinada a ausência de *Listeria monocytogenes* em 25g de queijos de média a muito alta umidade, sem descrição de parâmetros para leite (BRASIL, 2001). Em 2009, o Ministério da

Agricultura, Pecuária e Abastecimento publicou a IN nº9 instituindo o controle desse micro-organismo em alimentos de origem animal prontos para consumo, caracterizados com relativa alta acidez ($\text{pH} > 4.4$), baixa atividade de água ($> 92\%$) ou alta salinidade ($< 10\%$), além de inspeção dos processos de produção e da matéria-prima (BRASIL, 2009).

3.5.1. Listeriose

L. monocytogenes, responsável por 98% dos casos de listeriose em humanos (VERA et al., 2013), sendo por isso a espécie mais estudada. Os isolados de *Listeria monocytogenes* podem ser divididos em 14 sorotipos, baseados nos antígenos somáticos e flagelares, e que são identificados empregando-se o esquema alfa-numérico. Cerca de 95% dos isolados relacionados a infecções humanas pertencem aos sorotipos 1/2a, 1/2b e 4b13,14. No Brasil, os sorotipos mais frequentemente encontrados são 1/2a e 4b (SILVA et al., 2011).

São reconhecidas, até o momento, duas formas de listeriose. Uma mais branda, que ocorre em indivíduos imunocompetentes e se apresenta como doença gastrointestinal autolimitada e não invasiva, caracterizada pelo desenvolvimento de febre, diarreia, náusea, vômito, dor de cabeça e mialgia, dentro de 12 a 24 horas após a exposição (SILVA et al., 2011).

A segunda forma é a listeriose invasiva, cujo período de incubação varia de uma dia a várias semanas. Compromete principalmente o sistema nervoso central, manifestando-se pelo aparecimento de meningite, encefalite e abscessos (SILVA et al., 2011). Além disso, o feto também pode adquirir listeriose invasiva da mãe infectada através da placenta. A listeriose perinatal aumenta a probabilidade de aborto, natimorto ou nascimento de um bebê com infecção generalizada, sepsis ou meningite. *L. monocytogenes* também está associada a uma variedade de infecções focais incomuns, infecção cutânea, infecção articular, osteomielite, miocardite, endocardite e fasciite necrosante foram descritas (CAMEJO et al., 2011).

Os casos mais graves estão associados aos grupos de maior risco, como recém-nascidos, grávidas, idosos, (VERA et al., 2013), pacientes com AIDS, câncer, transplantados, sob tratamento esteroidal, sobretudo, imunocomprometidos. Entre os casos graves, a taxa de mortalidade é geralmente de 20 a 30% (CHEN et al., 2012), podendo chegar a 50% em adultos que apresentam sepsis e atingindo até 70% no caso de meningite (ROSA et al., 2018).

A dose mínima de infecção não foi ainda estabelecida, mas informações sobre a população de *L. monocytogenes*, em alimentos contaminados envolvidos em surtos, indicam que, em geral, populações entre 10^3 e 10^4 UFC/g foram responsáveis pela doença. Entretanto, há relato de surto da doença causado por exposição prolongada de doses baixas de *L. monocytogenes* (0,3 NMP/g) à população de risco (SILVA et al., 2011).

O prognóstico favorável de pacientes com listeriose depende da administração precoce de antibióticos de ação rápida e bactericida contra *L. monocytogenes*. O tratamento referência é atualmente baseado na associação de altas doses de aminopenicilina (ampicilina ou amoxicilina) e gentamicina. A combinação trimetoprim com sulfonamida (sulfametoxazol) é utilizada como tratamento de segunda escolha, especialmente no caso de intolerância a beta-lactâmicos. Outras drogas como rifampicina, vancomicina, linezolida e carbapenemos já foram propostos como alternativas. O gênero *Listeria* apresenta uma susceptibilidade uniforme aos antimicrobianos contra bactérias Gram-positivas, entretanto, cepas resistentes a cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina, estreptomicina, vancomicina e trimetoprim, tem sido descritas (OHUE et al, 2015; REIS et al., 2011; MORVAN, et al., 2010).

3.5.2. Patogenia e fatores de virulência

Sendo os alimentos a principal via de aquisição do patógeno, o trato gastrointestinal constitui o local de entrada da *L. monocytogenes* para o hospedeiro. Esta bactéria é capaz de atravessar as três barreiras fisiológicas presentes nos seres humano: intestinal, hematoencefálica e placentária. Ao atravessar a barreira intestinal, a bactéria passa pelas células epiteliais e, sem ação eficiente do sistema imunológico, pode se espalhar para a corrente sanguínea e gânglios linfáticos. A partir da corrente sanguínea, a maioria das bactérias chega ao fígado e ao baço, onde pode se replicar dentro de macrófagos ou células epiteliais. Se a replicação de *L. monocytogenes* não é controlada por uma resposta imune eficaz, as bactérias escapam e podem voltar à corrente sanguínea e atingir o cérebro ou a placenta, causando infecções sistêmicas potencialmente letais (VERA et al., 2013).

L. monocytogenes é um patógeno intracelular facultativo capaz de invadir, sobreviver e se multiplicar dentro das células epiteliais, macrófagos e células dendríticas (CAMEJO et al., 2011). A nível celular, o processo de infecção compreende várias etapas: adesão e invasão da célula hospedeira, escape do vacúolo, multiplicação intracelular e proliferação extracelular (Figura 1). Em cada um desses estágios vários fatores de virulência estão envolvidos (VERA et al., 2013).

A adesão às células hospedeiras é um estágio fundamental na patogenicidade bacteriana. Para *L. monocytogenes*, tem sido descrito o envolvimento de vários fatores de adesão que permitem estabelecer um contato íntimo com as células do hospedeiro, destacando as proteínas Lap, Ami, FbpA, LapB e InlJ (VERA et al., 2013).

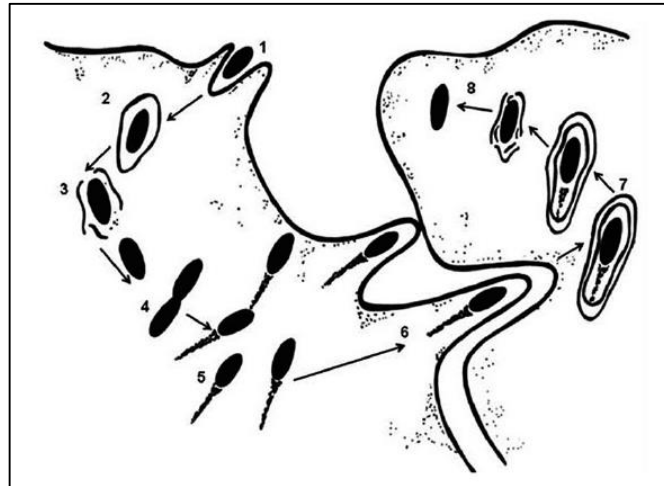


Figura 1. Esquema do ciclo intracelular de *Listeria monocytogenes*. **1.** Entrada na célula hospedeira; **2.** Sobrevivência dentro do vacúolo fagocítico; **3.** Ruptura do fagossomo e escape para o citosol; **4.** Replicação no citosol; **5.** Movimentação por meio da polimerização da actina; **6.** Propagação célula-a-célula; **7.** Sobrevivência no fagossomo secundário; **8.** Escape do fagossomo secundário e reinício do ciclo. (Fonte: Vera et al., 2013)

A entrada de *L. monocytogenes* nos macrófagos se dá pela ação do próprio macrófago, já a invasão em células não-fagocíticas depende de vários fatores, em particular, da interação de proteínas de superfície bacterianas com receptores específicos do hospedeiro (CAMEJO et al., 2011). As duas principais proteínas de invasão de *L. monocytogenes* são InlA e InlB, codificados pelos genes *inlA* e *inlB*, respectivamente, e membros de uma superfamília de proteínas chamadas internalinas (Inl). Para *L. monocytogenes* atravessar a barreira intestinal, a participação da InlA é crucial, e para a invasão placentária, tanto InlA quanto InlB são fundamentais (VERA et al., 2013).

Subsequente à invasão, *Listeria* se encontra temporariamente em um vacúolo fagocítico, que é lisado pela toxina listeriolisina O (LLO) e por duas fosfolipases C (PLC), a fosfatidilinositol-PLC (PI-PLC) e a fosfatidilcolina-PLC (PC-PLC), codificadas pelos genes *plcA* e *plcB*, respectivamente. A LLO é uma toxina dependente de colesterol capaz de formar poros na membrana de fagossomas, permitindo o escape da *L. monocytogenes* dos vacúolos primários e secundários (VERA et al., 2013) e, por isso, consiste em um dos seus principais fatores de virulência. O gene que codifica LLO (*hly*) foi o primeiro gene de virulência identificado em *Listeria*, e faz parte de um locus que contém outros principais genes de virulência (*prfA*, *plcA*, *hly*, *mpl*, *actA* e *plcB*) (CAMEJO et al., 2011). A ruptura das membranas fagossômicas é aumentada pelas fosfolipases, que cooperam com LLO na lise dos vacúolos (CAMEJO et al, 2011).

L. monocytogenes é notavelmente adaptada à sobrevivência e multiplicação dentro de macrófagos e outros tipos de células. Uma vez que evade o fagossomo, ela pode começar a se replicar no citosol da célula hospedeira (CAMEJO et al., 2011). Para isso, expressa os genes para adquirir os nutrientes necessários para multiplicação intracelular, como o gene *hpt*, importante para seu crescimento intracelular ótimo (VERA et al., 2013). Após a replicação, a proteína ActA, um dos principais fatores de virulência de *L. monocytogenes*, induz a polimerização de filamentos de actina em um pólo da bactéria, formando uma estrutura semelhante a uma cauda de cometa que a propulsiona através do citoplasma da célula hospedeira. Com isso, consegue invadir de células vizinhas, através de um processo chamado *cel-to-cell spread* (CAMEJO et al., 2011).

Existem outros fatores de virulência associados com a colonização do hospedeiro, no entanto, estes não seriam específicos de *Listeria monocytogenes*, tendo sido identificados em outras *Listeria*. Esses fatores são conhecidos como fatores de virulência acessórios e entre eles está a proteína p60 (produto do gene *iap*), secretado por todas as cepas de *Listeria*, e que parece estar envolvida na última etapa da divisão celular (VERA et al., 2013).

Os genes de virulência *prfA*, *plcA*, *plcB*, *hly* e *actA* são codificados no cromossomo, em uma ilha de patogenicidade de 9 Kb, denominada LIPI-1, presente em *L. monocytogenes* e *L. ivanovii*. Os genes *inlA* e *inlB* não estão codificados no LIPI-1, mas foram associados a ilhotas genéticas, identificadas também em outras espécies de *Listeria* (VERA et al., 2013).

A capacidade de se adaptar dos patógenos, essencial para o processo infeccioso, é determinada não apenas pelos fatores de virulência, mas também pelos mecanismos necessários a regulação de sua expressão (CAMEJO et al., 2011). Quando invade um hospedeiro, *Listeria monocytogenes* realiza uma regulação coordenada na expressão de genes de virulência e muda de saprófita para parasita intracelular (VERA et al., 2013) (Figura 2).

Entre os numerosos reguladores envolvidos na virulência de *L. monocytogenes*, o mecanismo de controle mediado pela proteína PrfA é o mais importante. O gene *prfA* está presente em todas as cepas de *L. monocytogenes*, ausente em *L. innocua* e *L. welshimeri* e, em *L. seelegeri* está presente, mas silenciado. Já foi descrito que *prfA* pode regular diretamente dez genes de virulência, entre eles *plcA*, *plcB*, *hly*, *actA*, *inlA*, *inlB*, *inlC* e *hpt*, podendo atuar como repressor ou ativador de sua expressão (VERA et al., 2013).

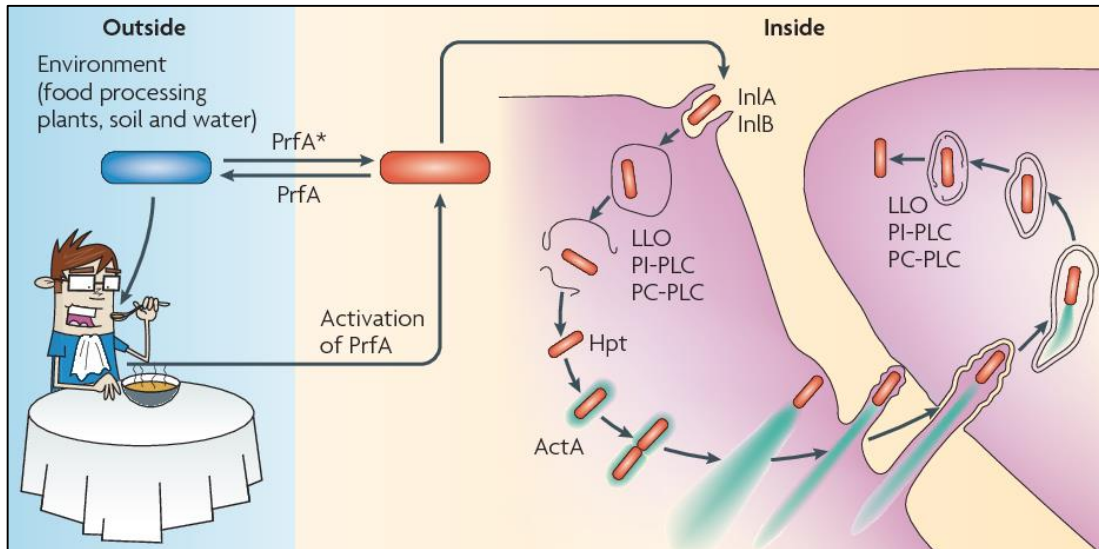


Figura 2. Papel do ativador transcricional PrfA na transformação da *Listeria monocytogenes* de saprófito para patógeno intracelular. Fora da célula hospedeira, o PrfA existe em um estado de baixa atividade, com níveis baixos de expressão de genes de virulência. Uma vez dentro do hospedeiro, o PrfA se torna ativado (**PrfA***) e induz a expressão de produtos gênicos que são necessários para invasão de células hospedeiras [(internalinas *InlA* e *InlB*), lise de fagossomos (listeriolisina o - *LLO*), fosfolipases C fosfatidilinositol (*PI-PLC/ plcA*) e fosfatidilcolina (*PC-PLC/ plcB*), crescimento intracelular (transportador de hexose-6-fosfato - *Hpt*)] e para a propagação célula-a-célula (proteína indutora da montagem de actina (*ActA*); a polimerização de actina mostrada em turquesa). Fonte: FREITAG, et al. (2009).

3.5.3. Resistência a antimicrobianos

A classe dos antimicrobianos engloba substâncias naturais (antibióticos) ou sintéticas (quimioterápicos) que agem sobre microrganismos a fim de inibir o seu crescimento ou em prol de sua eliminação (ESTRELA, 2018). A palavra antibiótico, no entanto, tornou-se sinônimo de "droga antibacteriana" (BLAIR et al., 2015).

