



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
UNIDADE ACADÊMICA DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E SAÚDE ANIMAL

IARA NUNES DE SIQUEIRA

**Caracterização de microrganismos isolados de unidades de beneficiamento de leite de
cabra**

PATOS/PB

2022

IARA NUNES DE SIQUEIRA

**Caracterização de microrganismos isolados de unidades de beneficiamento de leite de
cabra**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal, da Universidade Federal de Campina Grande, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciência e Saúde Animal.

Orientadora

Prof^ª.: Dr^ª. Marcia Almeida de Melo

Coorientador

Prof^ª.: Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho

Patos/PB
2022

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado Bibliotecas – SISTEMOTECA/UFCG**

S586c

Siqueira, Iara Nunes de

Caracterização de microrganismos isolados de unidades de beneficiamento de leite de cabra. / Iara Nunes de Siqueira. – Patos, 2022.
98 f.

Orientador: Márcia Almeida de Melo.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Curso de Doutorado em Ciência e Saúde Animal.

1. Laticínios. 2. Leite de Cabra. 3. Higienização. 4. Resistência Antimicrobiana; I. Melo, Márcia Almeida de, *orient.* II. Título.

CDU 636.3(043.1)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
POS-GRADUACAO EM CIENCIA E SAUDE ANIMAL
Rua Aprígio Veloso, 882, - Bairro Universitário, Campina Grande/PB, CEP 58429-900

FOLHA DE ASSINATURA PARA TESES E DISSERTAÇÕES

IARA NUNES DE SIQUEIRA

CARACTERIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE UNIDADES DE BENEFICIAMENTO DE LEITE DE CABRA E DERIVADOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Saúde Animal como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência e Saúde Animal.

Aprovada em: 25/08/2022

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Marcia Almeida de Melo (Orientadora - PPGCSA/UFPG)

Profa. Dra. Carolina de Sousa Américo Batista Santos (Examinadora Interna - PPGCSA/UFPG)

Profa. Dra. Nara Geanne de Araújo Medeiros (Examinadora Externa - UFPG)

Profa. Dra. Suely Cristina Pereira de Lima Oliveira (Examinadora Externa - IFPB)

Prof. Dr. José Givanildo da Silva (Examinador Externo- UFBA)



Documento assinado eletronicamente por **MARCIA ALMEIDA DE MELO, PROFESSOR(A) DO MAGISTERIO SUPERIOR**, em 25/08/2022, às 19:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018.



Documento assinado eletronicamente por **SUELY CRISTINA PEREIRA DE LIMA OLIVEIRA, Usuário Externo**, em 25/08/2022, às 19:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018.



Documento assinado eletronicamente por **José Givanildo da Silva, Usuário Externo**, em 25/08/2022, às 19:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018.



Documento assinado eletronicamente por **CAROLINA DE SOUSA AMERICO BATISTA SANTOS, PROFESSOR**, em 26/08/2022, às 11:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018.



Documento assinado eletronicamente por **NARA GEANNE DE ARAUJO MEDEIROS, PROFESSOR 3 GRAU**, em 29/08/2022, às 14:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufcg.edu.br/autenticidade>, informando o código verificador **2550411** e o código CRC **886F5AF2**.

A Inaldo Júnior (*in memoriam*)

Ao meu filho, Pedro Augusto, minha inspiração.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Gratidão a todas as pessoas que me mantiveram de PÉ nessa caminhada.

Ao ser supremo, meu PAI e Minha Mãe Santíssima que esteve comigo em todos os momentos, de solidão, de dores, de medo. A eles que me levantaram inúmeras vezes do chão quando eu não tinha mais forças para lutar, a vocês toda honra, toda glória e todo meu louvor.

Ao meu filho, PEDRO AUGUSTO, MEU AMOR MAIOR.

À minha FAMÍLIA, que presenciou minha luta por essa conquista e em especial a minha Mãe que lutou bravamente para que eu conseguisse subir mais esse degrau.

À minha amiga TIDA, que foi meu suporte nos dias de ausência e pela amizade incondicional e verdadeira. Obrigada por tudo. Eternamente grata a você.

À minha amiga que a UFCG me deu, DÉBORA LUISE. Foram tantos momentos compartilhados, fofocas (kkkkkkkkkkkkkkk), boas risadas, muitas mensagens de carinho de companheirismo de suporte emocional em dias difíceis. Te adoro.

À companheira de luta no laboratório, ALINE ANTAS, com quem dividi muito das minhas batalhas de pesquisa e acabamos formando uma bela AMIZADE. Meu muito obrigada por tudo. Adoro você.

À minha orientadora professora MARCIA, pelos ensinamentos.

Ao meu coorientador PROFESSOR ABRAHÃO pelos ensinamentos e em especial pela sua atenção durante todas as vezes que precisei. Sou grata professor por não ter soltado minha mão na hora que mais precisei.

A tantos amigos que a UFCG me deu, como CLÉCIO, NATANAEL, FRANCYIDE, VITÓRIA, LIDIO, JOYCE, HOSANEIDE SAMUEL, JOÃO, FILIPE, CLAÚDIA, DOMINGOS que me ajudaram em algum momento nesta caminhada.

A MILENA, pelas conversas, pela força e companheirismo que compartilhamos durante esses anos.

Aos professores SÉRGIO, GIVANILDO, FERNANDO NOGUEIRA, ROSÁLIA, NARA, SUELY e CAROLINA pela atenção.

À família CORRINHA e seu GERALDO que me acolheram com carinho na sua casa. Meu muito obrigada pela atenção, pelos almoços, cafés.

As unidades de beneficiamento de leite de cabra do Cariri paraibano fonte de inspiração para que esse trabalho se concretizasse.

A GRAÇA, a professora do leite com quem dividi muitos ensinamentos e me ajudou a AMAR o leite.

A todos os professores da UFCG pelos ensinamentos compartilhados.

Aos laboratórios da Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária (laboratório de leite, carne, microbiologia e de biologia molecular) e ao laboratório da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, locais onde desenvolvi o experimento, fiz algumas amizades e cresci. Meu muito obrigada a todos os representantes.

Aos Secretários da Pós, ADALBERTO e ADALGIZA, pela paciência.

Aos motoristas com quem dividi minhas viagens em busca de conhecimentos nos laticínios de leite de cabra.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Saúde Animal.

À CAPES, pela concessão da bolsa.

Porque se uniu a mim, eu o livrarei e o protegerei.

Salmo 90

SUMÁRIO

RESUMO	10
ABSTRACT	13
INTRODUÇÃO	19
REFERÊNCIAS	21
CAPÍTULO I	24
Bactérias formadores de biofilmes nas indústrias de laticínios-Uma breve revisão	24
Resumo	26
Abstract	26
1 Introdução	27
2 Desenvolvimento	29
2.1 Estratégias de busca e elegibilidade dos estudos	29
2.2 Critérios de seleção	30
2.3 Resultados	30
2.4 Discussão	39
3 Conclusão	42
Referências	43
CAPÍTULO II	52
Avaliação da qualidade higiênica sanitária das usinas de leite de cabra do Cariri paraibano ..	52
ABSTRACT	53
RESUMO	54
Introdução	55
Material e Métodos	55
Análises microbiológicas	56
Pesquisa de Mesófilos	56
Enumeração de coliformes totais e termotolerantes	56
<i>Escherichia coli</i>	57
Contagem de estafilococos coagulase positiva	57
<i>Salmonella spp.</i>	57
<i>Listeria monocytogenes</i>	57
Análise MALDI TOF MS	57
Resultados e discussão	57

CONCLUSÃO	64
Referências	66
CAPÍTULO III	71
Pesquisa de integrons em <i>Klebsiella</i> spp e <i>Escherichia coli</i> isolados nas unidades de beneficiamento de leite caprine	71
Resumo	72
Abstract	74
Introdução	75
Material e Métodos	76
Obtenção das amostras	76
Isolamento bacteriano	78
Determinação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos	78
β-lactamases de espectro ampliado (ESBL)	78
Amplificação por PCR de genes de integrase e cassetes de genes	79
Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP)	80
Resultados	80
Isolados bacterianos e suscetibilidade aos antimicrobianos	80
Deteção dos integrons e caracterização dos genes cassetes por PCR	82
Deteção de ESBL.....	82
Discussão	85
Conclusão	88
Agradecimentos	88
Conflito de Interesses	88
Referências	88
Resumo gráfico.....	95
CONCLUSÃO GERAL	95