Os antibióticos podem ser bacteriostáticos ou bactericidas, de acordo com sua ação sobre as células bacterianas. Quanto aos mecanismos farmacodinâmicos, os antibióticos podem inibir a síntese de parede celular (beta-lactâmicos), inibir a síntese proteica (como os aminoglicosídeos, tetracilinas, cloranfenicol, macrolídeos, lincosamidas e oxazolinidonas), inibir a síntese de ácidos nucleicos (quinolonas), alterar a permeabilidade da membrana celular (polimixinas) e interferir no metabolismo celular (sulfonamidas e trimetropim) (COSTA e JÚNIOR, 2017).

A Organização Mundial da Saúde (OMS/WHO) define resistência a antimicrobiano como a capacidade de um micro-organismo impedir a atuação de um antimicrobiano. Como resultado, os tratamentos tornam-se ineficazes, e as infecções, persistentes e até incuráveis. Algumas das características de resistência também se aplicam aos medicamentos utilizados no tratamento de doenças virais, parasitárias ou fúngicas (ESTRELA, 2018).

O desenvolvimento de resistência bacteriana aos antibióticos é um fenômeno natural resultante da pressão seletiva exercida pelo uso de antibióticos, mas que tem sofrido uma expansão muito acelerada devido à utilização inadequada destes fármacos, existindo uma correlação muito clara entre um maior consumo de antibióticos e níveis mais elevados de resistência microbiana (LOUREIRO et al., 2016).

As bactérias podem ser intrinsecamente resistentes a certos antibióticos, mas também podem adquirir resistência a antibióticos por meio de mutações em genes cromossômicos e por transferência horizontal de genes. A resistência intrínseca de uma espécie bacteriana a um antibiótico particular é a capacidade de resistir à ação desse antibiótico, como resultado de características estruturais ou funcionais inerentes do organismo (BLAIR et al., 2015).

Além da resistência intrínseca, as bactérias podem adquirir ou desenvolver resistência aos antibióticos, o que pode ser mediado por vários mecanismos (BLAIR et al., 2015), sendo os principais são:

- A modificação ou destruição enzimática do antibiótico (ex: destruição dos agentes beta-lactâmicos pelas enzimas beta-lactamases);
- A prevenção da acumulação intracelular do antibiótico através da redução da permeabilidade celular ao antibiótico (ex: resistência da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ao imipenem) ou da existência de bombas de efluxo dos antibióticos das células bacterianas (ex: resistência da família das enterobacteriáceas às tetraciclina);
- As alterações nas moléculas alvo dos antibióticos (ex: resistência intrínseca das bactérias do gênero *Enterococcus* às cefalosporinas);
- A produção de moléculas alvo alternativas que não são inibidas pelo antibiótico, enquanto se continua a produzir as moléculas alvo originais, contornando desse modo a inibição induzida pelo antibiótico (ex: resistência da bactéria *Staphylococcus aureus* à metilina) (LOUREIRO et al., 2016).

A resistência aos antimicrobianos pode ser adquirida como resultado de mutações durante a replicação celular, por intermédio de agentes mutagênicos, como radiações ionizantes e não-ionizantes, ou ainda por meio da aquisição de material genético exógeno procedente de outros micro-organismos já resistentes e propagado por meio de mecanismos de transferência gênica horizontal, como a conjugação bacteriana, a transformação e a transdução (COSTA e JÚNIOR, 2017).

Com exceção da resistência natural *in vitro* a quinolonas mais antigas, fosfomicina e cefalosporinas de amplo espectro, *L. monocytogenes* é amplamente suscetível a classes de

antibióticos clinicamente relevantes contra bactérias Gram-positivas. A resistência adquirida a antibióticos é raramente desenvolvida por *L. monocytogenes*, no entanto, alguns estudos têm relatado aumento da taxa de resistência a um ou vários antibióticos importantes em isolados ambientais e menos freqüentemente em cepas clínicas (MORVAN et al., 2010).

Embora a taxa de resistência a múltiplas drogas de *L. monocytogenes* seja baixa, está aumentando continuamente por razões que não são claramente entendidas. A cadeia de alimentos parece ser o caminho mais provável para a transferência de resistência entre cepas de humanos e animais. O principal mecanismo para o aumento da resistência antibiótica de *L. monocytogenes* é a transferência de genes de resistência, possivelmente por meio de plasmídeos e *transposons* conjugativos de outras bactérias, como *Enterococcus* e *Streptococcus* spp. Mecanismos envolvendo bombas de efluxo também podem ser responsáveis. Outros fatores ligados à resistência de *L. monocytogenes* envolvem a capacidade de formação de biofilme, co-seleção pela exposição subletal a desinfetantes, proteção cruzada contra estresses ambientais (OLAIMAT et al., 2018).

Bactérias resistentes a drogas podem circular entre populações de seres humanos e animais, através da alimentação, água e o meio ambiente, e a transmissão é influenciada por comércio, viagens e migração humana e animal, consistindo por isso em um problema de ordem mundial (WHO, 2015). Em 2014, a resistência antimicrobiana foi reconhecida como ameaça aos esforços mundiais de sustentabilidade e desenvolvimento pela Assembleia Geral das Nações Unidas (ESTRELA, 2018).

Diante dos problemas causados pela resistência a antimicrobianos nos diversos setores da sociedade, países e organizações internacionais tem se mobilizado para enfrentá-la. Em 2015, os Estados membros da Organização Mundial da Saúde (OMS/WHO), em parceria com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) e a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), endossaram o “Plano de Ação Global para o Enfrentamento à Resistência aos Antimicrobianos” cujos principais objetivos foram ampliação da conscientização sobre resistência antimicrobiana, fortalecimento da vigilância e pesquisa e otimização do uso de agentes antimicrobianos na saúde humana e animal. A compreensão de que as bactérias resistentes circulam entre humanos, animais e ambiente justifica a necessidade da abordagem de Saúde Única (*One Health approach*) no enfrentamento do problema, assegurando com isso, maior eficácia das ações (WHO, 2015).

4. REFERÊNCIAS

BARANCELLI, G. V.; SILVA-CRUZ, J. V.; PORTO, E.; OLIVEIRA, C. A. F. *Listeria monocytogenes*: ocorrência em produtos lácteos e suas implicações em saúde pública. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, v.78, n.1, p.155-168, jan./mar., 2011

BLAIR, J. M.; WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature reviews microbiology*, v. 13, n. 1, p. 42-52, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.51 de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Produção Identidade e Qualidade de Leite Tipo A, Tipo B, Tipo C e Cru refrigerado. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 9 de 09 de abril de 2009. Procedimentos de controle da *Listeria monocytogenes* em produtos de origem animal prontos para o consumo, **Diário Oficial da União**, Brasília, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 62 de 29 de dezembro de 2011. Coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel, **Diário Oficial da União**, Brasília, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 7 de 3 de maio de 2016. Altera prazos da IN nº 62/2011, **Diário Oficial da União**, Brasília, 2016.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 31 de 29 de junho de 2018. Altera prazos da IN nº 62/2011, **Diário Oficial da União**, Brasília, 2018.

CAMEJO, A.; CARVALHO, F.; REIS, O.; LEITÃO, E. SOUSA, S.; CABANES, D. The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 379-394, 2011.

CARTWRIGHT, E. J.; JACHSON, K. A.; JOHNSON, S. D.; GRAVES, L. M.; SILK, B. J.; MAHON, B. E. Listeriosis outbreaks and associated food vehicles, United States, 1998-2008.

CASTRO, H.; JAAKKONEN, A.; HAKKINEN, M. KORKEALA, H.; LINDSTRÖM, M. Occurrence, persistence, and contamination routes of *Listeria monocytogenes* genotypes on three Finnish dairy cattle farms: a longitudinal study. **Applied Environmental of Microbiology**, v.84, n.4, e02000-17, 2018.

CHEN, J.; HEALEYA, S.; REGANA, P.; LAKSANALAMAIB, P.; HUA, Z. PCR-based methodologies for detection and characterization of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* in foods and environmental sources, **Food Science and Human Wellness**, p. 39–59, 2017.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute (2013). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-Third Informational Supplement**. Document M100-S23, v.33, n. 1, Wayne, PA: CLSI, 2013. 205 p.

COSTA, A. L. P.; JUNIOR, A. C. S. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p. 45-57, 2017.

CUMMINS, A.J., FIELDING, A.K. AND MCLAUCHLIN, J. *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS. **J. Infect.** 28, 89–91, 2004.

ELSHINAWY, S. H.; MESHREF, A. M.S; ZEINHOM, M. M. A.; HAFEZ. D. A. A. Incidence of *Listeria* species in some dairy products in Beni-Suef governorate, Assiut Veterinary Medical Journal, Vol. 63, No. 152, 5-13, 2017.

ESTRELA, T. S. Resistência antimicrobiana: enfoque multilateral e resposta brasileira. In: BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Assessoria de Assuntos Internacionais de Saúde. Saúde e Política Externa: os 20 anos da Assessoria de Assuntos Internacionais de Saúde: (1998-2018)**. Brasília, 2018. Cap. 18, p. 307-327.

FERRONATO, A. I.; PELLEGRINI, D. C. P.; Guerra, P.; CARDOSO, I. C. Distribuição de grupos clonais de *Listeria monocytogenes* em carcaças e no ambiente de matadouros frigoríficos de suínos. **Archives of Veterinary Science**, v. 17, p. 42-49, 2012.

FREITAG, N.E.; PORT, G.C.; MINER, M.D. *Listeria monocytogenes* — from saprophyte to intracellular pathogen. **Nature Reviews Microbiology**, v. 7, p. 623-628, 2009.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Pecuária Municipal**, v. 45, p. 1-8, Rio de Janeiro, Brasil, 2017.

LOUREIRO, R. J.; ROQUE, F.; RODRIGUES, A. T.; HERDEIRO, M. T.; RAMALHEIRA, E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016.

MACHADO, S. G.; BAGLINIÈRE, F.; MARCHAND, S.; VAN COILLIE, E.; VANETTI, M. C.; BLOCK, J.; HEYNDRICKX, M. The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products. *Front Microbiol*, v. 8, p. 302, 2017.

MARQUES, S. C.; EVANGELISTA, S. R.; PICCOLI, R. H. Diversidade e resistência a antibióticos de bactérias psicotróficas isoladas de tanques coletivos de resfriamento de leite. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 4, p. 670-676, 2012.

MORVAN, A.; MOUBARECK, C.; LECLERCQ, A.; HERVÉ-BAZIN, M.; BREMONT, S.; LECUIT, M.; CORVALIN, P.; LE MONNIER, A. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* strains isolated from humans in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2728-2731, 2010.

MOURA, F. M. L.; ANDRADE, J. M.; SILVA, T. M. S. S.; SOARES, K. D. A.; PEIXOTO, A. F.; MEDEIROS, E. S. *Listeria monocytogenes* in expansion tank milk assessed in Alagoas state counties, Brazil. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 12, n. 1, p. 24-28, 2018.

OHUE, L. A.; ENURAH, L. U. ABOABA, O. O. Prevalence and antibiotics susceptibility profile of *Listeria monocytogenes* isolated from processed and unprocessed meat products in Lagos, Nigeria. **Science and Technology**, v.1, n.1, p. 12-18, 2015.

OLAIMAT, A. N.; AL-HOLY, M. A.; SHAHBAZ, H. M.; AL-NABULSI, A. A.; GHOUSH, M. H. A.; OSAILI, T. M.; AYYASH, M. M.; HOLLEY, R. A. Emergence of Antibiotic Resistance in *Listeria monocytogenes* Isolated from Food Products: A Comprehensive Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, V. 17, P. 1277-1293, 2018.

OLIVEIRA, G. B.; FAVARIN, L.; LUCHESE, R. H.; MCINTOSH, D. Psychrotrophic bacteria in milk: How much do we really know? **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n 2, p. 313-321, 2015.

PERRIN, M.; BEMER, M.; DELAMARE, C. Fatal case of *Listeria innocua* bacteremia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5308-5309, 2003.

QUIGLEY, L.; O'SULLIVAN, O.; STANTON, C.; BERESFORD, T. P.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; COTTER, P. D. The complex microbiota of raw milk. *Federation of Microbiological Society/ Microbiology Review*, v. 37, p. 664–698, 2013.

REIS, C. M. F.; BARBOSA, A. V.; RUSAK, L. A.; VALLIM, D. C.; HOFER, E. Antimicrobial susceptibilities of *Listeria monocytogenes* human strains isolated from 1970 to 2008 in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 2, p-173-176, 2011.

REIS, K. T. M. G.; SOUZA, C. H. B.; SANTANA, E. H. W.; ROIG, S. M. Qualidade microbiológica de leite cru e pasteurizado produzido no Brasil: Revisão. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 15, p. 411-421, 2013.

ROCOURT, J.; HOF, H.; SCHRETTENBRUNNER, A. Acute purulent *Listeria seeligeri* meningitis in an immunocompetent adult. **Schweizerische Medizinische Wochenschrift**, v. 116, n. 8, p. 248-251, 1986.

ROSA, G.; LIMA, J. S.; BONDEZAN, M. A. D.; PACHECO, F. C.; BROCH, N. R. A., BESSI, W. H., LIMA, J. S.; SOUZA, S. G. Detection of *Listeria monocytogenes* in frescal cheese traded

in the northwestern region of the state of Paraná. **Jornal Interdisciplinar de Biociências**, v. 3, n. 1, p. 51, 2018.

SAMARZIJA, D.; ZAMBERLIN, S.; POGACIC, T. Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. **Mljekarstvo**, v. 62, n. 2, p. 77-95, 2012.

SILVA, Á. S.; ARAGON, C. C.; SANTANA, E. H. W.; DESTRO, M. T.; REZENDE COSTA, M.; ALEGRO, L. C. A. *Listeria monocytogenes* em leite e produtos lácteos no Brasil: Uma revisão. **UNOPAR Científica de Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 13, n. 1, p. 59-67, 2011.

TRONCO, V. M. Micro-organismos do leite. In: __ Manual para Inspeção **da Qualidade do Leite**, 5 ed. Santa Maria: Editora UFSM, Cap. 2, p. 41-58, 2013

USDA – United States Department of Agriculture. Dairy: World markets and trade. **Foreign Agricultural Service**, julho de 2018. Disponível em: <<https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/dairy.pdf>> . Acesso em: dezembro de 2018.

VERA, A.; GONZÁLEZ, G.; DOMÍNGUEZ, M.; BELLO, H. Principales factores de virulência de *Listeria monocytogenes* y su regulación. **Revista Chilena de Infectología**, v. 30, n. 4., p. 407-416, 2013.

WHO – World Health Organization. **Global Action Plan on Antimicrobial Resistance**. 2015.

YAMAGUCHI, L. C. T.; CARVEIRO, A. V.; MARTINS, P. C.; HOTT, M. C. ARAÚJO, J. M. Caracterização dos sistemas referências na produção de leite da Região Agreste. In: CARVALHO, G. C.; CARNEIRO, A. V.; YAMAGUCHI, L. C. T.; MARTINS, P. C.; HOTT, M. C.; REIS FILHO, R. J. C.; OLIVEIRA, M. A. **Competitividade da cadeia produtiva do leite em Pernambuco**, Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2009. Cap. 3, p 43-74.

5. ARTIGO I

Listeria* spp. potencialmente patogênicas em leite cru refrigeradoPotentially pathogenic Listeria spp. in refrigerated raw milk***Juliana Nunes Carvalho^{I*} Rejane de Oliveira Luna^{II} Arthur Vinícius Lago Lopes^{III}****Emiko Shinozaki Mendes^I Anamélia Sales de Assis^I Paulo Roberto Eleutério de Souza^I****RESUMO**

Leite e produtos lácteos estão entre os alimentos com maior risco de veicularem o agente causador da listeriose, uma grave doença de caráter zoonótico com alta mortalidade entre indivíduos imunocomprometidos. Objetivou-se com este artigo determinar a ocorrência de *Listeria* spp. com potencial patogênico e resistentes a antimicrobianos em leite cru refrigerado produzido na região Agreste de Pernambuco. Dos 140 isolados presuntivos, 32,85% (46/140) foram confirmados para o gênero *Listeria*. Desses, 8,69% (4/46) das *Listeria* detectadas apresentaram os três genes de virulência pesquisados – *hlyA*, *inlA* e *actA*, indicando que esses isolados possuem propriedades de uma cepa virulenta. De acordo com o perfil de resistência a antimicrobianos das *Listeria* testadas, vancomicina, gentamicina e tetraciclina são as drogas mais eficientes contra essas bactérias. A ampicilina foi o antimicrobiano com maior índice de resistência, apresentada por 60,87% dos isolados. Diante do exposto, infere-se que o leite cru refrigerado produzido no agreste de Pernambuco constitui um risco à saúde pública e à cadeia produtiva leiteira do Estado pela presença de *Listeria* spp. potencialmente patogênicas e multirresistentes a antimicrobianos.

Palavras-chave: saúde pública, zoonose, microbiologia, *Listeria monocytogenes*, resistência a drogas.

^IUniversidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife, PE, Brasil

^{II}Secretaria da Saúde de Jaboatão, PE, Brasil.

^{III}Médico Veterinário Autônomo

* Autora para correspondência: jucarvalho87@gmail.com

ABSTRACT

Milk and dairy products are among the food with higher risk of transmitting the causative agent of listeriosis, a serious zoonotic disease with high mortality in immunocompromised individuals. The aim of this paper was to determine occurrence of potentially pathogenic and antimicrobial-resistant *Listeria* spp. in refrigerated cold milk. Of the 140 presumptive isolates, 32.85% (46/140) were confirmed for the genus *Listeria* and 8.69% (4/46) of these presented the three virulence genes investigated (*hlyA*, *inlA* and *actA*) indicating that these isolates have properties of a virulent strain. According to the antimicrobial resistance profile of *Listeria* tested, vancomycin, gentamicin and tetracycline are the most efficient drugs against these bacteria. Ampicillin was the antimicrobial with the highest resistance index, presented by 60.87% of the isolates. In conclusion, the milk produced and stored cold in agreste region of Pernambuco constitutes a risk to public health and to the dairy production chain of the State by the presence of *Listeria* spp. potentially pathogenic and multidrug-resistant.

Key words: public health, zoonosis, microbiology, *Listeria monocytogenes*, drug-resistance.

INTRODUÇÃO

Listeria spp. são bacilos Gram-positivos, não esporulados, amplamente distribuídos e bem adaptados ao ambiente, alimentos e animais (SHAMLOO et al., 2018). São relativamente resistentes a condições ambientais adversas, tais como alta concentração de sal, alta acidez, baixa umidade e baixa concentração de oxigênio, além de serem psicotróficas, sobrevivendo e desenvolvendo-se em temperaturas de refrigeração (JUNG, 2009; BUCHANAN et al., 2017).

Embora o gênero *Listeria* contenha sete espécies, a *L. monocytogenes* é considerada a mais importante por ser o principal agente causador da listeriose, reconhecida como uma das

mais graves enfermidades bacterianas emergentes de caráter zoonótico, podendo infectar humanos e animais. A doença se expressa geralmente como um quadro de gastroenterite febril leve ou similar à gripe, mas pode se desenvolver na forma sistêmica invasiva resultando em aborto, septicemia, meningite e encefalite, com alta taxa de mortalidade entre a população susceptível, que inclui idosos, grávidas e imunocomprometidos (ELSHINAWY et al., 2017; SHAMLOO et al., 2018). Estima-se que 99% dos casos de listeriose sejam de origem alimentar. Alimentos favoráveis ao crescimento da bactéria e de alto consumo são os com maiores riscos de causarem a doença. Entre eles, estão leite, pasteurizado ou não, queijos macios não maturados e produtos lácteos com alto teor de gordura (JUNG, 2009; BUCHANAN et al., 2017).

A capacidade de um micro-organismo de causar doença depende de sua competência em ingressar, multiplicar-se e propagar-se entre as células do hospedeiro. O processo de infecção celular por *L. monocytogenes* tem sido bem caracterizado e os produtos genéticos essenciais para sua realização foram identificados. Os principais fatores de virulência das espécies de *Listeria* estão codificados num segmento cromossomal conhecido como ilhas de patogenicidade da *Listeria* 1 (LIPI-1), presente nas espécies *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* (JUNG, 2009).

A proteína listeriolisina O (LLO), determinada pelo gene *hly*, é o principal fator de virulência de *L. monocytogenes* por sua atividade hemolítica (hemolisina) além de mediar a lise do vacúolo (formação de poros) permitindo sua sobrevivência no interior da célula. A proteína *actA* (*actA*) é o principal fator envolvido na movimentação intra e intercelular, ou seja, na disseminação da bactéria no processo de infecção (BORGES et al., 2009; VERA et al., 2013). A internalina A (*inlA*) é uma proteína de superfície que determina a ligação e invasão de *L. monocytogenes* no primeiro sítio de ligação da infecção, a célula epitelial intestinal do

hospedeiro. Diferente dos genes *hly* e *actA*, os genes responsáveis pela produção de internalinas (*inl*) estão fora da LIPI-1 (JUNG, 2009; VERA et al., 2013).

A resistência antimicrobiana, capacidade de um microrganismo impedir a atuação de um antimicrobiano, é considerada um dos desafios aos sistemas de saúde contemporâneos. Estima-se que 700 mil mortes sejam causadas anualmente pela resistência aos antimicrobianos, que tem como consequência mais grave a ineficácia dos tratamentos e persistência da infecção (ESTRELA, 2018). Bactérias resistentes circulam entre humanos, animais e ambiente, o que justifica o enfrentamento da questão sob as perspectivas conjugadas de saúde humana, animal e ambiental (*One Health approach* – abordagem de Saúde Única), afim de obter maior eficácia das ações (WHO, 2015).

Desde a emergência de sua primeira cepa multirresistente em 1988, *Listeria monocytogenes* tem sido monitorada quanto à resistência antimicrobiana (O’CONNOR et al., 2010). Recentemente, resistência a antibióticos entre linhagens ambientais ou isoladas de alimentos tem aumentado, principalmente para aquelas drogas comumente utilizadas no tratamento da listeriose, tais como tetraciclinas, eritromicina, ampicilina e gentamicina (OLAIMAT et al., 2018). Assim, monitorar mudanças no perfil de resistência de *L. monocytogenes* é necessário devido ao surgimento lento e gradual de cepas resistentes. Objetivou-se com este artigo determinar a ocorrência de *Listeria* ssp. com potencial patogênico e resistentes a antimicrobianos em leite cru refrigerado.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção das amostras

As amostras de leite cru refrigeradas foram coletadas de tanques de refrigeração de 20 propriedades produtoras de leite localizadas no agreste pernambucano e, após

acondicionamento em caixas isotérmicas contendo gelo reciclável, enviadas para análise no Centro de Laboratórios de Garanhuns (CENLAG) da Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). As amostras foram mantidas em geladeira (7°C) até completarem 48 h sob refrigeração, procedendo em seguida com a pesquisa de *Listeria* spp.

Detecção e isolamento de *Listeria* spp.

A detecção de bactérias do gênero *Listeria* foi baseada no método descrito por HITCHINS et al. (2016), com adaptações na fase de enriquecimento seletivo, realizada adicionando 25ml da amostra a 225 ml de caldo Half Fraser, com incubação a 30°C por 48 h. Para isolamento, alçadas do caldo enriquecido após 24 e 48h de incubação foram semeadas em ágar Oxford, sendo as placas incubadas a 37°C por 48h. Colônias com desenvolvimento característico de *Listeria* (negras com halo negro) foram purificadas e isoladas em ágar tripticase de soja com extrato de levedura (TSA-YE). Coloração de Gram foi realizada para avaliação da morfologia característica e pureza. Os isolados presuntivos de *Listeria* spp. foram estocados em caldo tripton de soja (TSB) contendo 25% de glicerina a -80°C para posterior identificação molecular.

Análises moleculares

Para as análises moleculares, o DNA foi extraído segundo descrito por ABDELLRAZEQ et al. (2014), com adaptações. Colônias presuntivas de *Listeria* spp. foram inoculadas em caldo TSB-YE e incubadas a 37°C por 24-48h. O caldo enriquecido foi distribuído em microtubos de 1,5 ml, os quais foram centrifugados a 10000 rpm por 2 minutos até a formação de pellets, que foram ressuspensos em água ultra-pura com auxílio de vortex num volume final de 50µl. Os microtubos foram submetidos a banho-maria a 100°C por 10

minutos e, em seguida, resfriados a -20°C por 5 minutos. Após o choque térmico, os microtubos foram centrifugados a 15000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante contendo DNA genômico foi coletado e utilizado nos ensaios de PCR.

A confirmação de gênero foi executada por meio da amplificação de um fragmento do gene 23S rRNA (*S2*), conforme descrito por PAILLARD et al. (2003). Para amplificação de DNA utilizou-se 10 µl de Green Master Mix 2x (Promega), 0,5 µM de cada primer, 1µl do DNA extraído e água ultrapura para completar o volume final de 20 µl. As condições de amplificação foram: desnaturação a 95°C por 5 min, seguida por 35 ciclos a 94°C por 1 min, 50°C por 1 min e 72°C por 1 min e um ciclo final de 72°C por 7 min (PAILLARD et al., 2003). O produto de PCR foi visualizado por eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com Sybr Green (Bio Rad).

Os isolados confirmados para o gênero *Listeria* foram testados quanto à presença de genes de virulência (*hlyA*, *actA*, *inlA*) segundo condições especificadas por CICCIO et al. (2012). Para as reações de amplificação utilizou-se 12,5 µl de Green Master Mix 2x (Promega), 0,9 µM de cada primer, 2µl do DNA e água ultra-pura para completar o volume final de 25 ul. No termociclador, os parâmetros utilizados foram: 94°C por 3 minutos para desnaturação inicial seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1,2 minuto, anelamento a 55°C por 1,3 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, com extensão final a 72°C por 10 minutos (CICCIO et al., 2012). Os produtos da amplificação foram corados com Sybr Green, submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% e os resultados visualizados sob luz UV.

O controle positivo *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 (Fiocruz) foi utilizado em todas as análises moleculares. As sequências de *primers* utilizados nas reações de PCR bem como tamanho dos fragmentos formados estão listados na Tabela 1.

Teste de sensibilidade a antimicrobianos

Os isolados confirmados de *Listeria* spp. foram avaliados quanto à sensibilidade a antimicrobianos pelo método de difusão em disco, como recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). As drogas e concentrações foram selecionadas com base nos antimicrobianos utilizados na terapia humana e veterinária: ampicilina (10 µg), sulfametoxazol/trimetopim (25 µg), vancomicina (30 µg), eritromicina (15 µg), gentamicina (10 µg), rifampicina (5 µg), tetraciclina (30 µg).

Os isolados de *Listeria* foram reativados em TSA-YE a 37°C por 24 h e, pelo menos, três a cinco colônias transferidas para 5 mL de solução salina 0,85% até obter 0,5 de turbidez na escala de McFarland. Essa suspensão foi inoculada em ágar Muller-Hinton com swab estéril e os discos de antibiótico dispensados sobre o ágar. As placas foram incubadas a 37°C por 18-24 h (NCCLS, 2003). O diâmetro das zonas de inibição de crescimento foi medido e interpretado utilizando os limites estabelecidos para *Staphylococcus* spp. em CLSI (2013), uma vez que não há padrões referentes a *Listeria* sp. para todos os antibióticos testados.

Análise de dados

Os dados referentes à ocorrência de *Listeria* spp. e a frequência dos genes de virulência foram analisados por meio de estatística descritiva.

O índice de Múltipla Resistência a Antibióticos (MAR) foi calculado como o número de antimicrobianos ao qual determinado isolado foi resistente sobre o número total de antibióticos testados, sendo o valor final multiplicado por 100 para obtenção dos resultados em percentuais. Índice MAR acima de 0,2 (20%) foi indicativo de múltipla resistência (KRUMPERMAN, 1983).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 140 isolados presuntivos, 32,85% (46/140) foram confirmados para o gênero *Listeria*. A detecção de *Listeria* spp. nesta pesquisa se torna um dado relevante, uma vez que existem relatos de casos de listeriose humana envolvendo outras espécies além da *L. monocytogenes* (ROCOURT et al., 1986; CUMMINS et al., 2004; GUILLET et al., 2010). Além disso, de acordo com FERRONATTO et al. (2012), a presença de outras espécies de *Listeria* em alimentos é um indicador de condições inadequadas de higiene e processamento e significa um maior risco de contaminação por espécies patogênicas de *Listeria*, já que todas vivem sob as mesmas condições. ELSHINAWY et al. (2017) encontraram *Listeria* spp. em 10% das amostras de diversos produtos lácteos analisados enquanto MOURA et al. (2018), ao avaliar leite de tanques de expansão em Alagoas obtiveram 23,3% de amostras positivas para bactérias do gênero *Listeria*, sendo esse o resultado mais próximo ao encontrado nesta pesquisa.

Das *Listeria* detectadas no atual estudo, 8,69% (4/46) apresentaram os três genes de virulência pesquisados – *hlyA*, *inlA* e *actA*, indicando que esses isolados possuem propriedades de uma cepa virulenta. A informação genética contida nos genes de virulência pode ser divergente entre cepas de *L. monocytogenes* e outras *Listeria* spp., o que explica a não amplificação desses genes nos demais isolados de *Listeria* (ABDELLRAZEQ et al., 2014).

JUNG (2009) determinou que genes localizados na ilha de patogenicidade 1, tais como *hlyA* e *actA*, são alvos confiáveis para a diferenciação molecular de *L. monocytogenes* das demais espécies de *Listeria*. Diversos estudos utilizaram a identificação do gene *hlyA* para a identificação de *L. monocytogenes* (BORDER et al, 1990; AZNAR & ALARCÓN, 2003; PERES et al., 2010; AKSOY et al., 2018). Para POURNAJAF et al. (2016), o gene *inlA* é espécie-específico, estando presente em todas as *L. monocytogenes* independente da fonte e serovar, e ausente em outras espécies de *Listeria* ou em outras bactérias. ABDELLRAZED et

al. (2014) verificaram que a detecção de apenas um gene associado à virulência é insuficiente para identificar isolados de *L. monocytogenes* ou o verdadeiro potencial patogênico da cepa, tendo utilizado, para isso, quatro genes de virulência (*prfA*, *hlyA*, *actA* e *inlA*). Com base nessas informações, é possível afirmar que as cepas com potencial virulento identificadas neste estudo (8,69%) são cepas da espécie *Listeria monocytogenes*.