RESUMO

Desde a produção primária até a sua distribuição, vários são os fatores que podem levar a contaminação do leite caprino. Dessa forma, o objetivo dessa tese foi avaliar a qualidade do leite de cabra em unidades beneficiadoras de leite, bem como verificar o perfil de resistência a antimicrobianos e a identificação de genes de virulência em isolados bacterianos. O Capítulo I corresponde à uma revisão sistemática de literatura com o objetivo de fazer um levantamento dos principais microrganismos envolvidos na formação de biofilmes na indústria de laticínios através da busca em três bases eletrônicas de dados: ScienceDirect, PubMed e Web of Science. Os estudos relataram a obtenção de 756 isolados bacterianos de equipamentos, do leite e seus derivados, sendo 69,31% provenientes dos equipamentos e 30,69% do leite e seus derivados. As espécies de bactérias isoladas foram: *Bacillus* spp. (38,75%), *Staphylococcus* spp. (21,56%), *Listeria* spp. (12,30%), *Pseudomonas* spp. (7,80%), *Streptococcus* spp. (4,36%), *Enterococcus* spp. (2,11%), *Acinetobacter* spp. (1,71%) e 11,41% pertenciam a gêneros diversos. No Capítulo II, objetivou-se avaliar a qualidade higiênica sanitária dos equipamentos e do leite *in natura* e pasteurizado provenientes de usinas de beneficiamento de leite caprino no Estado da Paraíba, Brasil. Entre os microrganismos patogênicos isolados, houve uma maior frequência dos pertencentes à família *Enterobacteriales* (77,38%), entre eles *Escherichia coli* (26,19%), *Klebsiella* spp. (22,61%) e *Enterobacter* spp. (17,85%). As bactérias Gram positivas corresponderam a 22,62% dos isolados, com destaque para *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. e *Macroccoccus caseolyticus*. Em relação ao leite *in natura*, houve altas contagens para mesófilos, coliformes totais e termotolerantes e o leite pasteurizado estava fora dos padrões microbiológicos para mesófilos, coliformes totais e termotolerantes. No Capítulo III, foi verificada a resistência antimicrobiana e a presença de genes de integrons e de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL). Foram utilizadas 13 amostras de *Klebsiella* spp e 14 de *E. coli* isoladas de leite. *Klebsiella* spp foi encontrada no tanque de recepção, tanque de pasteurização, embalagem, mão do manipulador, leite *in natura* e leite pasteurizado. Das 27 cepas avaliadas 51,8% (14/27) foram resistentes a, pelo menos, três ou mais classes de antimicrobianos. Entre os isolados de *Klebsiella* spp. 38,4% (5/13) apresentaram resistência a três ou mais antimicrobianos, sendo que 92,3% (12/13) dos isolados foram resistentes à cefalotina. Os antimicrobianos que foram mais eficazes contra *Klebsiella* spp. foram cloranfenicol e gentamicina ambos com 7,69% (1/13) de resistência. Com relação à *E. coli*, 64,2% (9/14) das amostras avaliadas apresentaram resistência a, pelo menos, três ou mais classes de antimicrobianos. *E. coli* apresentou uma maior resistência a tetraciclina e a cefalotina com 64,2% (9/14) para cada antimicrobiano. Verifica-se que o antimicrobiano mais eficaz contra os isolados foi o cloranfenicol com apenas 1 (uma) amostra resistente (7,69%) de *Klebsiella* spp e nenhuma amostra resistente de *E. coli*. Não houve amplificação dos genes *IntI1*, *IntI2* e *IntI3*, entretanto, a região cassete dos integrons foi amplificada em 11,1% dos isolados (3/27), sendo 15,3% (2/13) de *E. coli* e 7,14% (1/14) de *K. pneumoniae*. Com relação aos fenótipos de ESBL observou-se que 37,0% (10/27) das amostras apresentaram fenótipo de ESBL sendo *E. coli* com 42,8% (6/14) e *Klebsiella* spp com 30,7% (4/13). Conclui-se que houve contaminação do leite de cabra, antes e após o seu beneficiamento, em usinas beneficiadoras de leite cabra no Estado da Paraíba, com o envolvimento de patógenos previamente descritos na literatura como causadores de Doenças

Veiculadas pelos Alimentos (DVAs), com capacidade de formar biofilmes e resistir à ação de antimicrobianos.

Palavras chaves: Laticínios, leite de cabra; higienização; biofilmes; resistência antimicrobiana; ESBL; integrons.

ABSTRACT

There are several factors that can lead to contamination of goat milk from primary production to its distribution. Thus, the objective of this thesis was to evaluate the quality of goat milk in the processing plants, before and after processing, as well as to verify the antibiotic resistance profile and the identification of virulence genes in bacterial isolates. Chapter I corresponds to a systematic literature review with the objective of surveying the main microorganisms involved in the formation of biofilms in the dairy industry through searches in three electronic databases: ScienceDirect, PubMed and Web of Science. The studies reported obtaining 756 bacterial isolates from equipment, milk and its derivatives, 69.31% from equipment and 30.69% from milk and its derivatives. The species of bacteria isolated were: *Bacillus* spp. (38.75%), *Staphylococcus* spp. (21.56%), *Listeria* spp. (12.30%), *Pseudomonas* spp. (7.80%), *Streptococcus* spp. (4.36%), *Enterococcus* spp. (2.11%), *Acinetobacter* spp. (1.71%) and 11.41% belonged to different genera. In Chapter II, the objective was to evaluate the hygienic and sanitary quality of equipment and fresh and pasteurized milk from goat milk processing plants in the State of Paraíba, Brazil. Among the isolated pathogenic microorganisms, there was a higher frequency of those belonging to the Enterobacteriaceae family (77.38%), including *Escherichia coli* (26.19%), *Klebsiella* spp. (22.61%) and *Enterobacter* spp. (17.85%). Gram positive bacteria accounted for 22.62% of the isolates, especially *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. and *Micrococcus caseolyticus*. There were high counts for mesophiles, total and thermotolerant coliforms in the fresh milk and pasteurized milk was also outside the microbiological standards for mesophiles, total and thermotolerant coliforms. In Chapter III, antimicrobial resistance and the presence of integrons and extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) genes were evaluated. Thirteen samples of *Klebsiella* spp and fourteen of *E. coli* isolated from milk were used. *Klebsiella* spp was found in the reception tank, pasteurization tank, packaging, handler's hand, in raw milk and pasteurized milk. Of the 27 strains evaluated, 51.8% (14/27) were resistant to at least three or more classes of antimicrobials. Among the isolates of *Klebsiella* spp. 38.4% (5/13) showed resistance to three or more antimicrobials, and 92.3% (12/13) of the isolates were resistant to cephalothin. The antimicrobials that were most effective against *Klebsiella* spp. were chloramphenicol and gentamicin both with 7.69% (1/13) of resistance. With regard to *E. coli*, 64.2% (9/14) of the evaluated samples showed resistance to at least three or more classes of antimicrobials. *E. coli* showed greater resistance to tetracycline and cephalothin with 64.2% (9/14) for each antimicrobial. It appears that the most effective antimicrobial against the isolates was chloramphenicol with only 1 (one) resistant sample (7.69%) of *Klebsiella* spp. and no resistant sample of *E. coli*. There was no amplification of the *IntI1*, *IntI2* and *IntI3* genes, however, the cassette region of the integrons was amplified in 11.1% of the isolates (3/27), 15.3% (2/13) of *E. coli* and 7, 14% (1/14) of *K. pneumoniae*. With regard to the ESBL phenotypes, it was observed that 37.0% of the samples presented ESBL phenotype 42,85% (6/14) of *E. coli* and 30,76% (4/13) of *Klebsiella* spp. It is concluded that there is contamination of goat milk, before and after its processing, in goat milk processing plants in the State of Paraíba, caused by pathogens previously described in the literature as causing Foodborne Diseases (VADs), with the ability to form biofilms and resist the action of antibiotics.