MATTOS et al. (2010), ao avaliar a qualidade do leite do agreste pernambucano, não encontraram *L. monocytogenes* em suas análises. O mesmo resultado negativo foi obtido por ROSA et al. (2018) em análise de queijo frescal, que defendem que a recuperação do patógeno no caldo de enriquecimento é dificultada pela baixa população de *L. monocytogenes*, lesão subletal causada pelo processamento e inibição pela presença de coliformes, de forma que resultado negativo não garante a ausência da bactéria.

A presença da *L. monocytogenes* nos tanques de refrigeração está associada à contaminação fecal direta ou à contaminação ambiental da superfície do úbere, indicando falhas higiênicas no manejo da ordenha. *L. monocytogenes* é um contaminante comum do leite cru e sua prevalência em tanques de leite a granel fica em torno de 2 a 7%, em consonância com o encontrado nesta pesquisa. Dessa forma, o consumo de leite não-pasteurizado se apresenta como um risco de listeriose, além de representar perigo de contaminação cruzada no ambiente de beneficiamento (CASTRO et al., 2018).

Do ponto de vista regional, a presença de *Listeria* spp. nos tanques de refrigeração tem mais um agravante. Parte da produção leiteira de Pernambuco é utilizada na fabricação de queijo coalho artesanal, produto típico nordestino, que, de acordo com legislação estadual (ADAGRO, 2018) pode ser fabricado a partir do leite cru, mesmo sem maturação. Esse derivado lácteo é, muitas vezes, mantido sob períodos prolongados sob refrigeração e consumido sem aquecimento térmico prévio, ambos fatores de risco para a listeriose. No Brasil, é determinada a ausência de *Listeria monocytogenes* em queijos de média a alta umidade,

curados, ralados ou em pó, não existindo parâmetros para outras espécies de *Listeria* ou outros produtos lácteos (BRASIL, 2001).

O monitoramento da resistência a antimicrobiano de *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* é necessário para compreender mudanças nos padrões de resistência comumente usados, implementar medidas pró-ativas de controle para o uso de agentes antimicrobianos e para evitar a propagação de resistência por cepas (ABDELLRAZEQ et al., 2014). Com o perfil de resistência a antimicrobianos das *Listeria* testadas ficou demonstrado que a vancomicina, a gentamicina e a tetraciclina são as drogas mais eficientes contra essas bactérias. Os resultados do teste de susceptibilidade a antimicrobianos podem ser observados na Figura 1.

A ampicilina e o sulfametoxazol-trimetropim foram os antimicrobianos com maior índice de resistência, demonstrada por 60,87% e 43,47% dos isolados de *Listeria* spp., respectivamente. Isso pode configurar uma limitação nas opções de tratamento de um paciente com listeriose, uma vez que ampicilina associada com gentamicina ou sulfametoxazole-trimetropim associado com rifampicina são drogas de eleição para o tratamento da listeriose (DE NES et al, 2010).

Com índice MAR entre 0,28 e 0,85, 43,47% dos isolados foram caracterizados como multirresistentes. Esse resultado representa uma preocupação para a saúde pública pois isolados multirresistentes podem disseminar genes de resistência a outras *Listeria* spp. e a outros microorganismos. Em vários estudos sobre a resistência antimicrobiana em *Listeria* spp. foi apontado que o material genético envolvido na adaptação evolucionária de curto prazo pode ser transferido com sucesso entre *Listeria* spp. e outras bactérias Gram-positivas evolutivamente relacionados, como *Enterococcus* spp.

Estudos recentes comprovaram o aumento substancial de resistência a antimicrobianos em *L. monocytogenes*, porém, sua prevalência varia geograficamente (ABDELLRAZEQ et al. 2014). Em isolados de leite produzido no sudeste do Brasil, DE NES et al. (2010) não

encontraram *Listeria monocytogenes* resistentes para os antibióticos testados, entre eles, tetraciclina, ampicilina, gentamicina, vancomicina e eritromicina. Já na Turquia, AKSOY et al.(2018) encontraram que 66,66% das *Listeria* isoladas de leite cru e derivados foram sensíveis a todos os antibióticos testados. Esses dados estão em desacordo com o presente estudo uma vez que 89,13% dos isolados de *Listeria* apresentaram resistência a pelo menos uma das drogas testadas. A diferença nos índices de resistência podem ser influenciados pelo país envolvido e pelas regulamentações que autorizam o uso de antibióticos, pelas práticas de produção e processamento, e pelo tipos das amostras (ABDELLRAZEQ et al. 2014).

CONCLUSÃO

Diante do exposto, infere-se que o leite cru refrigerado produzido no agreste de Pernambuco constitui um risco à saúde pública e à cadeia produtiva leiteira do Estado pela presença de *Listeria* spp. potencialmente patogênicas e multirresistentes a antimicrobianos.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSES

Não há conflito de interesses a declarar.

REFERÊNCIAS

ABDELLRAZEQ, G. et al. Molecular characterization os *Listeria* species isolated from frozen fish. **Alexandria Journal of Veterinary Sciences**, v. 40, n.1, p. 1-15, 2014.

ADAGRO - Agência de Defesa e Fiscalização Agropecuária do Estado de Pernambuco. Portaria ADAGRO nº 007 de Janeiro de 2018.. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Queijo de Coalho no Estado de Pernambuco. **Diário Oficial do Estado de Pernambuco**, Recife, 08 jan. 2018, p.18.

AKSOY, A. et al. Presence and antibiotic resistance of *Listeria monocytogenes* in raw milk and dairy products. **Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi**, v. 24, p. 415-421, 2018.

AZNAR, R.; ALARCÓN, B. On the specificity of PCR detection of *Listeria monocytogenes* in food: a comparison of published primers. **Systematic and applied microbiology**, v. 25, n. 1, p. 109, 2002.

BORDER, P. et al. Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. **Letters in Applied Microbiology**, v.11, p. 158-162, 1990.

BORGES, M. F. et al. *Listeria monocytogenes* em leite e produtos lácteos. **Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos**, 119. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2009. 31p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada nº 12. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos em Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília – DF, 10 de janeiro de 2001.

BUCHANAN, R. L. et al. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. **Food Control**, v. 72, p. 1-13, 2017.

CASTRO, H. et al. Occurrence, Persistence, and Contamination Routes of *Listeria monocytogenes* Genotypes on Three Finnish Dairy Cattle Farms: a Longitudinal Study. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, p. 1-14, 2018.

CICCIO, P. D. et al. Longitudinal study on the sources of *Listeria monocytogenes* contamination in cold-smoked salmon and its processing environment in Italy. **International Journal of Food Microbiology**, v. 158, p. 79-84, 2012.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute (2013). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-Third Informational Supplement**. Document M100-S23, v. 33, n. 1, Wayne, PA: CLSI, 2013. 205 p.

CUMMINS, A.J. et al. *Listeria ivanovii* infection in a patient with AIDS. **Journal of Infectology**, v. 28, p. 89–91, 2004.

DE NES, F. et al. Antimicrobial resistance and investigation of the molecular epidemiology of *Listeria monocytogenes* in dairy products. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 4, p. 382-385, 2010.

ELSHINAWY, S. H. et al. Incidence of *Listeria* Species in some dairy dproducts in Beni-Suef Governorate. **Assiut Veterinary Medical Journal**, v. 63, p. 5-13, 2017.

ESTRELA, T. S. Resistência antimicrobiana: enfoque multilateral e resposta brasileira. In: BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Assessoria de Assuntos Internacionais de Saúde. Saúde e Política Externa: os 20 anos da Assessoria de Assuntos Internacionais de Saúde: (1998-2018)**. Brasília, 2018. Cap. 18, p. 307-327.

FERRONATO, A. I. et al. Distribuição de grupos clonais de *Listeria monocytogenes* em carcaças e no ambiente de matadouros frigoríficos de suínos. **Archives of Veterinary Science**, v. 17, p. 42-49, 2012.

GUILLET, C.; et al. Human listeriosis caused by *Listeria ivanovii*. **Emerging infectious diseases**, v. 16, n. 1, p. 136, 2010.

HITCHINS, A. D. et al. Detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. **Bacteriological Analytical Manual (on line)**, jan/2016 ed., Cap. 10, U.S. Food and Drugs Administration, Washington, DC. Disponível em:

<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071400.htm>.

Acesso em: junho de 2016.

JUNG, H.J. Species-Specific Detection of *Listeria monocytogenes* Using Polymerase Chain Reaction Assays Targeting the *prfA* Virulence Gene Cluster. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 76, p. 1412-1415, 2009.

KRUMPERMAN, P.H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Applied Environmental Microbiology**, v. 46, p. 165-170, 1983.

MATTOS, M. R. et al. Qualidade do leite cru produzindo na região do agreste de Pernambuco, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n.1, p. 173-182, 2010.

MOURA, F. M. L. et al. *Listeria monocytogenes* in expansion tank milk assessed in Alagoas state counties, Brazil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 12, p. 24-28, 2018.

NCCLS. National Committee of Clinical Laboratory Standards (2003). **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests: Approved Standard – 8th ed.** Document M2-A8. Wayne, PA: NCCLS. V.23, n.1, 2003. 58 p.

O'CONNOR, L. et al. The characterization of *Listeria* spp. isolated from food products and the food-processing environment. **Applied Microbiology**, v. 51, p. 490-498, 2010.

OLAIMAT, A. N. et al. Emergence of Antibiotic Resistance in *Listeria monocytogenes* Isolated from Food Products: A Comprehensive Review. **Food Science and Food Safety**, v. 17, p. 1277-1292, 2018

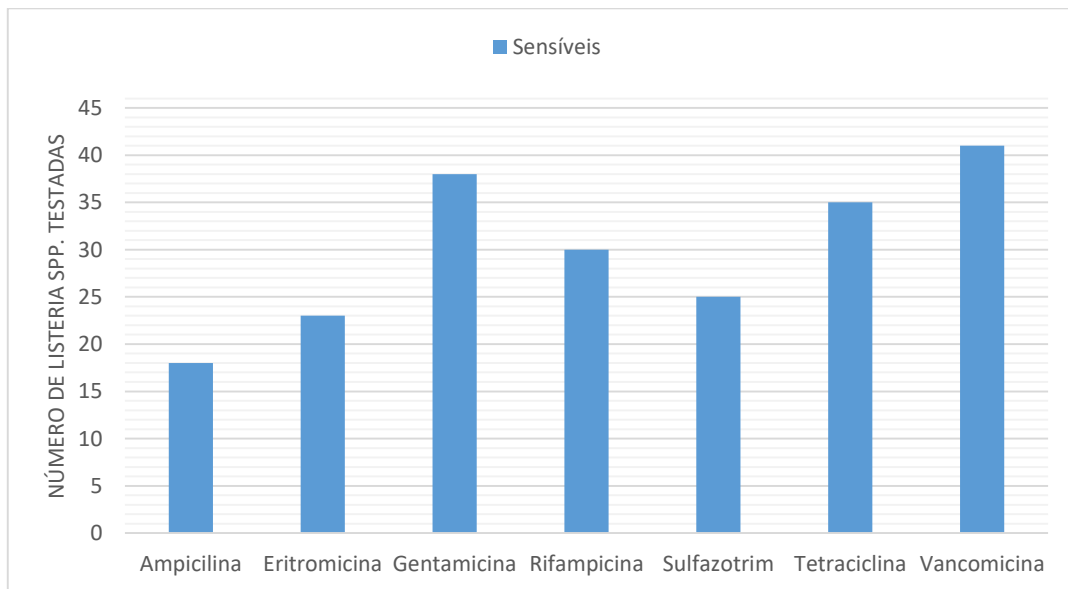
PAILLARD, D. et al. Rapid identification of *Listeria* species by using restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified 23S rRNA gene fragments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 11, p. 6386-6392, 2003.

PERES, N. D. et al. Detecção de *Listeria monocytogenes* pela técnica de PCR em leite contaminado artificialmente. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p. 973-979, 2010.

- POURNAJAF, A. et al. Prevalence, and virulence determination of *Listeria monocytogenes* strains isolated from clinical and non-clinical samples by multiplex polymerase chain reaction. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, p. 624-627, 2016.
- ROCOURT, J. et al. Acute purulent *Listeria seelingeri* meningitis in an immunocompetent adult. **Schweizerische Medizinische Wochenschrift**, v. 116, n. 8, p. 248-251, 1986.
- ROSA, G. et al. Evaluation of *Listeria monocytogenes* in frescal cheese traded in the northwestern region of the state of Paraná. **Jornal Interdisciplinar de Biociências**, v. 3, p. 1-5, 2018.
- SHAMLOO, E. et al. Prevalence of *Listeria* species in raw milk and traditional dairy products in Isfahan, Iran. **International Journal of Environmental Health Engineering**, v. 3, p. 1-5, 2014.
- VERA, A.; GONZÁLEZ, G.; DOMÍNGUEZ, M.; BELLO, H. Principales factores de virulência de *Listeria monocytogenes* y su regulación. **Revista Chilena de Infectologia**, v. 30, n. 4., p. 407-416, 2013.
- WHO – World Health Organization. **Global Action Plan on Antimicrobial Resistance**. 2015.

Tabela 1. Pares de primers utilizados nas reações de PCR

Gene	Sequência do primer (5'3')	Tamanho do produto (pb)	Referência
S2	S2F: GCCTACAAGTAGTTAGAGCC	890	Paillard et al., 2003
	S2R: ACTGGTACAGGAATCTCTAC		
hlyA	hlyAF: CCT AAG ACG CCA ATC GAA	702	Ciccio et al., 2012
	hlyAR: AAG CGC TTG CAA CTG CTC		
ActA	ActAF: GACGAAAATCCCGAAGTGAA	268 ou 385	Ciccio et al., 2012
	ActAR: CTAGCGAAGGTGCTGTTTCC		
inlA	inlAF: CCT AGC AGG TCT AAC CGC AC	255	Ciccio et al., 2012
	inlAR: TCG CTA ATT TGG TTA TGC CC		

**Figura 1.** Susceptibilidade de *Listeria* spp. isoladas de leite cru refrigerado a antimicrobianos.

6. ARTIGO II

Submetido ao periódico *Brazilian Journal of Microbiology*
(ISSN 1678-4405)

**Identificação filogenética de bactérias psicrotróficas cultiváveis com potencial
deteriorante em leite cru refrigerado**

*Phylogenetic identification of culturable spoilage-related psychrotrophic bacteria in
refrigerated raw milk*

Juliana N. Carvalho^{1*}, Paulo R. E. de Sousa², Nara S. A. de Freitas², Anamélia S. de
Assis³, Emiko S. Mendes⁴

¹Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

²Departamento de Biologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

³Unidade Acadêmica de Garanhuns/ UFRPE, Garanhuns, Brasil.