KEY WORDS: Dairy products; goats milk; sanitation; biofilms; antimicrobial resistance; ESBL; integrons.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 01 – Principais gêneros bacterianos formadores de biofilme isolados em equipamentos e materiais utilizados na indústria de laticínios.....	33
Tabela 02 - Principais gêneros bacterianos formadores de biofilme isolados a partir de leite e seus derivados	37
Tabela 03- Frequência geral dos principais gêneros bacterianos formadores de biofilmes isolados a partir de equipamentos/materiais e no leite e seus derivados	39

CAPÍTULO II

Tabela 1- Microrganismos identificados por MALDI-TOF MS e sua ocorrência nas amostras de produtos lácteos	58
Tabela 2 – Enumeração de coliformes totais, termotolerantes e de mesófilos nos equipamentos, no leite de cabra <i>in natura</i> e pasteurizado do Cariri paraibano, durante o período de janeiro a fevereiro de 2019	61
Tabela 3- Espécies bacterianas identificadas pelo MALDI TOF em equipamentos, no leite de cabra <i>in natura</i> e pasteurizado em usina do Cariri paraibano durante o período de janeiro a fevereiro de 2019	62

CAPÍTULO III

Tabela 1- Perfil de resistência antimicrobiana de <i>Klebsiella</i> spp. e <i>Escherichia coli</i> isoladas de unidades de beneficiamento de leite de cabra do Cariri paraibano.....	81
Tabela 2. Perfil de resistência antimicrobiana, presença de integrons e de ESBL em <i>Klebsiella</i> spp e <i>E. coli</i> isoladas de unidades de beneficiamento de leite de cabra do estado da Paraíba, durante o período de janeiro a fevereiro de 2019	83

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Fluxograma de seleção de estudos para inclusão na revisão sistemática.....	32
--	----

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO III

Quadro 1. Gene, sequência dos primers e tamanho do amplicon em pares de base (pb)..... 79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABRC:	<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente à carbapenêmicos
APHA:	Associação Americana de Saúde Pública
BHI:	Infusão de cérebro coração
CCS:	Contagem de Células Somáticas
CDC:	Controle de prevenção de doenças
CIP:	Cleaning in place
CLSI:	Clinical and Laboratory Standard Institute
DTA:	Doenças transmitidas por alimentos
EMB:	Eosina azul de metileno
ERC:	<i>Enterobacteriaceae</i> resistente à carbapenêmicos
ESBL:	Beta lactamase de espectro estendido
FDA:	Food and Drug Administration
NMP:	Número mais provável
OMS:	Organização Mundial de Saúde
OPAS:	Organização Pan-Americana de Saúde
PAB:	Programa alimentar Brasil
PARC:	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistente à carbapenêmicos
PCA:	Contagem padrão em placas
PCR:	Reação em Cadeia de Polimerase
RT-PCR:	Reação em Cadeia de Polimerase-Tempo real
RFLP:	Polimorfismo no comprimento de fragmento de restrição
RNA:	Ácido ribonucléico
UFC:	Unidades formadoras de colônias

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
\geq	Maior ou igual
mL	Mililitro
μ L	Microlitro
nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
g	Gramas
h	Horas
®	Marca registrada

INTRODUÇÃO

A caprinocultura leiteira vem se tornando uma alternativa de aumento de renda para os pequenos produtores, principalmente nas regiões Nordeste e Sudeste, os dois maiores produtores nacionais (NETO *et al.* 2021). A região Nordeste segue liderando esses rebanhos, sendo responsável por 95,0% do total de caprinos. (IBGE, 2021).

De acordo com o IBGE (2017), último censo realizado a região Nordeste produziu mais de 17 milhões de litros/ano e aparece com a maior produção nacional de leite caprino, com destaque para o Estado da Paraíba que produziu 5.627.000 mil litros de leite (IBGE, 2017) assim segue crescendo, com a maioria do leite sendo usado *in natura* ou em produtos processados, como queijos ou iogurte (MILLER; LU, 2019; SEPE; ARGUELLO, 2019).

No Brasil o leite de cabra está regulamentado pela Instrução Normativa nº 37 de outubro de 2000, onde contém padrões de identidade e qualidade como sanidade do rebanho, higiene na produção, controle da produção e beneficiamento. Muitos fatores podem influenciar a qualidade do leite como manejo, sanidade e higienização no beneficiamento. Além da contaminação primária durante a criação do animal existem pontos críticos durante a cadeia de produção de produtos lácteos, como processamento, transporte e armazenamento dos produtos finais (WESCHENFELDER *et al.*, 2016; AGRIMONTI *et al.*, 2017) que podem comprometer a qualidade final do produto.

Microrganismos patogênicos podem contaminar o leite caprino e assim o mesmo se tornar uma fonte potencial de Doenças Veiculadas por Alimentos (DVAs). Na literatura é possível encontrar diversos trabalhos com pesquisa de microrganismos no leite caprino como *Staphylococcus* spp (SIQUEIRA *et al.*, 2021), bolores e leveduras (PADUA *et al.*, 2019), bactérias Gram negativos como *Klebsiella* spp, *Escherichia coli*, *Enterobacter* (SIQUEIRA *et al.* 2021), além das Gram positivos *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp. e *Micrococcus* spp. (SIQUEIRA *et al.*, 2021) e muitos desses agentes têm potencial para a formação de biofilmes (LIRA *et al.*, 2016; ALONSO; KABUKI, 2019; WANG *et al.* 2019; NOVOA *et al.*, 2018), e podem ser veiculadores de microrganismos resistentes aos antimicrobianos (SIQUEIRA *et al.*, 2022).

Múltiplos são os mecanismos que as bactérias usam a seu favor para livrar-se da ação do antimicrobiano, isso deve-se às mutações novas e mecanismos de resistência adquiridos, que expandem o espectro de atuação; conjugação, que é a formação de uma ponte que conectará duas bactérias, nas quais os genes de resistência são transferidos de uma bactéria para outra; pressão seletiva exercida pelas condições do meio; multiplicação e propagação de

cepas multirresistentes. Simultaneamente, as indústrias encontram-se sem alternativas em inserir no mercado novos fármacos para combater a resistência bacteriana (NOGUEIRA, *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2020; SILVA, 2021).

De acordo com Giacobbe *et al.* (2018), em 2017 a (OMS) publicou uma lista prioritária de bactérias resistentes, onde foram incluídas nas prioridades críticas, bactérias como *Acinetobacter baumannii* Resistente à Carbapenêmicos (ABRC), *Pseudomonas Aeruginosa* resistente à Carbapenêmicos (PARC), *Enterobacterales* resistente à Carbapenêmicos e às cefalosporinas de 3ª geração (família que inclui *E. coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Protheus* spp.) (ERC).

A classificação considerada como críticos pela OMS, listagem que contém ERC, PARC e ABRC, as *Enterobacterales* (família de *Enterobacterales*, como exemplares como *Escherichia*, *Klebsiella*, *Protheus*, *Salmonela*, entre outras) produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), que na última década, demonstrou uma crescente prevalência, induzido por um uso extensivo de carbapenêmicos, e atualmente, devido a esse uso difundido, enfrentamos uma prevalência crescente de *Enterobacterales* multidrogas resistente, inclusive ao Carbapenem (ERC), particularmente entre as espécies do gênero *Klebsiella* (GROSSI *et al.*, 2015).

Essa resistência é transportada por transposons, plasmídeos e genes de integrons que são as principais e tem uma grande prevalência em especial na família *Enterobacterales* (CERGOLE-NOVELLA *et al.*, 2011). Os microrganismos da família das *Enterobacterales* são difundidos facilmente entre humanos com as mãos, transporte, bem como alimentos e água contaminados e tem uma propensão a adquirir material genético por meio de transferência de genes, mediada principalmente por plasmídeos e transposons (PARTRIDGE, 2011; TOLEMAN e WALSH, 2011), além do que apresentam vários fatores de virulência como resistentes aos carbapenêmicos (ALVES; BEHAR, 2013; NORDMANN; POIREL, 2014; SAMPAIO e GALES, 2016), as betalactamases (ALVES; BEHAR, 2013).

Os integrons desempenham um papel importante na aquisição e difusão de genes de resistência a antimicrobianos. Assim como na propagação da multirresistência em bactérias gram-negativas, devido à sua capacidade de capturar os cassetes de genes no ambiente e incorporá-los (DING *et al.*, 2019).

REFERÊNCIAS

- AGRIMONTI, C., BOTARI, B., SARDARO, M. L. S. & MARMIROLI, N. Application of realtime PCR (qPCR) for characterization of microbial populations and type of milk in dairy food products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 59 p.1157- 1226, 2017.
- ALONSO, V. P. P., & KABUKI, D. Y. Formation and dispersal of biofilms in dairy substrates. *International Journal of Dairy Technology*, v.70, p1-7, 2019.
- ALVES, A. P, e BEHAR, P. R. P. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de KPC em um hospital terciário do sul do Brasil. *Rev. AMRIGS*, v.57(3), p.213-218, 2013.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Instrução Normativa nº 37. Regulamento técnico de produção, identidade e qualidade do leite de cabra. *Diário Oficial da União*, Seção 1, p. 23-25, 2000.
- CERGOLE-NOVELLA MC, PIGNATARI AC, CASTANHEIRA M, GUTH B.E Molecular typing of antimicrobial-resistant Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains (STEC) in Brazil. *Res Microbiol*; v.162, p.117–123. 2011.
- DING. J, ZHUOCHANG CHEN. Z, LI. Y, ZHANG. Q, LI X. Detection of integrons in *Escherichia coli* producing plasmid-mediate AmpC, β -lactamases. *Inst. J. Clin. Exp. Med.* v.12, p. 1690-1696, 2019.
- GIACOBBE, D. R, MIKULSKA, M, VISCOLI, C. Recent advances in the pharmacological management of infections due to multidrug-resistant Gram negative bacteria. *Expert review of clinical pharmacology*.v.11, p.1219-1236, 2018.
- GROSSI, P. A.; TEBINI, A.; DALLA, D. GASPERINA. Novel multidrug resistant microorganisms in critically ill: a potential threat. *Minerva anesthesiologica*. v. 81, p. 52-64. 2015.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. [Biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2020_v48_br_informativo.pdf](http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2020_v48_br_informativo.pdf). Acesso em 09/10/2021.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Municipal. 2014. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/pesquisas/pesquisa_resultados.php?id_pesquisa=21. Acesso em: 15 de abril de 2020.
- LIRA, M. C., GIVISIEZ, P. E. N., SOUSA, F. G. C., MAGNANI, M., SOUZA, E. L., SPRICIGO, D. A., & GEBREYES, W. A. Biofilm-forming and antimicrobial resistance traits of staphylococci isolated from goat dairy plants. *The Journal of Infection in Developing Counties*, v 10, p.932-938, 2016.
- MILLER, B. A., & LU, C. D Current status of global dairy goat production: An overview. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*, v.32, p.1219–1232. 2019.

NETO, K. X. C. R.; JÚNIOR, A. P. N.; PAIVA, P. J. F.; SÁTIRO, T. M.; TAVARES, V. B. Leite de cabra: Qualidade X Instrução Normativa nº 37/2000 do MAPA. Revista Extensão em Foco Palotina, n. 22, p. 1-2, 2021.

NOGUEIRA H.S, XAVIER, A. R. E. O. XAVIER, M. A. S. CARVALHO, A. A. MONÇÃO, G. A. BARRETO, N. A. P. Antibacterianos: Principais Classes, Mecanismos de Ação e Resistência. Revista Unimontes Científica, 2016.

NOVOA, M. G. A., MORENO, I. M. M., SOLIS, V. O. A., GONZALEZ, G. J. P., GUERREO, M. P. J., & LOMELI, G. M. Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from food contact surfaces in the dairy industry of Jalisco, Mexico. Journal of Food Quality, p. 8, 2018.

NORDMANN, P, POIREL, L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. Clinical Microbiology and Infection, v. 20, n. 9, p. 821-830, 2014.

PADUA, F. S., COUTO, E. P., NERO, L. A., & FERREIRA, M. A (2019). Qualidade físico-química e microbiológica de leite de cabra produzido no Distrito Federal. Ciência Animal Brasileira, v. 20, p. 1-9, 2019.

PARTRIDGE, S.R. Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol. Rev. v.35, p. 820–855, 2011

SAMPAIO, J. L. M.; GALES, A. C. Antimicrobial resistance in Enterobacteriacear in Brazil: focus n Beta-lactamase and polymyxins Brazilian Journal of Microbiology. v. 47, p. 31-37, 2016.

SEPE, L., & ARGÜELLO, A. Recent advances in dairy goat products. Asian-Australasian Journal of Animal Science, v.32, p. 1306–1320, 2019.

SIQUEIRA, I. N.; CAVALCANTI, A. A. C.; SOUZA, J. G.; MEDEIROS, F. J. P.; TAVEIRA, J. C.; GARCIA, S. F.; SOARES, C. M.; OLIVEIRA, S. C. P. L.; FILHO, A. A. O.; MELO, M. A. Evaluation of Sanitary quality of goat milk in dairy industries from the Cariri region, state of Paraíba. Research, Society and Development, v. 10, n.12, 2021^a.

SIQUEIRA, I. N. LIMEIRA, C. H. CAVALCANTI, A. A. C. SOUZA, J. G. AZEVEDO, S. S. MELO, M. A. FREIRE, D. H. F (2021b). Bactérias Formadoras de Biofilmes na Indústria de Laticínios: uma Breve Revisão. Ensaios e Ciência, v.25, n.4, p.491-500, 2021b.

SILVA C.F. Avaliação de um programa de controle de antimicrobianos em um hospital universitário. Dissertação (Mestrado em Ciências Pneumológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2021.

SOUZA, M. M, BORDIN, J. T, PAVAN, A. C. L, RODRIGUES, R. G. A, SFACIOTTE, R. A. P, VIGNOTO, V. K. C, FERRANTE, M. WOSCIACKI, S. R. Antimicrobial resistance evaluation of bacteria isolated from infections in small animals in the Umuarama region, Paraná. Pesquisa Veterinária Brasileira, v. 40, p. 804-813, 2020.

TOLEMAN, M. A. and WALSH, T.R. Combinatorial events of insertion sequences and ICE in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* v.35, p.912–935, 2011.

WANG, B., TAN, X., DU, R., ZHANG, L., HAN, Y., & ZHOU, Z. Bacterial composition of biofilms formed on dairyprocessing equipment. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, v. 19, p. 1-8, 2019

WESCHENFELDER, S., PAIM, M. P., GERHARDT, C., & WIEST, J. M. Avaliação da rotulagem nutricional e das características físico-químicas e microbiológicas de diferentes marcas de leite pasteurizado e leite UHT. *Boletim de Indústria Animal*, v. 73, p.32-38, 2016

CAPÍTULO I

Bactérias formadores de biofilmes nas indústrias de laticínios-Uma breve revisão

Publicado pela revista Ensaios e Ciência-Qualis B1

Ensaios e Ciência, v.25, n.4, p.491-500, 2021

DOI: <https://doi.org/10.17921/1415-6938.2021v25n4p491-500>

Bactérias Formadoras de Biofilmes na Indústria de Laticínios: Uma Breve Revisão

Biofilm Training Bacterium in the Dairy Industry: A Brief Review

Iara Nunes de Siqueira: Centro de Saúde e Tecnologia Rural – Universidade Federal de Campina Grande (UFCG/CSTR), Programa de Pós-graduação em Ciência e Saúde Animal. PB, Brasil. E-mail: nunesdesiqueiraiara@gmail.com

Clécio Henrique Limeira: Centro de Saúde e Tecnologia Rural – Universidade Federal de Campina Grande (UFCG/CSTR), Programa de Pós-graduação em Ciência e Saúde Animal. PB, Brasil. E-mail: cleciolimeira@hotmail.com

Aline Antas Cordeiro Cavalcanti: Centro de Saúde e Tecnologia Rural – Universidade Federal de Campina Grande (UFCG/CSTR), Programa de Pós-graduação em Ciência e Saúde Animal. PB, Brasil. E-mail: aline.antas@gmail.com