⁴Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

* Autora para correspondência: jucarvalho87@gmail.com

Resumo

Bactérias psicrotróficas podem produzir enzimas termoestáveis que degradam o leite e a estocagem a frio pode propiciar sua proliferação. Por isso, objetivou-se quantificá-las em leite cru refrigerado da região do Agreste em Pernambuco, avaliando-se as suas características enzimáticas, e realizar a identificação por sequenciamento do gene 16S rRNA daquelas com potencial para deterioração. A concentração média de bactérias psicrotróficas foi de $2,1 \times 10^5$ UFC/mL de leite cru refrigerado. Apesar disso, em 58,3% (7/12) das fazendas as contagens foram abaixo de 10 UFC/mL. A atividade da lipase e/ou protease foi demonstrada por 38% dos isolados psicrotróficos, que foram identificados em 13 espécies e classificados em duas classes, Gammaproteobacteria e Bacilli. *Aeromonas*, *Exiguobacterium* e *Staphylococcus* foram gêneros dominantes, representando 77% dos isolados e, em menor frequência, *Macrococcus*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Enterococcus* e *Lactococcus*. O conhecimento gerado por este trabalho permite inferir possíveis falhas na produção e armazenamento de leite cru e adequar os procedimentos higiênico-sanitários e de controle, a fim de evitar alta concentração de bactérias psicrotróficas com consequente produção de enzimas deteriorantes.

Palavras-chave: protease, lipase, deterioração, produtos lácteos, identificação microbiana

Introdução

A obrigatoriedade do resfriamento e estocagem a frio do leite cru, instituída por meio da Instrução Normativa nº51 de 2002 (Brasil, 2002), trouxe melhorias significantes na sua qualidade. Essa medida resultou na redução de perdas causadas pela acidificação do leite cru, causada principalmente pela proliferação de bactérias lácteas e outros mesofílicos ali presentes (Samarzija et al., 2012).

A refrigeração prolongada do leite cru a baixas temperaturas (2 a 6°C), no entanto, detém significativa influência na composição da sua microbiota natural. As bactérias aeróbias mesofílicas Gram-positivas, inicialmente dominantes, são substituídas por psicrotróficas Gram-positivas e Gram-negativas (Samarzija et al., 2012). Muitas dessas bactérias são capazes de produzir enzimas hidrolíticas termoestáveis, principalmente proteases e lipases, que degradam os principais constituintes orgânicos do leite. Apesar de tratamentos térmicos convencionais serem eficazes na eliminação da grande maioria dessas bactérias, as enzimas produzidas durante a estocagem do leite mantêm cerca de 30 a 100% de sua atividade após pasteurização ou esterilização (Samarzija et al., 2012; Reis et al., 2013).

Considerando qualidade e aspectos econômicos, as enzimas termoestáveis imprimem grande impacto sobre a indústria de produtos lácteos, uma vez que levam a defeitos de sabor e odor, redução do rendimento de derivados e problemas tecnológicos, tais como sedimentação e geleificação em leites UHT, rancidez e alteração no sabor de leite em pó e queijos durante a vida de prateleira desses produtos (Machado et al, 2017). As perdas econômicas são causadas pelo custo direto dos *recalls* dos produtos e, indiretamente, pelo dano à imagem das empresas envolvidas com os problemas (Ribeiro Júnior et al, 2018).

O conhecimento da diversidade de bactérias psicrotróficas é essencial para determinar sua origem e corrigir falhas de higiene, visando reduzir a ocorrência desses micro-organismos no leite cru. Embora existam vários estudos avaliando a microbiota psicrotrófica no leite cru, sua composição é altamente influenciada por fatores geográficos e práticas higiênicas na ordenha (Ribeiro Júnior et al., 2018). Dessa forma, objetivou-se quantificar bactérias psicrotróficas em leite cru refrigerado produzido no Agreste pernambucano, avaliar sua capacidade de produção de protease e lipase e identificar aquelas com potencial deteriorante.

Material e métodos

Obtenção das amostras

As amostras de leite cru foram coletadas de tanques de refrigeração de 12 propriedades de cinco municípios produtores de leite localizadas na bacia leiteira, no Agreste pernambucano. As amostras foram acondicionadas em caixas isotérmicas, contendo baterias de gelo recicláveis e enviadas para análise no Centro de Laboratórios de Garanhuns (CENLAG) da Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Todas as amostras permaneceram sob temperatura de refrigeração ($< 7^{\circ}\text{C}$) por um período mínimo de 24 horas, sem exceder 48 horas, para então serem analisadas.

Análise microbiológica

A enumeração de bactérias psicrotróficas foi realizada por contagem em placa, de acordo com o recomendado por Cousin et al. (1992). As amostras foram diluídas e inoculadas em duplicata por *spread plate* em placas contendo *Plate Count Agar* (PCA), as quais foram incubadas a 7°C por 10 dias. Após esse período, foram selecionadas para contagem as placas contendo, preferencialmente, de 25 a 250 colônias, e os resultados foram expressos em UFC/mL. Quando não houve desenvolvimento na menor diluição inoculada, o valor foi

estimado de acordo com o recomendado em Brasil (2003). Para fins de cálculo da média geral das contagens, considerou-se o menor número inteiro mais próximo ao valor que foi estimado.

Para o estudo da diversidade de psicrotróficas, colônias com diferentes morfologias foram selecionadas, purificadas e isoladas. Após avaliação da coloração de Gram para verificação de pureza, os isolados puros foram estocados em caldo triptona de soja (TSB) contendo 25% de glicerina e armazenados à temperatura de -80°C para posterior identificação molecular.

A capacidade de produção de protease e lipase pelos isolados psicrotróficos foi avaliada utilizando-se, respectivamente, ágar leite (TSA suplementado com 5% de leite em pó desnatado) e ágar tributirina suplementado com 2% de tributirina. Todos os isolados foram reativados em caldo TSB a 28°C por 24 h e uma alçada do caldo enriquecido foi inoculada em cada ágar, sendo as placas incubadas a 28°C por até 72 h. Em ambos os testes, a presença de uma zona clara ao redor das colônias foi indicativa de atividade proteolítica ou lipolítica da bactéria (Marques et al., 2012). Os isolados que apresentaram atividade proteolítica e/ou lipolítica foram submetidos a identificação molecular.

Análises moleculares

A extração do DNA bacteriano foi realizada por meio do kit de extração PureLink™ Genomic DNA, de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Fragmentos do gene 16S rRNA foram amplificados utilizando os primers universais *8f* (5'-CACGGATCCAGACTTTGATYMTGGCTCAG-3') e *1512r* (5'-GTGAAGCTTACGGYTAGCTTGTTACGACTT-3') (Felske et al., 1997), segundo as condições descritas por Hantsis-Zacharov e Halpern (2007). Para confirmação da amplificação, os produtos da PCR foram corados e submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% e visualizados sob luz UV. Os amplicons (~1400pb) foram purificados utilizando o kit PureLink

PCR Purification, quantificados (Qubit) e sequenciados em ABI PRISM 3500 Genetic Analyser na Plataforma de Sequenciamento de DNA do Laboratório Central da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

A análise dos cromatogramas provenientes do sequenciamento foi realizada utilizando o programa Chromas 2.6.6 e as sequências obtidas foram comparadas com os dados disponíveis no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) por meio do programa padrão BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool). As sequências do banco de dados, com genomas completos, que apresentaram maior similaridade no alinhamento individual com as sequências inseridas dos isolados foram utilizadas para identificação.

Análise de dados

As relações evolutivas entre as sequências das bactérias identificadas foi inferida utilizando o método *Neighbor-Joining*, gerando uma árvore filogenética, com base em alinhamentos realizados no CLUSTAL W. As análises evolucionárias foram conduzidas no programa MEGA X e os valores de bootstrap obtidos a partir de 50.000 repetições (Kumar et al., 2016). As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de correção de Poisson (Zuckerandl e Pauling, 1965).

Resultados e discussão

Os resultados das contagens de bactérias psicrotróficas estão expressos na Tabela 1. A média de bactérias psicrotróficas foi de $2,1 \times 10^5$ UFC/mL de leite cru refrigerado, apesar de 58,3% (7/12) das amostras apresentarem resultados inferiores a 10 UFC/mL. Todas as amostras das propriedades situadas na cidade de Bom Conselho e a de Garanhuns, apresentaram elevadas concentrações de psicrotróficas, demonstrando que há necessidade de maiores cuidados na higiene durante a obtenção do leite, diferentemente dos leites produzidos na cidade de Águas

Belas, que apresentaram baixa contaminação. Esses resultados reforçam que a presença de sistemas de refrigeração nas fazendas não garantem boa qualidade bacteriológica se altas contagens de micro-organismos psicotróficos estiverem presentes antes da estocagem do leite, uma vez que o frio não impede o crescimento dessa população (Molineri et al., 2012), ao contrário, favorece a proliferação por reduzir a competição com mesofílicos (Samarzija et al., 2012).

Tabela 1. Contagem de bactérias psicotróficas em amostras de leite do Agreste de Pernambuco.

Propriedade	Município	Contagem (UFC/mL)
I	Brejão	< 10*
II	Garanhuns	2,2 x 10 ⁵
III	Brejão	9
IV	Angelim	2,3 x 10 ³
V	Bom Conselho	1,7 x 10 ³
VI	Bom Conselho	2,2 x 10 ⁶
VII	Bom Conselho	5,5 x 10 ⁴
VIII	Águas Belas	<1*
IX	Águas Belas	2
X	Águas Belas	<1*
XI	Águas Belas	<1*
XII	Águas Belas	<1*

*valor estimado

Na União Europeia, o leite cru é considerado de alta qualidade quando tem contagem de bactérias psicotróficas abaixo de 5 x 10³ UFC/mL (Sarmarzija et al., 2012). Na legislação brasileira, entretanto, apesar de determinada a obrigatoriedade da refrigeração do leite cru, não são estabelecidos parâmetros para contagem de psicotróficos. 83% (10/12) das amostras analisadas nesse estudo apresentaram contagens inferiores a 10⁵ UFC/mL, o que indica qualidade microbiológica satisfatória segundo Ribeiro Júnior et al. (2018). Esses autores, ao analisar leite produzido no Sul do Brasil, classificaram como leite de alta qualidade

microbiológica aquele com contagem de psicotróficas inferior a 10^5 UFC/mL, tendo encontrado média de $1,1 \times 10^4$ UFC/mL.

Silva et al. (2011) avaliaram a qualidade microbiológica do leite produzido no Agreste pernambucano e encontraram concentração média de bactérias psicotróficas de $3,4 \times 10^7$ UFC/mL no início da refrigeração, aumentando para $7,3 \times 10^8$ UFC/mL após 24h de refrigeração. Em comparação com os resultados do presente trabalho, percebe-se uma diferença pronunciada e uma notável melhoria na qualidade do leite produzido em Pernambuco. Esse progresso provavelmente está relacionado à Instrução Normativa nº 62, publicada em dezembro de 2011, que estabelece parâmetros e prazos para a melhoria da qualidade do leite produzido no Brasil até 2017 além de regularizar a carga microbiana como parâmetro de pagamento do leite cru (Brasil, 2011). Em concordância, durante as coletas, vários produtores relataram que estabelecimentos que recebem o leite produzido na região para processamento passaram a ser mais rigorosos na recepção e a valorizar financeiramente matéria-prima entregue com qualidade superior.

Dos 79 isolados de micro-organismos psicotróficos obtidos, 30 (38%) apresentaram atividade enzimática proteolítica e/ou lipolítica *in vitro*, indicando que sua presença no leite pode causar deterioração e defeitos de fabricação, mesmo após tratamento térmico. A ação prolongada de proteases e lipases podem causar alterações organolépticas no leite fluido ou produtos derivados, tais como sabor amargo ou de ranço em leite ou geleificação e sedimentação em leite UHT (Ribeiro Junior et al., 2018), além de reduzir o tempo de vida útil do leite de consumo e dos derivados lácteos e intervir no rendimento (Reis et al., 2013).

Duas classes de bactérias foram identificadas nesse estudo, em proporções praticamente equivalentes Bacilli (53%) e Gammaproteobacteria (47%). Hantsis-Zacharov e Halpern (2007) ao analisarem a diversidade de psicotróficas em leite, encontraram sete classes, sendo a Gammaproteobacteria e a Bacilli as dominantes. A diversidade relativamente superior

encontrada pelos autores supracitados é esperada, uma vez que os mesmos estudaram a diversidade de bactérias psicrotróficas totais, enquanto este trabalho foi mais restritivo, propondo-se a identificar apenas os psicrotróficos com características deteriorantes.

As relações evolutivas entre os isolados identificados baseadas em alinhamentos das sequências parciais do gene 16S rRNA estão representadas na Figura 1. Essa análise envolveu 26 sequências de aminoácidos e todas as posições ambíguas foram removidas para o emparelhamento de cada par, totalizando 1213 posições no conjunto de dados final. A árvore filogenética representa graficamente as relações evolutivas entre as espécies que, de acordo com a similaridade entre as sequências inseridas, possam descender de um ancestral comum. Evidencia-se, logo na primeira ramificação, a formação de dois grandes grupos, um abrangendo apenas membros das Gammaproteobactérias e outro apenas da classe Bacilli. Em seguida, as Gammaproteobactérias dão origem a dois ramos onde estão agrupadas as Aeromonaceae e Enterobacteriaceae. No ramo da classe Bacilli, a nível de gênero, verifica-se uma maior similaridade entre cepas de *Exiguobacterium* sp., como também entre cepas de *Staphylococcus*, com valores iguais a 100.

Os 30 isolados foram identificados em 13 espécies, agrupadas em dez gêneros, sete famílias e duas classes. Aeromonaceae foi a família mais frequente (40%), seguida da Bacillaceae e Staphylococcaceae (Tabela 2). Detalhes sobre a ação enzimática em relação à espécie podem ser observados na Figura 2.