Joyce Galvão de Souza: Centro de Saúde e Tecnologia Rural – Universidade Federal de Campina Grande (UFCG/CSTR), Programa de Pós-graduação em Ciência e Saúde Animal. PB, Brasil. E-mail: joycegalvaosouza@gmail.com

Daneelly Henrique Ferreira Freire: Centro de Saúde e Tecnologia Rural – Universidade Federal de Campina Grande (UFCG/CSTR), Programa de Pós-graduação em Ciência e Saúde Animal. PB, Brasil. E-mail: daneellyvet@yahoo.com.br

Sérgio Santos Azevedo: Centro de Saúde e Tecnologia Rural – Universidade Federal de Campina Grande (UFCG/CSTR), Professor do Programa de Pós-graduação em Ciência e Saúde Animal. PB, Brasil. E-mail: sergio@vps.fmvz.usp.br

Marcia Almeida de Melo: Centro de Saúde e Tecnologia Rural – Universidade Federal de Campina Grande (UFCG/CSTR), Professor do Programa de Pós-graduação em Ciência e Saúde Animal. PB, Brasil. E-mail: marcia.melo@pq.cnpq.br

Resumo

Doenças Veiculadas por Alimentos (DVAs) podem ser causadas por microrganismos formadores de biofilmes que se aderem às superfícies dos equipamentos e, apesar dos procedimentos de higienização não são eficazes na eliminação da contaminação. Esta breve revisão sistemática teve como objetivo identificar os principais microrganismos formadores de biofilmes na indústria de laticínios através de uma pesquisa sistemática de literatura realizada em três bases eletrônicas de dados: ScienceDirect, PubMed e Web of Science, buscando-se estudos primários que contivessem como tema central a frequência ou prevalência dos microrganismos formadores de biofilme na indústria de laticínios. Foram encontrados 756 isolados bacterianos nos equipamentos e no leite e seus derivados, onde os equipamentos representaram 69,31% e o leite e seus derivados 30,69% do total de microrganismos isolados. As frequências de isolamento de bactérias foram: *Bacillus* 38,75%, *Staphylococcus* 21,56%, *Listeria* 12,30%, *Pseudomonas* 7,80%, *Streptococcus* 4,36%, *Enterococcus* 2,11%, e *Acinetobacter* com 1,71%. Além desses microrganismos constatou-se que em torno de 11,41% pertenciam aos mais variados gêneros de microrganismos. Observou-se que a indústria de laticínios apresenta uma grande diversidade de contaminantes formadores de biofilmes multi espécies, tanto nas superfícies dos equipamentos como também no leite e seus derivados, sendo os gêneros *Bacillus* e *Staphylococcus* os que obtiveram o maior número no total, nos equipamentos no leite e derivados. Esses resultados demonstram a necessidade de estratégias de prevenção e conhecimento de novas técnicas e alternativas acerca dos procedimentos de limpeza e higienização que eliminem esses agentes, pois de acordo com os dados apresentados nesta revisão muitos eram patogênicos.

Palavras chaves: bactérias, leite, segurança alimentar

Abstract

Foodborne Diseases can be caused by biofilm-forming microorganisms that adhere to equipment surfaces and, despite hygiene procedures, they are not effective in eliminating contamination. This brief systematic review aimed to identify the main biofilm-forming microorganisms in the dairy industry through a systematic literature search conducted in three electronic databases: ScienceDirect, PubMed and Web of Science, seeking primary studies that contained the central theme is the frequency or prevalence of biofilm-forming microorganisms in the dairy industry. A total of 779 bacterial isolates were found in the equipment, in milk and its derivatives, and the equipment represented 69.57% and milk and its derivatives 30.69% of the total of isolated microorganisms. The frequencies of isolated bacteria were as follows: *Bacillus* 37.61%, *Staphylococcus* 21.05%, *Listeria* 11.93%, *Pseudomonas* 7.57%, *Streptococcus* 4.23%, *Enterococcus* 2.05%, and *Acinetobacter* with 1.66%. In addition to these microorganisms, it was found that about 11.41% belonged to the most varied genera of microorganisms. It was observed that the dairy industry has a great diversity of contaminants forming biofilms multi species, both on the surfaces of equipment and also in milk and its derivatives, with the genera *Bacillus* and *Staphylococcus* being the ones that obtained the highest number in total, both in equipment such as milk and dairy products. These results demonstrate the need for prevention strategies and knowledge of new techniques and alternatives to the cleaning and sanitation procedures that eliminate these agents, because according to the data presented in this review, many were pathogenic.

Keywords: bacterium, milk, food safety.

1 Introdução

De acordo com Balsamo *et al.* (2012), biofilme pode ser definido como uma comunidade microbiana envolta por uma matriz de substância polimérica extracelular (EPS), que tem como função unir as células firmemente à superfície. Esta formação de biofilmes ocorre em virtude da adesão de microrganismos em uma superfície de contato, a qual se fixam, formando uma matriz de EPS e logo em seguida iniciam seu desenvolvimento. Diversos fatores contribuem para o processo de adesão em uma determinada superfície, consideraremos alguns que se destacam: a genética, a virulência e a resistência dos microrganismos, nutrição, a área e o material da superfície (KASNOWSKI *et al.*, 2010), os resíduos proteicos, lipídicos e de carboidratos, são elementos importantes para formar a camada condicionante (WATRICK; KOLTER, 2000). O desenvolvimento de biofilmes pode ser dividido em diferentes estágios: fixação reversível, fixação irreversível, maturação e dispersão (LEWANDOWSKI; BEYENAL, 2014). Na primeira ocorre a ligação inicial das células bacterianas à superfície, esse processo é ainda reversível (KASNOWSKI *et al.*, 2010).

Na segunda etapa, ocorre a interação física da célula com a superfície por meio de EPS produzida pela bactéria, resultando em anexo irreversível mais firmemente aderido (TREMBLAY *et al.*, 2014). A ligação irreversível envolve forças de pequeno alcance entre os apêndices celulares e a superfície, ligações de hidrogênio, ligações covalentes, hidrofóbicas e iônicas (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003). Diversos fatores contribuem para o processo de adesão em uma determinada superfície, consideraremos alguns que se destacam: a genética, a virulência e a resistência dos microrganismos, nutrição, a área e o material da superfície (KASNOWSKI *et al.*, 2010), o cisalhamento (MITTELMAN, 1990; GUILLEMOT *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2008; FLORJANIĆ; KRISTL, 2011), atividade metabólica microbiana, expressão gênica do microrganismo e *quorum sensing* (RICE *et al.*, 2005), que é um fenômeno que possibilita a comunicação entre células bacterianas, moléculas de sinalização extracelulares conhecidas como auto indutores são usadas como interação permitindo que as células atuem de uma forma cooperativa (BOYLE *et al.*, 2015).

A formação de biofilmes é geralmente indesejável para a indústria de alimentos pois representa uma fonte potencial de contaminação microbiana e de enzimas de deterioração que afetam a qualidade dos alimentos (TEH *et al.*, 2014), aumenta a resistência bacteriana e estresse ambientais, (BRIDIER *et al.*, 2015; KOSTAKI *et al.*, 2012).

Nas indústrias de laticínios, os equipamentos de processamentos como sistema de filtragem, que são usados continuamente por longos períodos de operação, têm condições particularmente susceptíveis para a formação de biofilmes (ANAND *et al.*, 2014). Estudos

anteriores indicam que os biofilmes podem ser encontrados em diferentes partes dos equipamentos de processamentos de laticínios, como tanque de armazenamento de leite, silos de leites, exterior de bombas, paredes, tubulações, trocadores de calor e unidade de envase, sendo classificados como peças de alto risco para a formação de biofilmes (MARCHAND *et al.*, 2009).