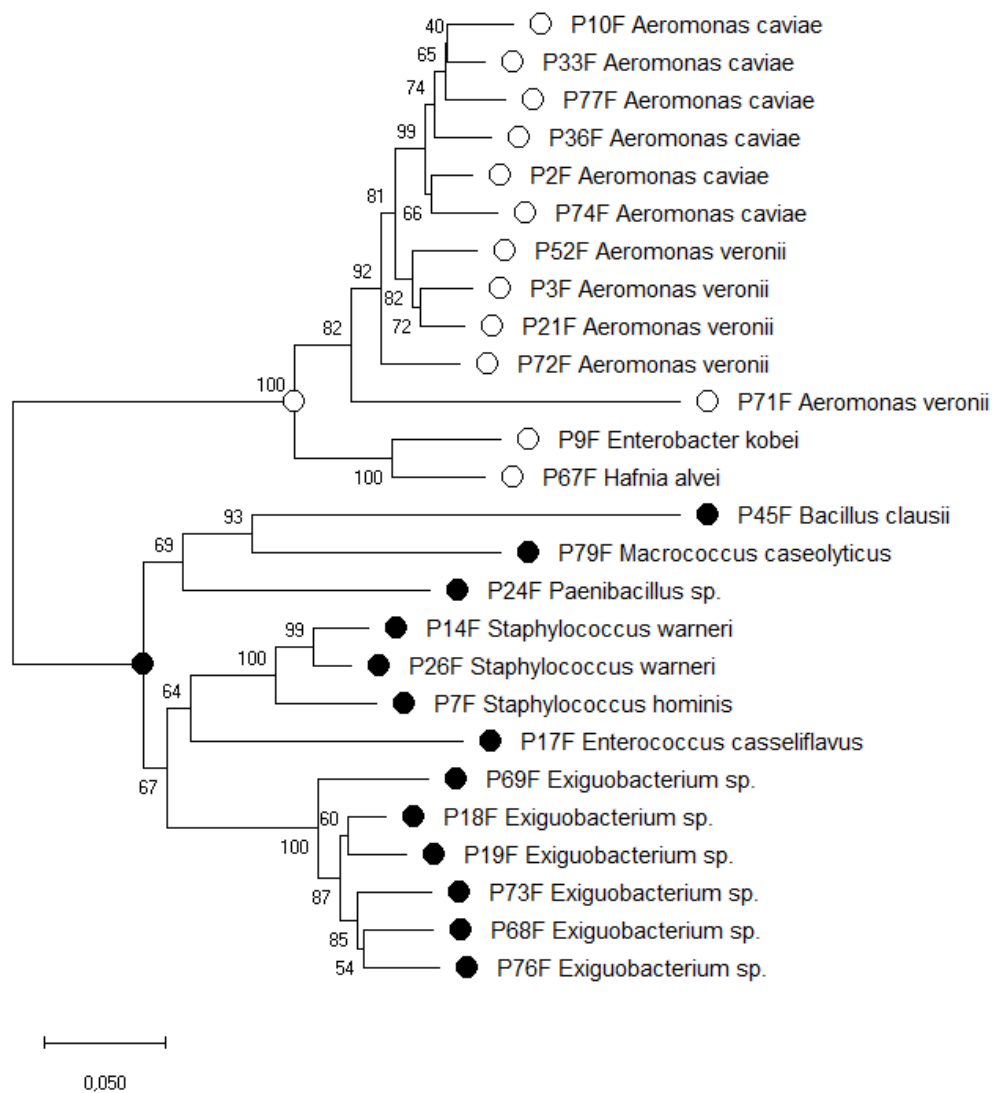


Figura 1. Taxa de relações evolucionárias entre bactérias psicrotróficas com potencial deteriorante isoladas de leite cru refrigerado produzido no agreste de Pernambuco, Brasil.

Marcador “○”: classe Gammaproteobacteria; Marcador “●”: classe Bacilli; O comprimento dos ramos representa, em escala, as distâncias evolutivas; O número ao lado das ramificações representa a porcentagem de árvores replicadas em que as mesmas sequências foram agrupadas juntas em 50000 repetições no teste de bootstrap.

Tabela 2. Frequência de bactérias isoladas de leite cru refrigerado de 12 propriedades do Agreste de Pernambuco, Brasil.

Família	Identificação NCBI	Frequência		Municípios
		Fa	Fr (%)	
Aeromonaceae	<i>Aeromonas caviae</i> (G-)	7	23,4	Bre, Ang, AgBe
	<i>Aeromonas veronii</i> (G-)	5	16,6	Ga, Bre, BCon, Abe
Bacillaceae	<i>Bacillus clausii</i> (G+)	1	3,3	BCon
	<i>Exiguobacterium</i> sp. (G+)	6	20	Bre, AgBe
Enterobacteriaceae	<i>Enterobacter kobei</i> (G-)	1	3,3	Ang
	<i>Hafnia alvei</i> (G-)	1	3,3	BCon
Enterococcaceae	<i>Enterococcus casseliflavus</i> (G+)	1	3,3	Bre
Paenibacillaceae	<i>Paenibacillus</i> sp. (G-)	1	3,3	Gar
	<i>Macrococcus caseolyticus</i> (G+)	1	3,3	AgBe
Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus aureus</i> (G+)	1	3,3	Ang
	<i>Staphylococcus hominis</i> (G+)	1	3,3	Bre
	<i>Staphylococcus warneri</i> (G+)	3	10	Gar, Bre
Streptococcaceae	<i>Lactococcus garvieae</i> (G+)	1	3,3	BCon

NCBI: National Center for Biotechnology Information; G+: Gram-positiva; G-: Gram-negativa; Fa: Frequência absoluta; Fr (%): Frequência relativa; Br: Brejão; Ang: Angelim; ABE: Águas Belas; Gar: Garanhuns; BCon: Bom Conselho.

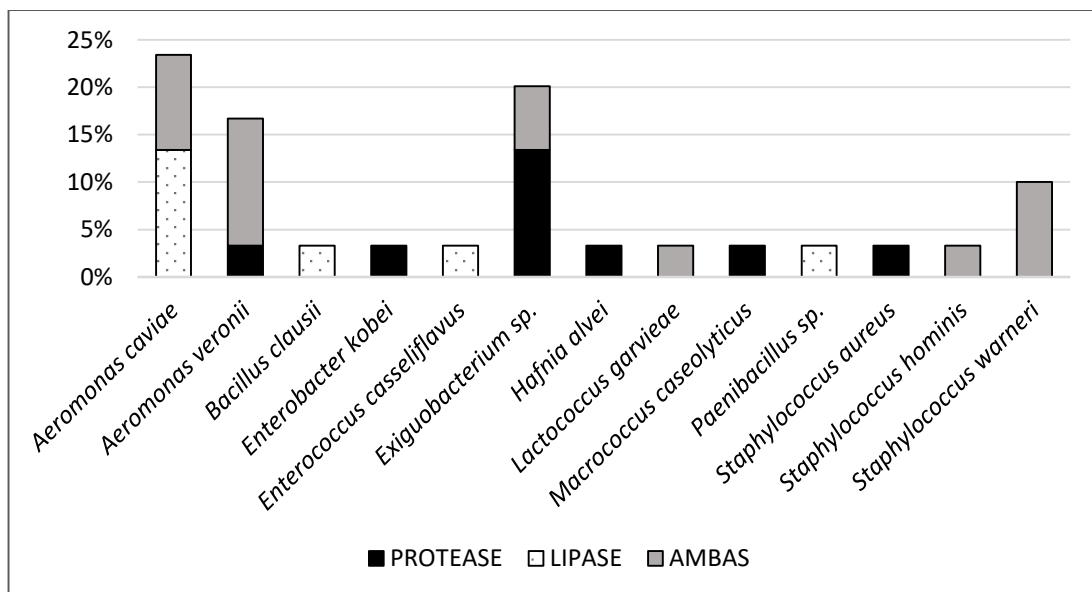


Figura 2. Atividade proteolítica e/ou lipolítica de bactérias psicrófilas isoladas de leite cru refrigerado produzido no Agreste de Pernambuco, Brasil.

Os gêneros Gram-positivos identificados foram *Exiguobacterium*, *Staphylococcus*, *Macrococcus*, *Bacillus*, *Lactococcus* e *Enterococcus*; e os Gram-negativos foram *Aeromonas*, *Hafnia*, *Enterobacter* e *Paenibacillus*. Apesar da diversidade de gêneros Gram-positivos ter sido superior, o número de isolados Gram-negativos e Gram-positivos com potencial deteriorante foi equivalente, com 50% para cada. Ribeiro Júnior et al. (2018) identificaram leve predominância das Gram-positivas (58,2%) entre as bactérias psicrotróficas deteriorantes isoladas de tanques de refrigeração a granel no Rio Grande do Sul. Os mesmos autores relataram que tais micro-organismos estão frequentemente relacionados à microbiota inicial e desejável do leite, bem como ao ambiente dos estábulos e comedouros, e infecções da glândula mamária. As fontes mais comuns de Gram-negativas são água residual em máquinas de ordenha, dutos ou refrigeradores, sujeira dos úberes e tetos, limpeza inadequada das superfícies dos equipamentos que entram em contato com o leite, transporte e estocagem do leite e biofilme (Samarzija et al., 2012).

As espécies *Aeromonas caviae* (7), *Exiguobacterium* sp. (6), *A. veronii* (5) e *Staphylococcus warnerii* predominaram entre as psicrotróficas deteriorantes nas amostras de leite cru analisadas, abrangendo 77% dos isolados. *Aeromonas* foi o gênero frequente, compreendendo 40% (12/30) dos isolados, e também o mais distribuído entre as propriedades, estando presente em 42% (5/12). Essas bactérias estão amplamente distribuídas no ambiente, podendo facilmente contaminar tetas e úbere de vacas em lactação, bem como utensílios utilizados na ordenha. A água também pode constituir uma importante fonte de contaminação do leite durante sua produção. Muitas vezes, a água utilizada nas propriedades rurais para lavagem dos equipamentos, mãos dos ordenadores e úberes é obtida de poços e rios, não recebendo o devido controle quanto a cloração ou potabilidade.

Cereser et al. (2013a) pesquisando potenciais fontes de contaminação por *Aeromonas* spp. na produção de queijos, encontraram em 60% das amostras de água utilizada na produção

de queijo artesanal, confirmando sua capacidade de multiplicação em sistemas de distribuição de água. *Aeromonas* são consideradas eficientes formadoras de biofilme em sistemas de distribuição de água ou locais de processamento de alimento (Tavares et al., 2015), fato que pode colaborar com a manutenção da fonte de contaminação.

Enfatiza-se a prevalência *Aeromonas* entre os isolados como fator de risco à saúde pública mediante consumo do leite ou de produtos dele derivados não tratados termicamente. *Aeromonas* spp. é considerada um patógeno emergente oportunista, especialmente patogênico em pacientes pediátricos, geriátricos e portadores de doenças imunossupressoras (Tavares et al., 2015). *A. caviae* e *A. veronii*, as duas espécies identificadas nessa pesquisa, são responsáveis, junto com *A. hydrophyla*, por 85% das desordens gastrintestinais em humanos, provocando diarreia aquosa comum entre viajantes (“diarreia dos viajantes”) (Stratev et al., 2012). Além disso, espécies isoladas de leite, produtos lácteos e pontos da linha de processamento têm sido descritas como multirresistentes a antimicrobianos, ampliando sua relevância enquanto patógeno oportunista (Luna et al., 2013; Cereser et al., 2013b).

O segundo gênero predominante foi o *Exiguobacterium* sp. (20%), um contaminante de origem ambiental. Espécies dessa bactéria já foram isoladas de fontes bastante diversificadas, incluindo gelo glacial da Groenlândia, fontes termais no Parque Nacional de Yellowstone (EUA), a rizosfera de vegetais e ambiente de plantas de estabelecimentos processadores de alimentos (Vishnivetskaya et al., 2009). Essa bactéria é capaz de manter o metabolismo normal sob refrigeração (4°C), é produtora de biofilme, além de sobreviver a situações inóspitas, exibindo resistência alcalina e ao frio (-12°C), termotolerância (55°C) e osmotolerância. Por essas características, o *Exiguobacterium* sp. se destaca entre os demais micro-organismos deteriorantes, sendo sua presença na cadeia produtiva do leite preocupante do ponto de vista industrial.

Dos isolados de *Exiguobacterium* encontrados no presente estudo, 33% exibiram atividade lipolítica, e 100%, atividade proteolítica. Apesar de amplamente reconhecido na literatura como micro-organismo produtor de enzimas (proteases, alfa-amilase, nuclease) de interesse na biotecnologia, indústria e agricultura (Vishnivetskaya et al., 2009; Rajaei et al., 2014; Anbu et al., 2013; Gumilar et al., 2015; Fang et al., 2016), a produção de lipase por *Exiguobacterium* só foi reportada recentemente por Ali et al. (2015) em amostra de solo contaminado com gordura. *Exiguobacterium* sp. já foi detectado em leite em outros estudos (Hantsis-Zacharov e Halpern, 2007; Quigley et al., 2013; Estrada-Anzuetto et al., 2017) apresentando atividade proteolítica mas não lipolítica (Mane e Gandhi, 2010), e, até o momento, não foram encontrados outros relatos de *Exiguobacterium* sp. lipolíticos isolados a partir de produtos lácteos.

Staphylococcus spp. foram encontrados em 25% (3/12) das amostras e identificados nas espécies *S. aureus*, *S. hominis* e *S. warneri*, sendo a última predominante. Em relação ao potencial deteriorante, 80% dos isolados apresentaram ação lipolítica e proteolítica, com exceção de apenas uma cepa de *S. aureus*, positivo apenas para produção protease. Bactérias desse gênero são frequentes em leite e produtos lácteos (Nornberg et al., 2010; Silva et al., 2011; Ribeiro Júnior et al., 2018), e importantes formadores de biofilme (Cherif-Antar et al., 2016). No caso do leite cru, a ocorrência pode ter relação com casos de mastite clínica e subclínica nos rebanhos (Langoni et al., 2015), ou, além da via intramamária, *Staphylococcus aureus* podem ser transferidos ao leite por meio de equipamento, ambiente ou manipulação humana (Quigley et al., 2013).

Staphylococcus aureus é um patógeno reconhecido por produção de enterotoxinas termoestáveis, que podem permanecer viáveis após a pasteurização e causar agravo à saúde do consumidor. Associado a isso, cepas de *Staphylococcus* multirresistentes a antibióticos (Rai e Tiwari, 2016), inclusive *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) já foram isoladas de leite e

produtos lácteos (Al-Ashmawy e Sallam, 2016). Já tendo sido comprovada a transferência entre MRSA de animais para humanos e vice-versa, torna esse grupo relevante para a saúde animal e humana.

Alguns gêneros foram menos representativos abrangendo em conjunto apenas 23% (7/30) dos isolados. Foram os seguintes: *Macrocooccus*, *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Enterococcus* e *Lactococcus*. *Macrocooccus caseolyticus*, previamente classificado como *Staphylococcus caseolyticus*, é uma bactéria ambiental, pouco relacionada com doenças em humanos ou em animais (Li et al., 2016). No entanto, essa bactéria já foi isolada de mastite bovina (Mazhar et al. 2018), podendo ser essa a justificativa de sua presença nas amostras analisadas

A presença de enterobactérias em alimento geralmente indica contaminação direta ou indireta por fezes. Duas espécies de enterobacteriáceas foram detectadas nessa pesquisa, *Hafnia alvei* e *Enterobacter kobei*, ambos demonstrando apenas atividade proteolítica. *Hafnia* e *Enterobacter* foram descritos como gêneros coliformes psicrotolerantes em leite cru por Masielo et al. (2016). *Hafnia alvei* tem sido descrita como produtora de biofilme e patogêna oportunista para humanos, causando em infecções intestinais e extraintestinais (Song et al., 2017).