O controle de biofilmes em fábricas de laticínios geralmente envolve um processo chamado de Cleaning-in-place (CIP) (MARCHAND *et al.*, 2012). Em relação ao controle dos biofilmes em laticínios, o uso adequado de agentes de limpeza é imprescindível. A correta seleção das soluções de limpeza, como detergentes e sanificantes, depende dos fatores como eficácia, segurança e facilidade de remoção após a aplicação, levando-se em consideração o caráter corrosivo de cada um desses agentes, bem como a ocorrência de efeitos sensoriais nos produtos obtidos após sua aplicação (SIMÕES; SIMÕES; VIEIRA, 2010). Caso ocorram falhas no procedimento de higienização, superfícies de aço inoxidável podem se tornar importantes fontes de contaminação microbiana durante o processamento de alimentos (CHMIELEWSKI; FRANK, 2003), e isso pode levar a sérios problemas de saúde pública e a perdas econômicas mediante a contaminação de alimentos e a danificação de equipamentos (BREMER *et al.*, 2006).

Uma das tarefas mais desafiadoras em qualquer linha de processamento da indústria de laticínios é a manutenção de condições sanitárias que é comprometida com a alta disponibilidade de nutrientes e oxigênio que favorece o crescimento microbiano. (CLETO *et al.* 2012). A limpeza consiste na remoção de sujeiras e partículas acumuladas nas superfícies. Essa remoção se dá através de ações químicas e mecânicas, onde são utilizados detergentes específicos, água de boa qualidade, detergentes alcalinos e escovas de diversos tamanhos e formatos, assim como esponjas e raspados (ANDRADE, 2008).

A segunda etapa é a sanitização, onde através de produtos químicos, ocorre a significativa redução de microrganismos. O objetivo é eliminar as bactérias que sobrevivem durante o processo de limpeza e se desenvolvem durante o processamento dos alimentos. Após a sanitização, não é realizado o enxágue, apenas a drenagem (retirar o excesso de solução que pode ter ficado na tubulação). A higienização é especialmente requerida em superfícies úmidas, as quais oferecem condições favoráveis ao crescimento de microrganismos (ANDRADE, 2008).

Para se evitar a formação de biofilmes na indústria de alimentos, é essencial o estabelecimento e a adequação das medidas de higiene e sanitização (ARAÚJO, 2006). Várias técnicas estão sendo utilizadas e novas tecnologias estão sendo testadas para o controle de

biofilmes na indústria de laticínios. Entre essas técnicas podemos citar pesquisa com óleos essenciais para serem utilizados no controle de biofilmes microbianos, pois eles possuem atividade antimicrobiana que despertam grande interesse, e podem ser utilizados como princípios ativos de sanitizantes. Estes são metabólitos secundários de vegetais que atuam na bicamada lipídica da membrana citoplasmática (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Os biossurfactantes são compostos com propriedades tensoativas, produzidos por microrganismos. A sua utilização em superfícies pode reduzir consideravelmente a contaminação microbiana de materiais e inibir ou diminuir a formação de biofilmes. As principais vantagens em relação aos detergentes sintéticos residem em sua baixa toxicidade e natureza altamente biodegradável. Por enquanto, os biossurfactantes ainda não são acessíveis do ponto de vista econômico em comparação aos compostos sintetizados quimicamente que estão disponíveis no mercado (ARAUJO *et al.* 2013).

A utilização de fagos como agentes antimicrobianos pode ser muito vantajosa pela sua alta especificidade, precisão e potência em comparação ao uso de biocidas, possuindo a capacidade de infectar bactérias de forma seletiva. Eles são capazes de destruir a matriz de polissacarídeo dos biofilmes, infectar células e causar uma desestruturação extensa (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014)

Vários são os gêneros e espécies bacterianas capazes de aderir e formar biofilmes em superfícies que entram em contato com leite ou produtos lácteos (OLIVEIRA *et al.* 2013).

Diante disso, o objetivo desse estudo foi fazer uma revisão sistemática para identificar os principais microrganismos envolvidos na formação de biofilmes na indústria de laticínios.

2 Desenvolvimento

2.1 Estratégias de busca e elegibilidade dos estudos

Para realização desta revisão foram observadas as recomendações da metodologia PRISMA - Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses, que descreve as principais etapas a serem seguidas no desenvolvimento de uma revisão sistemática de literatura (MOHER *et al.*, 2009). Assim, realizou-se uma pesquisa sistemática em três bases eletrônicas de dados: ScienceDirect, PubMed e Web of Science, buscando-se estudos primários que contivessem como tema central a frequência ou prevalência de bactérias formadoras de biofilme na indústria de laticínios. Para isso, foram utilizados os seguintes termos de busca, em inglês: “biofilm and (“milk industr* or dairy industr*)”, sendo o * (asterisco) utilizado para incluir tanto a palavra industry quanto industries. As citações dos

estudos identificados nessa fase foram salvos no formato BibTex e exportadas para um gerenciador bibliográfico, para facilitar o processo de triagem e seleção.

Foram considerados para inclusão na pesquisa artigos completos e *shorts communications* que relatassem o isolamento de bactérias formadoras de biofilmes na indústria de laticínios, sendo excluídos outros tipos de publicação (revisões de literatura, editoriais, livros eletrônicos) e pesquisas que tratavam de outros microrganismos, como fungos, por exemplo. Não houve restrição quanto ao idioma de publicação, porém apenas estudos publicados nos últimos dez anos foram incluídos.

2.2 Critérios de seleção

Dois revisores avaliaram independentemente os estudos primários encontrados na pesquisa dos bancos de dados. Inicialmente, já no ambiente do gerenciador bibliográfico, estudos duplicados foram excluídos, e os revisores iniciaram o processo de seleção pelos títulos dos trabalhos. Os estudos foram baixados, avaliados pelos títulos e resumos e por fim foi realizada uma leitura na íntegra, selecionando aqueles que se enquadravam nos critérios de elegibilidade e removendo os demais.

2.3 Resultados

A pesquisa nas três bases de dados retornou um total de 784 trabalhos. Após a remoção das duplicatas, triagem de títulos, resumos e a avaliação do texto, restaram 28 estudos que foram sintetizados nesta revisão. Todo o processo de busca, triagem e seleção está demonstrado pelo fluxograma (Figura 1).

De acordo com a tabela 01 e 02, foram obtidos 756 isolados bacterianos provenientes dos equipamentos, do leite e seus derivados, onde os equipamentos representaram 69,31% e 30,69% do leite e seus derivados. As espécies de bactérias isoladas foram: *Bacillus* spp. (38,75%), *Staphylococcus* spp. (21,56%), *Listeria* spp. (12,30%), *Pseudomonas* spp. (7,80%), *Streptococcus* spp. (4,36%), *Enterococcus* spp. (2,11%), *Acinetobacter* spp. (1,71%) e 11,41% pertenciam a gêneros diversos. (Tabela 03).

De acordo com a tabela 01, vinte (20) estudos realizaram a pesquisa de microrganismos formadores de biofilmes nos diversos materiais e equipamentos da indústria de laticínios, totalizando 524 bactérias. Desse total os gêneros mais citados foram: *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Listeria* spp e *Pseudomonas*. Isso representa 80,41% de todos os microrganismos isolados dos equipamentos, além desses observou-se mais de 24 tipos de gêneros diferentes.

Com relação à metodologia utilizada para avaliar a formação de biofilmes nos equipamentos, a Técnica de Contagem em Placas foi a que apresentou um maior número seguido pela microtitulação e pela Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).

Na tabela 02 concentram-se os dados referentes às bactérias isoladas formadoras de biofilmes do leite e seus derivados. Foram realizados 12 estudos, desse total encontraram-se 232 microrganismos. Os gêneros que apresentaram um maior número foram *Bacillus* spp, *Staphylococcus* spp e *Streptococcus* spp. Esses três gêneros representaram um total de 88,36% dos isolados no leite e nos seus derivados, sendo 11,642% referente aos mais de 23 gêneros diferentes. Observou-se que o leite do tanque *in natura* foi o mais avaliado, seguindo pelo leite pasteurizado e leite em pó.

A metodologia mais utilizada no leite e seus derivados foi a microtitulação em placas seguida pela PCR e Técnica de Contagem em Placas que apresentaram os mesmos valores.

Figura 1. Fluxograma de seleção de estudos para inclusão na revisão sistemática.