Bacillus e *Paenibacillus* foram detectados nessa pesquisa apresentando potencial apenas para deterioração de lipídios. O gênero *Paenibacillus* surgiu recentemente de uma divisão do gênero *Bacillus*. Ambos os micro-organismos são psicrotróficos termodúricos, formam esporos e têm como habitat natural o solo e plantas em crescimento (Lyngwi e Joshi, 2014), podendo a presença dessas bactérias no leite cru estar associada à contaminação dos tetos e utensílios por terra e à deficiência na higienização manejo pré-ordenha. Um estudo recente demonstrou que 38% dos *Bacillus* isolados de leite cru mantiveram de 50 a 75% de atividade residual da lipase após tratamento térmico a 142°C por quatro segundos (Machado et al., 2017). A característica

termodúrica desses micro-organismos aumenta a relevância desse resultado, já que indica sobrevivência dos mesmos à pasteurização, podendo iniciar ou aumentar a ação lipolítica após o processamento térmico.

Enterococcus casseliflavus e *Lactococcus garviae* também foram identificados. Apesar de seu efeito negativo como potencial deteriorante ter sido detectado nesse trabalho, é citado que essas bactérias possuem um papel controverso. De maneira geral, integram o grupo de bactérias ácido-láticas (LAB, do inglês '*Lactic Acid Bacteria*') da microbiota do leite, grupo cuja ação é tipicamente benéfica, atuando na maturação de queijos e no desenvolvimento de sabores desejáveis (Kable et al, 2016), além de produzirem bacteriocinas (Quingley et al., 2013). No entanto, *Lactococcus garviae*, bem conhecido na aquicultura por causar septicemia hemorrágica em peixes, e, nos últimos anos, vem emergindo como patógeno zoonótico, com relatos de infecção humana principalmente de endocardite em pacientes idosos e imunocomprometidos e associada à ingestão de pescado cru (Gibello et al., 2016).

O leite cru refrigerado produzido no Agreste de Pernambuco é, em sua maior parte, de qualidade satisfatória quanto à concentração de bactérias psicrotróficas. A microbiota psicrotrófica contaminante com potencial deteriorante é composta proporcionalmente por bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, em que *Aeromonas*, *Exiguobacterium* e *Staphylococcus* são predominantes. A identificação de psicrotróficas termorresistentes e de potenciais patógenos nas amostras podem implicar maior risco à qualidade dos produtos após processamento e à saúde pública. Estes resultados permitem inferir possíveis falhas na produção e estocagem do leite cru e adequar os procedimentos higiênico-sanitários e de controle, a fim de evitar alta concentração de bactérias psicrotróficas com consequente produção de enzimas deteriorantes e perda econômicas.

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsa de estudos e à Plataforma de Sequenciamento do LABCEN/ UFPE e ao Centro de Laboratórios de Garanhuns UAG/UFRPE pelo uso de suas instalações.

Referências

1. Al-Ashmawy MA, Sallam KI (2016). Prevalence, detection of marker and virulence genes of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolated from milk and dairy products and their antimicrobial susceptibility. *Zag Vet J*, 42(1).
2. Ali CH, Zhang, J, Mbadinga SM, Liu J, Yang S, Gu J, Mu B. (2015). Screening, isolation and optimization of an extracellular lipase producing *Exiguobacterium* sp. BBXS-7 segregated from waste cooking oil contaminated sites. *Kärntner Botanikzentrum*. 22:183-201.
3. Anbu P, Annadurai G, Hur BK (2013). Production of alkaline protease from a newly isolated *Exiguobacterium profundum* BK-P23 evaluated using the response surface methodology. *Biologia*, 68(2), 186-193.
4. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.51 de 18 de setembro de 2002. Regulamento Técnico de Produção Identidade e Qualidade de Leite Tipo A, Tipo B, Tipo C e Cru refrigerado. *Diário Oficial da União, Brasília*, 29 set. 2002.
5. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.62 de 26 de agosto de 2003. Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água – Procedimentos para contagens de colônias (Anexo IV). *Diário Oficial da União, Brasília*, 18 set. 2003.
6. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa n. 62 de 29 de dezembro de 2011. Coleta de leite cru refrigerado e seu transporte a granel. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília*, 30 dez. 2011.
7. Cereser ND, Júnior OR, Martineli TM, Souza V, Rodrigues, LB, Kerkoff J (2013a). *Aeromonas* in processing line of Minas frescal and Colonial cheeses. *Ars Vet.*, 29(1):23-29.
8. Cereser ND, Júnior OR, Martineli TM, Souza V, Rodrigues LB, Kerkoff J (2013b). Resistance profile of *Aeromonas* spp. isolated in dairy products industry. *Ars Veterinaria*, 29(1):30-36.
9. Cherif-Antar A, Moussa-boudjemâa B, Didouh N, Medjahdi K, Mayo B, Flórez AB. (2016). Diversity and biofilm-forming capability of bacteria recovered from stainless steel pipes of a milk-processing dairy plant. *Dairy Sci Techn*, 96(1):27-38.

10. Cousin, MA, Jay, JM, Vasavada, PC. Psychrotrophic microorganisms (1992). In: Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 3 ed. Washington: American Public Health Association – APHA, Cap. 9, p. 153-168.
11. Estrada-Anzuetto M, Martinez B, Stratton J, Bianchini A. Identification of spoilage bacteria present in laboratory heat-treated and commercially pasteurized milk: a case study involving milk production chain in Nebraska. *Research & Reviews: J Food Dairy Technol*, 5(2):22-29.
12. Fang S, Chang J, Lee Y, Hwang E, Bok Heo J, Choi Y (2016). Immobilization of α -amylase from *Exiguobacterium* sp. DAU5 on Chitosan and Chitosan-carbon Bead: Its Properties. *Appl Biol Chem*, 59:75-81.
13. Felske A, Rheims H, Wolterink A, Stackebrandt E, Akkermans AD. (1997). Ribosome analysis reveals prominent activity of an uncultured member of the class Actinobacteria in grassland soils. *Microbiology*, 143(9):2983-2989.
14. Gibello A, Galán-Sánchez F, Blanco MM, Rodríguez-Iglesias M, Domínguez L, Fernández-Garayzábal JF (2016). The zoonotic potential of *Lactococcus garvieae*: An overview on microbiology, epidemiology, virulence factors and relationship with its presence in foods. *Res Vet Sci*, 109:59-70.
15. Gumilar J, Triatmojo S, Yusiati LM, Pertiwinigrum A (2015). Isolation, identification and dehairing activity of Indonesian native keratinolytic bacteria *Exiguobacterium* sp. DG1. *Pak J Biotechnol*, 12(1):41- 48.
16. Hantsis-Zacharov E, Halpern M. (2007). Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Appl Environ Microbiol*, 73(22):7162-7168.
17. Kable ME, Srisengfa Y, Laird M, Zaragoza J, McLeod J, Heidenreich J, Marco ML (2016). The core and seasonal microbiota of raw bovine milk in tanker trucks and the impact of transfer to a milk processing facility. *MBio*, 7(4):1-13.
18. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35:1547-1549.
19. Langoni H, Guimarães FF, Costa EOD, Joaquim SF, Menozzi BD (2015). Celularidade do leite e unidades formadoras de colônias nas mastites causadas por *Staphylococcus coagulase positiva* e *coagulase negativa*. *Pesq. Vet. Bras*, 35(6):518-524.
20. Li G, Du X, Zhou D, Li C, Huang L, Zheng Q, Cheng Z. (2018) Emergence of pathogenic and multiple-antibiotic-resistant *Macrococcus caseolyticus* in commercial broiler chickens. *Transbound Emerg Dis*.
21. Luna RO, Bezerra SS, Carvalho, JN, Pereira FC, Barretto, ACG, Galvão SMR, Mendes ES (2013). Identificação molecular e perfil de resistência a antimicrobianos de *Aeromonas* spp. isoladas de queijo de coalho tipo A. *Braz J Vet Med* 35(3):205-211.

22. Lyngwi NA, Joshi SR (2014). Economically important *Bacillus* and related genera: a mini review. *Biology of Useful Plants and Microbes*, 3:33-43.
23. Machado SG, Baglinière F, Marchand S, Van Coillie E, Vanetti MC, De Block J, Heyndrickx M. (2017). The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products. *Front Microbiol*, 8:302.
24. Mane NV, Gandhi MB (2010). Studies on proteolytic thermotolerant psychrotrophic bacteria in milk and fermented milk products. *J Environ Res Develop*, 5(2):384-392.
25. Marques SC, Evangelista SR, Piccoli RH (2012). Diversidade e resistência a antibióticos de bactérias psicrófilas isoladas de tanques coletivos de resfriamento de leite. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 71(4):670-676.
26. Mazhar S, Hill C, McAuliffe O. (2018). The Genus *Macroccoccus*: An Insight Into Its Biology, Evolution, and Relationship With *Staphylococcus*. *Adv Appl Microbiol*.
27. Molineri AI, Signorini ML, Cuatrín AL, Canavesio VR, Neder VE, Russi NB, Bonazza JC, Calvino LF (2012). Association between milking practices and psychrotrophic bacterial counts in bulk tank milk. *Rev Argent Microbiol*, 44:187-194.
28. Quigley L, O'sullivan O, Stanton C, Beresford TP, Ross RP, Fitzgerald GF, Cotter PD (2013). The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol Rev* 37(5):664-698.
29. Rai A, Tiwari HK (2016). Prevalence and antimicrobial resistance of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in cow milk from Gangtok, East Sikkim. *Online Int Interdiscip Res J*, 6(2):91-102.
30. Rajaei S, Heidari R, Shahbani Zahiri H, Sharifzadeh S, Torktaz I, Akbari Noghabi K (2014). A novel cold-adapted pullulanase from *Exiguobacterium* sp. SH 3: Production optimization, purification, and characterization. *Starch-Stärke*, 66(3-4):225-234.
31. Reis KTMG; Santana EHW, Roig SM (2013). Qualidade Microbiológica do Leite Cru e Pasteurizado Produzido no Brasil: Revisão. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina*. 2013. 15(2):411-21.
32. Ribeiro Júnior, JC, Oliveira, AM, Silva, FDG, Tamanini, R, Oliveira, ALM, Beloti, V. (2018). The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. *J Dairy Sci*, 101(1):75-83.
33. Samarzija D, Zamberlin S, Pogacic T (2012). Psychrotrophic bacteria and milk quality, *Mljekarstvo*, 62(2):77-95.
34. Silva LCC, Beloti V, Tamanini R, d'Ovidio L, Mattos MR, Arruda AMCT, Pires, EMF (2011). Rastreamento de fontes da contaminação microbiológica do leite cru durante a ordenha em propriedades leiteiras do Agreste Pernambucano. *Semina: Ciên Agrár*, 32(1).

35. Song HS, Kim JY, Kim YB, Jeong MS, Kang J, Rhee JK, Kwon J, Kim JS, Choi J, Choi H, Nam YD, Roh SW (2017). Complete genome sequence of a commensal bacterium, *Hafnia alvei* CBA7124, isolated from human feces. *Gut pathogens*, 9(1):41.
36. Stratev D, Vashin I, Rusev V. (2012). Prevalence and survival of *Aeromonas* spp. in foods—a review. *Revue Méd. Vét*, 163(10):486-494.
37. Tavares AB, Cereser ND, Timm CD (2015). Occurrence of *Aeromonas* spp. in foods of animal origin and its importance in public health. *Arq. Inst. Biol.*, 82:1-8.
38. Vishnivetskaya TA, Kathariou S, Tiedje JM (2009). The *Exiguobacterium* genus: biodiversity and biogeography. *Extremophiles*, 13(3):541-555.
39. Zuckerkandl E, Pauling L. (1965). Evolutionary divergence and convergence in proteins. *In: Bryson V, Vogel HJ. Evolving Genes and Proteins*, Academic Press, New York, 97-166.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A diversidade das bactérias psicrotróficas com potencial deteriorante aponta para algumas possíveis falhas nas práticas de produção do leite, principalmente quanto à potabilidade da água utilizada nas fazendas, a presença de mastite subclínica no rebanho e contaminação ambiental do leite. Essas informações podem auxiliar na adequação dos equívocos durante o processamento do alimento.

Sob a perspectiva da saúde pública, a detecção de bactérias patogênicas oportunistas, entre elas *Listeria* com potencial patogênico e multirresistentes a antimicrobianos, constitui um risco quando o consumo do leite ou de derivados é feito sem tratamento térmico prévio, principalmente por pessoas imunocomprometidas.

Do ponto de vista tecnológico, a presença de bactérias psicrotróficas deteriorantes termodúricas e produtoras de biofilmes acrescenta à deterioração pós tratamento térmico a dificuldade de eliminação desses micro-organismos do ambiente de produção ou mesmo do produto industrializado. Estudos sobre a importância dos micro-organismos psicrotróficos, principalmente em relação a perdas econômicas são amplos, porém, no Brasil, parece ser uma questão ainda negligenciada. A ausência de parâmetros legais para bactérias psicrotróficas no leite cru refrigerado dificulta seu controle na matéria-prima recebida na indústria. A determinação desses requisitos poderia contribuir para o aumento do controle desses micro-organismos, com redução de prejuízos para a indústria e de risco para o consumidor.

A presença de sistemas de refrigeração nas fazendas sem os devidos cuidados higiênicos na obtenção e armazenamento do leite não garante qualidade ou segurança aos produtos lácteos derivados. Para isso, programas de educação sanitária e de assistência aos produtores devem ser contínuos e fortalecidos, sobretudo com o pequeno produtor. Além disso, o incentivo a pesquisas científicas, em especial na Região Nordeste do Brasil, onde ainda são escassas, são importantes ferramentas de monitoramento e controle regular das populações psicrotróficas e presença de patógenos no leite e produtos.