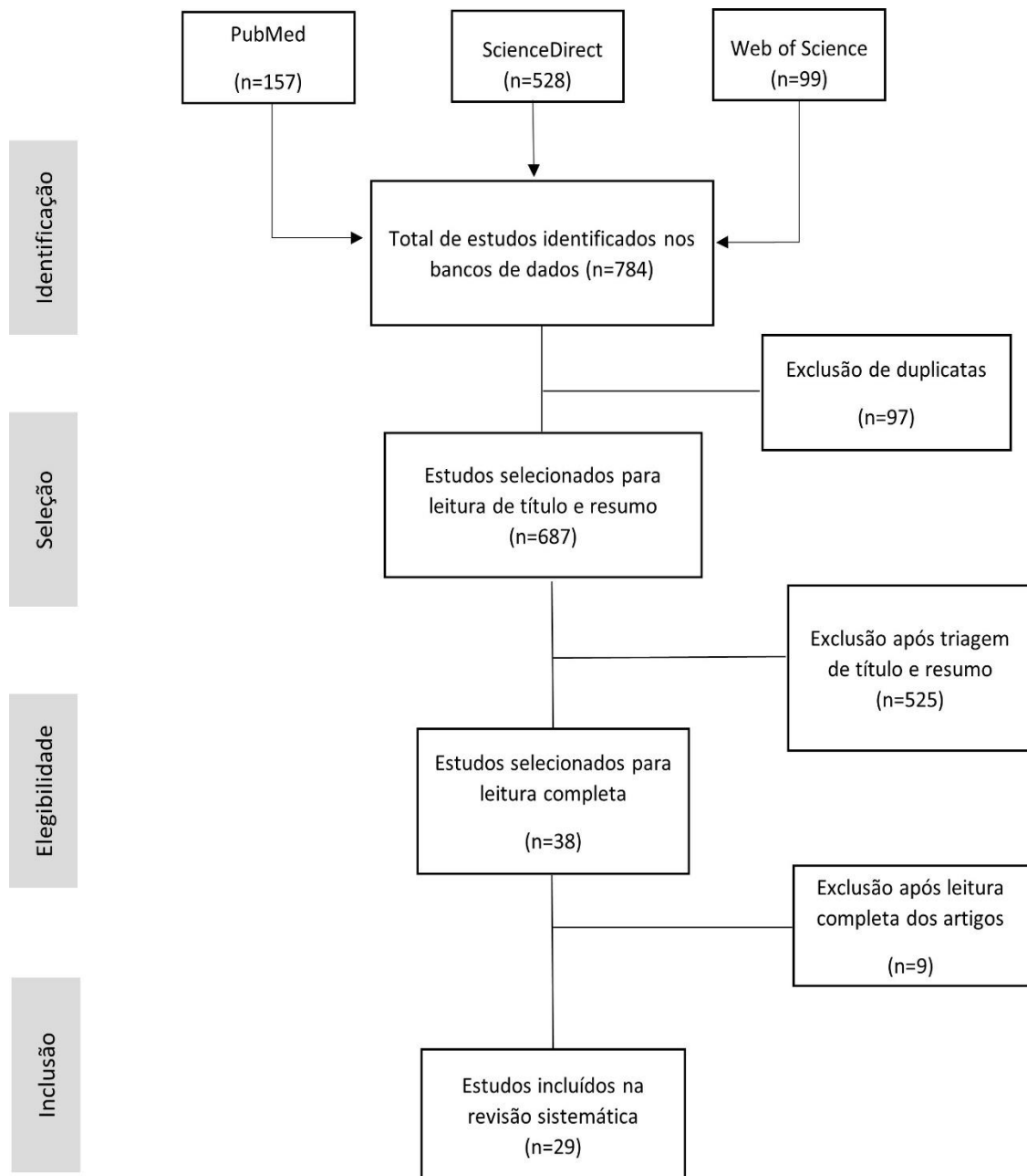


Tabela 01 – Principais gêneros bacterianos formadores de biofilme isolados em equipamentos e materiais utilizados na indústria de laticínios.

Equipamento/material de formação do biofilme	Nº de isolados bacterianos	Grupo de bactérias isoladas	Referências	País de realização do estudo
Tubulação de leite cru, entrada do pasteurizador, saída do pasteurizador	40	<i>Pseudomonas</i>	Pagedar & Singh (2014)	Índia
Superfície interna do tanque transportador de leite	4	<i>Staphylococcus, Streptococcus, Pseudomonas, Serratia</i>	Teh et al. (2013)	Nova Zelândia
Planta de processamento de soro de leite e de uma fábrica de laticínios	2	<i>Klebsiella</i>	Tang et al. (2010)	Nova Zelândia
Plantas de produtos de laticínios	12	<i>Enterococcus, Listeria, Staphylococcus, Bacillus</i>	Alonso & Kabuki (2019)	Brasil
Luva	1	<i>Staphylococcus</i>	Lee et al., (2016)	Brasil
Superfícies externas dos tanques de armazenamento de leite (4) e tubos e conexões interiores das tubulações de leite (4)	40	<i>Acinetobacter</i> (7), <i>Aeromonas</i> (2), <i>Pseudomonas</i> (6), <i>Bacillus</i> (5), <i>Clostridium sensu Stricto</i> (3), <i>Exiguobacterium</i> , (5), <i>Sphingobacterium</i> (1), <i>Lactococcus</i> , (2), <i>Rahnelia</i> (2), <i>Comamona</i> (1) <i>Kurthia</i> (1), <i>Streptococcus</i> (2) <i>Vagococcus</i> (1), NI 2	Wang et al. (2019)	China

Tanque de recepção, tubo de conexão de plástico, caixa de coleta de soro de leite, tanque de processamento de ricota, suporte de mangueira de entrada de soro de leite, vassoura, Dreno de esgoto de soro de leite, Balde para coleta de leite, termômetro, agitador, pá e panela para coleta de coalhada, peneira da coalhada, molde de queijo, prensa, malha de retenção, parede, bancada da embalagem, caixa de armazenamento, bancada da embalagem	60	<i>Bacillus</i>	Ribeiro et al. (2019)	Brasil
Planta de processamento de soro de leite	2	<i>Klebsiella</i>	Tang et al. (2009)	Nova Zelândia
Tanque de recepção, Tubo de conexão de plástico, Caixa de coleta de soro de leite, Tanque de processamento de ricota, Suporte de mangueira de entrada de soro de leite, Vassoura, Dreno de esgoto de soro de leite, Balde para coleta de leite, Termômetro, Agitador, Pá e panela para coleta de coalhada, Peneira da coalhada, Molde de queijo, Prensa, Malha de retenção,	45	<i>Bacillus</i>	Fernandes et al. (2014)	Brasil

Parede, Bancada da embalagem, Caixa de armazenamento, Bancada da embalagem				
Tanques, Pasteurizadores, Cortadores de coalhada, Moldes, Misturadores	70	<i>Staphylococcus</i>	Avila-Novoa et al. (2018)	México
Tanque de processamento de ricota, Caixa de coleta de soro de leite, Bancada da embalagem, Superfície de bancada e embalagem, Molde das embalagens	7	<i>Enterococcus</i>	Fernandes et al. (2015)	Brasil
Tanque de refrigeração	3	<i>Bacillus</i>	Kumari & Sarkar (2014)	Índia
Equipamentos	1	<i>Staphylococcus</i>	Naik et al. (2018)	Índia
Superfícies dos equipamentos	6	<i>Staphylococcus</i>	Filipello et al. (2019)	Itália
Superfícies interna de tanques transportadores de leite	6	<i>Bacillus</i> (1), <i>Staphylococcus</i> (1), <i>Streptococcus</i> , (1), <i>Pseudomonas</i> (2), <i>Serratia</i> (1)	Teh et al. (2012)	Nova Zelândia
Tanque de leite cru, Válvulas, Junta das válvulas, Tubo de alimentação do pasteurizador, Trocadores de	35	<i>Micrococcus</i> (2), <i>Bacillus</i> (18), <i>Serratia</i> (2), <i>Acinetobacter</i> (6), <i>Clostridium</i> sp., (1), <i>Pseudomonas</i> (1), <i>Streptococcus</i> (2), <i>Moraxella</i> sp., (1) <i>Microbacteria</i> (1)	Zou & Liu (2018)	China