8. ANEXOS

8.1. Instruções aos autores para submissão ao periódico **Ciência Rural**

- **CIÊNCIA RURAL** - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.
- Os **artigos científicos, revisões e notas** devem ser encaminhados via eletrônica e editados **preferencialmente em idioma Inglês**. Os encaminhados em Português poderão ser traduzidos após a 1º rodada de avaliação para que ainda sejam revisados pelos consultores ad hoc e editor associado em rodada subsequente. Entretanto, caso **não traduzidos** nesta etapa e se **aprovados** para publicação, terão que ser **obrigatoriamente traduzidos para o Inglês** por empresas credenciadas pela Ciência Rural e obrigatoriamente terão que apresentar o certificado de tradução pelas mesmas para seguir tramitação na CR.
- **Empresas credenciadas:**
 - American Journal Experts (<http://www.journalexperts.com/>)
 - Bioedit Scientific Editing (<http://www.bioedit.co.uk/>)
 - BioMed Proofreading (<http://www.biomedproofreading.com>)
 - Edanz (<http://www.edanzediting.com>)
 - Editage (<http://www.editage.com.br/>) 10% discount for CR clients. Please inform Crural10 code.
 - Enago (<http://www.enago.com.br/forjournal/>) Please inform CIRURAL for special rates.
 - GlobalEdico (<http://www.globaledico.com/>)
 - JournalPrep (<http://www.journalprep.com>)
 - Liberty Medical Communications (<http://libertymedcom.com/>)
 - Paulo Boschcov (paulo@bridgetextos.com.br, bridge.textecn@gmail.com)
 - Proof-Reading-Service.com (<http://www.proof-reading-service.com/pt/>)
 - Readytopub (<https://www.readytopub.com/home>)
- O trabalho após tradução e o respectivo certificado devem ser enviados para: rudiweiblen@gmail.com
- **As despesas de tradução serão por conta dos autores.** Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. O máximo de páginas será **15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras.** Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que não poderão ultrapassar as margens e **nem estar com apresentação paisagem.**

- **Tendo em vista o formato de publicação eletrônica estaremos considerando manuscritos com páginas adicionais** além dos limites acima. No entanto, os trabalhos aprovados que possuem páginas além do estipulado terão um custo adicional para a publicação (vide taxa).
- **O artigo científico** (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão; Referências e Declaração de conflito de interesses. Agradecimento(s) e Apresentação; Contribuição dos autores; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).
- **A revisão bibliográfica** (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; Referências e Declaração de conflito de interesses. Agradecimento(s) e Apresentação; Contribuição dos autores; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).
- **A nota** (Modelo .doc, .pdf) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências e Declaração de conflito de interesses. Agradecimento(s) e Apresentação; Contribuição dos autores; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado (Declaração Modelo Humano, Declaração Modelo Animal).
- O preenchimento do campo "**cover letter**" deve apresentar, obrigatoriamente, as seguintes informações em inglês, **exceto** para artigos **submetidos em português** (lembrando que preferencialmente os artigos devem ser submetidos em inglês).
 - a) What is the major scientific accomplishment of your study?
 - b) The question your research answers?
 - c) Your major experimental results and overall findings?
 - d) The most important conclusions that can be drawn from your research?
 - e) Any other details that will encourage the editor to send your manuscript for review?

Para maiores informações acesse o seguinte tutorial.

- Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista www.scielo.br/cr.
 - Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.
 - As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).
 - Nesse [link](#) é disponibilizado o **arquivo de estilo** para uso com o software **EndNote** (o EndNote é um software de gerenciamento de referências, usado para gerenciar bibliografias ao escrever ensaios e artigos). Também é disponibilizado nesse [link](#) o **arquivo de estilo** para uso com o software **Mendeley**.
 - As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.
- Citação de livro:
- JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.
- TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.
- Capítulo de livro com autoria:
- GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.
- Capítulo de livro sem autoria:
- COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: _____. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.
- TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: _____. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.
- Artigo completo:
- O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:
- MEWIS, I.; ULRICH, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum*(Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Available from: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Accessed: Mar. 18, 2002. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Response of *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) and *Oryzaephilus surinamensis* (L.) to different concentrations of diatomaceous earth in bulk stored wheat. **Ciência Rural**, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso>. Accessed: Mar. 18, 2009. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

SENA, D. A. et al. Vigor tests to evaluate the physiological quality of corn seeds cv. 'Sertanejo'. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 47, n. 3, e20150705, 2017. Available from: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782017000300151&lng=pt&nrm=iso>. Accessed: Mar. 18, 2017. Epub 15-Dez-2016. doi: 10.1590/0103-8478cr20150705 (Artigo publicado eletronicamente).

- Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

- Tese, dissertação:

COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

- Boletim:

ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20). (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

- Informação verbal:

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

- Documentos eletrônicos:

MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA,

2006. p.630-636. Online. Available from: <<http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>>. Accessed: Mar. 18, 2005 (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Online. Available from: <<http://www.zh.com.br/especial/index.htm>>. Accessed: Mar. 18, 2001(OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Online. Available from: <<http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>>. Accessed: Mar. 18, 2007.

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC. (OBS.: tentar evitar esse tipo de citação).

- Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.
- Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).
- Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.
- Lista de verificação (Checklist .doc, .pdf).
- Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.
- Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.
- Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editorial.
- Todos os artigos encaminhados devem pagar a taxa de tramitação. Artigos reencaminhados (**com decisão de Reject and Resubmit**) deverão pagar a taxa de tramitação novamente. Artigos arquivados por **decorso de prazo** não terão a taxa de tramitação reembolsada.
- Todos os artigos submetidos passarão por um processo de verificação de plágio usando o programa “Cross Check”.

▪ **Contribuição dos autores**

Para se qualificar para a autoria do manuscrito submetido, todos os autores listados deveriam ter contribuições intelectuais substanciais tanto para a pesquisa quanto para sua preparação. Por favor, use um dos exemplos abaixo ou faça o seu.

▪ **Exemplo um**

RW, RA e RCNO conceberam e projetaram experimentos. WC, LM e AA realizaram os experimentos, BB realizou as análises laboratoriais. BB supervisionou e coordenou os experimentos com animais e forneceu dados clínicos. BB realizou análises estatísticas de dados experimentais. WC, MB e NO prepararam o rascunho do manuscrito. Todos os autores revisaram criticamente o manuscrito e aprovaram a versão final.

▪ **Exemplo dois**

Todos os autores contribuíram igualmente para a concepção e redação do manuscrito. Todos os autores revisaram criticamente o manuscrito e aprovaram a versão final.

▪ **Exemplo três**

Os autores contribuíram igualmente para o manuscrito.

8.2. Instruções aos autores para submissão no *Brazilian Journal of Microbiology*

O Artigo deverá ser submetido como **um único arquivo em WORD**. Este arquivo deve conter texto, figuras, tabelas, etc. Serão aceitas apenas submissões de artigos redigidos em inglês.

Para **artigos originais**, o arquivo em **WORD** deve conter:

- Título
- Autores e Afiliações
- Resumo (200 a 250 palavras)
- 3 a 5 palavras-chave
- Introdução
- Material e Métodos
- Resultados
- Discussões
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Para **artigos de revisão**, o arquivo em **WORD** deve conter:

- Título
- Título resumido
- Resumo (200 palavras)

- 3 a 5 palavras-chave
- Texto
- Agradecimentos (opcional)
- Referências

Os artigos devem ser digitados com espaço duplo, margens de 3 cm e numerados seqüencialmente. As linhas das páginas do artigo devem ser numeradas. Os editores recomendam que antes da submissão o artigo seja lido de forma crítica por alguém fluente em língua inglesa. Os artigos escritos com inglês de baixa qualidade não serão aceitos.

Artigos Originais e Artigos de revisão deverão conter até, no máximo, 20 páginas, incluindo referências, tabelas e figuras.

Abreviaturas e símbolos devem seguir as recomendações da IUPAC-IUB *Commission (Commission on Biochemical Nomenclature, Amendments and Corrections)*. As unidades de medida devem seguir o Sistema Internacional de Unidades.

Os autores podem precisar, ou desejar, fazer uso de serviços de edição de línguas para melhorar a qualidade do inglês e, portanto, a qualidade final do texto. Este tipo de assistência é recomendada antes mesmo da submissão dos artigos ou, no caso de solicitação pelos revisores, antes do artigo ser definitivamente aceito para publicação. Autores que não são nativos de língua inglesa que desejem assistência na escrita em inglês podem considerar as seguintes sugestões:

- American Journal Experts: <http://www.JournalExperts.com?rcode=BSM1>
- Joanne Roberts: jroberts@uol.com.br
- ATO Traduções: www.atotraining.com.br
- Prof. Julian D. Gross, University of Oxford, Oxford Biomedical Editors: julian.gross@pharm.ox.ac.uk
- BioMed Proofreading LLC: <http://www.biomedproofreading.com>

ORGANIZAÇÃO

O **Título** deve ser conciso, não conter abreviações e indicar claramente o tema do artigo.

Expressões como "Effects of", "Influence of", "Study on", etc, devem ser evitadas. Os cuidados na escolha das palavras do título são importantes, pois são usadas em sistemas eletrônicos de busca.

O **Resumo** deve resumir o conteúdo básico do artigo. Ele deve ser representativo do texto. Não deve conter referências, tabelas nem abreviações pouco usuais. São de grande importância, pois serão lidos por muitas pessoas que não têm acesso ao artigo completo.

A **Introdução** deve oferecer informações que possibilitem ao leitor avaliar adequadamente os resultados apresentados no artigo sem que obrigatoriamente tenha que recorrer à literatura corrente. No entanto, a introdução não deve ser uma extensa revisão de literatura. Deve informar claramente as justificativas e os objetivos do artigo.

Os **Materiais e Métodos** devem proporcionar informações suficientes para que outros pesquisadores possam reproduzir o trabalho. A repetição de detalhes de procedimentos que já tenham sido publicados em outros artigos deve ser evitada. Se um método publicado for modificado, tais modificações devem estar claras no artigo. Fontes de reagentes, meios de cultura e equipamentos (empresa, cidade, estado e País) devem ser mencionadas no texto. Nomes que são marcas registradas devem ser claramente indicados. Subtítulos podem deixar este tópico mais fácil de ler e entender.

Os **Resultados** devem, por meio de texto, tabela e/ou figuras dar os resultados dos experimentos. Se o item **Discussão** for incluído, evite interpretações extensas dos resultados, pois isto deverá ser feito na discussão. Se os **Resultados e Discussões** forem redigidos concomitantemente, então os resultados devem ser discutidos no local mais apropriado do texto. Tabelas e figuras devem ser numeradas em algarismos arábicos. Todas as tabelas e figuras devem ser mencionadas no texto.

O local aproximado das tabelas e figuras no texto deve ser indicado.

O item **Discussão** deve discutir os resultados em função da literatura citada.

As **Referências** devem ser redigidas em ordem alfabética e começar pelo último nome do primeiro autor. Todos os autores devem ser citados. As citações no texto devem ser escritas pelo último nome do primeiro autor, seguido pelo ano de publicação. Como exemplo, tem-se: "... while Silva and Pereira (1987) observed that resistance depended on soil density" ou "It was observed that resistance depended on soil density (Silva and Pereira, 1987)." Para a citação de dois ou mais artigos do mesmo autor, liste em ordem cronológica sendo que os anos devem ser separados por vírgula (exemplo: Freire-Maia et al., 1966a, 1966b, 2000; Hene 2010; Padonou et al., 2012). Os nomes dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o *BIOSIS*. Todas as referências incluídas na lista final devem ter sido citadas no texto e todas as referências mencionadas no texto devem aparecer na lista final.

Exemplos:

a. **Artigos de Periódicos**

Brito DVD, Oliveira EJ, Darini ALC, Abdalla VOS, Gontijo-Filho PP (2006) Outbreaks associated to bloodstream infections with *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus* spp in premature neonates in a university hospital from Brazil. *Braz J Microbiol*37:101-107.

b. **Artigos ou Capítulos de Livro**

Franco BDGM, Landgraf M, Destro MT, Gelli DS, (2003) Foodborne diseases in Southern South America. *In: Miliotis, M.D., Bier, J.W.(eds). International Handbook of Foodborne Pathogens. Marcel Dekker, New York, USA, 733-743.*

c. **Livros**

Montville TJ, Matthews KR (2005) *Food Microbiology - an introduction. ASM Press, Washington, D.C.*

d. **Patentes**

Hussong RV, Marth EH, Vakaleris DG. January 1964. Manufacture of cottage cheese. U.S. Pat. 3, 117, 870.

e. **Teses e Dissertações**

Santos MVB (2005) O papel dos anticorpos contra os componentes da parede celular de *Paracoccidioides brasiliensis* na evolução da doença experimental. São Paulo, Brasil, 110p. (M.Sc. Dissertation. Instituto de Ciências Biomédicas. USP).

f. **Comunicações em Eventos (Simpósios, Conferências, etc)**

Silveira TS, Martins JL, Abreu FA, Rosado AS, Lins UGC (2005) Ecology of magnetotactic multicellular organisms in microcosms. XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Santos, SP, p. 272.

g. **Publicações na Web**

Abdullah MAF, Valaitis AP, Dean DH (2006) Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11 Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochemistry*. <http://www.biomedcentral.com/1471-2091/7/16>

h. **Webpage**

U.S. Food and Drug Administration. 2006. Enjoying Homemade Ice Cream without the Risk of *Salmonella* Infection. Available at: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fs-eggs5.html>. Accessed 26 May 2006.

As citações do tipo "personal communication" ou "unpublished data" devem ser evitadas, embora se reconheçam que, eventualmente, elas possam ser usadas. Nestes casos, elas devem

ser citadas no texto e não na lista final de referências. As referências que consistem de artigos que foram "aceitos para publicação" ou "no prelo" são aceitáveis. No entanto, as referências dos artigos que são "submetidos" ou "em preparação" não são aceitas.

AGRADECIMENTOS: Esta seção é opcional. Ela reconhece a assistência financeira e pessoal recebida para execução do trabalho.

TABELAS: devem ser inseridas no texto de acordo com que são citadas e numeradas seqüencialmente por algarismos arábicos. O título deve ser colocado acima da tabela e deve ser curto, porém representativo, com descrição completa da informação contida na tabela. Cabeçalhos e rodapés devem ser concisos, com colunas e linhas cuidadosamente centralizadas. Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

FIGURAS: devem ser inseridas no texto de acordo com que são citadas e numeradas seqüencialmente por algarismos arábicos. Os dados que foram apresentados em tabelas não devem ser repetidos na forma de figuras. As legendas devem ser colocadas abaixo das figuras. Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

FOTOGRAFIAS: Devem ter qualidade suficiente para garantir boa reprodução. Por favor, abra o link abaixo para ver os requisitos necessários para se obter a resolução adequada. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/about/image_quality_table.html)

Conflitos de Interesses

É política do periódico *Brazilian Journal of Microbiology* que qualquer pessoa envolvida no processo de publicação (autores, revisores, membros do corpo editorial e assistentes) deve estar isenta de conflitos de interesses que possam influenciar negativamente o parecer, a objetividade e a lealdade a seus autores. O BJM reconhece que qualquer conflito de interesse detectado deve ser prontamente comunicado e rapidamente resolvido. Conflitos de interesses em publicações podem ser definidos como condições nas quais um indivíduo possui conflito ou competição de interesses que podem resultar em decisões editoriais tendenciosas. Os conflitos de interesses podem ser potenciais, percebidos ou factuais. Considerações pessoais, políticas, financeiras, acadêmicas ou religiosas podem afetar a objetividade de diferentes formas.

Direitos autorais

Os autores dos manuscritos aprovados deverão encaminhar para *BJM* (Fax: 55 11-3037-7095; bjm@sbmicrobiologia.org.br), previamente à publicação, a declaração de transferência de direitos autorais, assinada por todos os co-autores (ver formulário abaixo) ou por pelo menos um dos autores que concorda em informar os outros autores.

Transferência de "Direitos Autorais"

"O(s) autor(es) abaixo assinado(s) afirmam que o artigo é original, que não infringe os direitos autorais ou qualquer outro direito de propriedade de terceiros, que não foi enviado para publicação em nenhuma outra revista e que não foi publicado anteriormente. O(s) autor(es) confirma(m) que a versão final do manuscrito foi revisada e aprovada por ele(s). Todos os manuscritos publicados tornam-se propriedade permanente do *Brazilian Journal of Microbiology* e não podem ser publicados sem o consentimento por escrito de seus Editores."

Artigo nº. _____

Título do Artigo:

" _____ "

Nome(s) do(s) Autor(es) _____ Assinatura(s)

Data: ____/_____/_____