calor, Tanque do leite pasteurizado, Filtro duplo antes da homogeneização, Tanque de leite homogeneizado, Filtro duplo, Sondas do sensor, Bicos de pulverização		<i>Micrococcus</i> 1		
Linha de leite cru, Pré-Pasteurização, Pós-pasteurização, Pré-resfriador, Pós-resfriador, Silo, Entrada do pasteurizador, Saída do pasteurizador, Pré-resfriador, Pós-resfriador, Entrada do tanque, Saída do tanque	105	<i>Bacillus</i> (39), <i>Micrococcus</i> (1), <i>Lactococcus</i> (4) <i>Enterobacter</i> (9), <i>Staphylococcus</i> (14) <i>Klebsiella</i> sp. (1) <i>Shigella</i> sp., (13), <i>Escherichia</i> (11), <i>Citrobacter</i> (1) <i>Lactobacillus</i> (2), <i>Streptococcus</i> (1) <i>Flavobacterium</i> (2) <i>Proteus</i> (1) Não classificado (1)	Sharma & Anand (2002)	Índia
Câmara de resfriamento, Sala de pasteurização, Piso da câmara de refrigeração, Caixa de plástico, Plataforma da câmara de resfriamento, Luvas de trabalho	85	<i>Listeria monocytogenes</i>	Lee et al. (2017)	Brasil
Ambiente de processamento de ricota	12	<i>Enterococcus</i> (6) e <i>Bacillus</i> (6)	Fernandes et al. (2017)	Brasil
Superfícies de aço inoxidável de	8	<i>Pseudomonas</i>	Fysun et al. (2019)	Alemanha

 mangueiras transportadoras de leite

Tabela 02 - Principais gêneros bacterianos formadores de biofilme isolados a partir de leite e seus derivados.

PRODUTO	Nº DOS ISOLADOS	MICROORGANISMOS	REFERÊNCIAS	PAÍS
Queijo de leite cru	25	<i>Streptococcus</i>	Bassi et al., 2017	Itália
Salmoura e leite do tanque	5	<i>Staphylococcus</i> (4), <i>Listeria</i> (1)	Lee et al., (2016)	Brasil
Leite pasteurizado	11	<i>Bacillus</i> (1) <i>Corynebacterium</i> (1) <i>Delftia</i> (1), <i>Halomomas</i> (1), <i>Lactococcus</i> (1), <i>Streptococcus</i> (1), <i>Psichrobacter</i> (1), <i>Mesonnia</i> (1), <i>Pseudomonas</i> (1), <i>Rhizobiales</i> (1) <i>Sediminibacterium</i> (1)	Chamberland et al., (2019)	Canadá
Leite cru Leite pasteurizado	45	<i>Bacillus</i>	Ribeiro et al. (2019)	Brasil

Soro de queijo				
Ricota antes da embalagem				
Ricota embalada				
Leite pasteurizado, leite cru, ricota antes da embalagem, ricota embalada	36	<i>Bacillus</i>	Fernandes et al. (2014)	Brasil
Ricota comercial	4	<i>Listeria</i>	Fernandes et al. (2015)	Brasil
Leite em pó	1	<i>Bacillus</i>	Wang et al. (2019)	China
Leite em pó	41	<i>Bacillus (24), Geobacillus (5), Anoxybacillus (2), Laceyella (1), Thymus (1), brevis (1), Antrozous (1), Cookii(1), Contaminans (1), Lysinabacillus (1), Virgibacillus (1), Paenibacillus (1) e Brevibacillus (1)</i>	Sadig et al. (2017)	China
Leite cru Coalhada Queijo	43	<i>Staphylococcus</i>	Filipello et al. (2019)	Itália
Leite pasteurizado	3	<i>Bacillus</i>	Kumari & Sarkar (2017)	Índia
Leite em pó	3	<i>Bacillus</i>	Wang et al. (2019)	China
Leite cru	20	<i>Staphylococcus</i>	Akba & Kokumer (2015)	Turkey

Tabela 03- Frequência geral dos principais gêneros bacterianos formadores de biofilmes isolados a partir de equipamentos/materiais e no leite e seus derivados.

Microrganismo	Número de cepas isoladas	%
<i>Bacillus</i>	294	30,78
<i>Staphylococcus</i>	160	16,75
<i>Listeria</i>	93	9,73
Proteobacteria	72	7,53
<i>Pseudomonas</i>	65	6,80
<i>Streptococcus</i>	39	4,08
<i>Enterobacter</i>	25	2,61
<i>Acinetobacter</i>	24	2,51
Outros	183	19,21

2.4 Discussão

Um dos problemas mais significativos para o setor de leite e derivados, quanto a segurança microbiológica, consiste na formação de biofilmes em plantas de processamento. A presença de biofilmes em superfícies de plantas e equipamentos parece ser um dos principais focos de contaminação de produtos lácteos por bactérias patogênicas. A gravidade do problema fica evidente quando se observa o grande número de trabalhos publicados que indicam a persistência de patógenos envolvidos em DTAs em superfícies que entram diretamente em contato com alimentos por longos períodos (SIMÕES e VIEIRA; 2010)

Um biofilme é um complexo ecossistema microbiológico formado por populações desenvolvidas a partir de uma única ou de múltiplas espécies, sejam bactérias, fungos e/ou protozoários de modo isolado ou em combinação, associados a seus produtos extracelulares constituindo uma matriz de polímeros orgânicos e que se encontram aderidos a uma superfície biótica ou abiótica (COSTA, 1999; JAY, 2005), entretanto as bactérias são mais numerosas, e tanto as Gram-positivas quanto as Gram-negativas podem apresentar essa característica, incluindo alguns gêneros considerados patogênicos para humanos, como *Salmonella*, *Listeria*, *Escherichia*, *Pseudomonas* e *Bacillus* (BEAUREGARD *et al.*, 2013; VITAL-LOPEZ *et al.*, 2015) Os sistemas de processamento de alimentos são locais ideais para o crescimento bacteriano devido ao seu rico suprimento de nutrientes. A adesão é facilitada pela excreção microbiana de uma matriz de exopolissacarídeos, algumas vezes referida como

glicocálix. Nesse microambiente são formadas microcolônias, bem como canais de água entre e em volta das mesmas. Tal sistema de irrigação que se localiza em volta das microcolônias tem sido correlacionado com um sistema circulatório primitivo, no qual nutrientes são trazidos para dentro e produtos tóxicos são carregados para fora (JAY, 2005). Além disso, os equipamentos utilizados no processo produtivo são conectados por vários dutos, o que dificulta uma higienização de forma eficiente (VERRAN, 2002; REMENANT *et al.* 2015), assim como o tipo de material, também é de grande importância na exibição de superfícies de contato e processamento de alimentos e inclui o aço inoxidável, vidro, borracha, polietileno, politetrafluoretileno (PTFE, conhecido pelo nome comercial teflon), borracha de nitrilo (NBR) (VAN HOUDT; MICHIELS, 2010; SREY *et al.*, 2013).

Neste estudo, verificou que o isolamento ocorreu em diferentes locais como equipamentos processadores de leite, pasteurizadores, tanques de refrigeração, todos de material de aço inoxidável. De acordo com Bansal e Chen (2006), as superfícies de aço inox apresentam alta tensão interfacial, o que facilita a adesão. Estudo realizado por Kananeh *et al.* (2010) mostrou que a adesão dos depósitos poderia ser reduzida pelo decréscimo da tensão interfacial com materiais que possuem baixa energia superficial. Além desses equipamentos, foram isolados microrganismos formadores de biofilmes em diversos outros tipos de superfícies e de locais, como luvas, mão de manipulador, superfícies ambientais, câmara de resfriamento e bancada de embalagens, o que demonstra que a formação de biofilmes pode ocorrer nos mais diversos tipos de materiais presentes nas empresas processadoras de leite.

As fábricas de laticínios geralmente diferem em sua capacidade de processamento de leite modificando o perfil das instalações de processamento. Portanto espera-se que a microflora de tais laticínios varie em número e diversidade das comunidades representativas (PAGEDAR e SINGH, 2014). Neste trabalho observou-se que o gênero *Bacillus* spp representou o maior número dos isolados, tantos nos equipamentos como no leite e seus derivados. Esse alto percentual de *Bacillus* spp. se deve à sua resistência aos tratamentos térmicos normalmente utilizados na indústria de laticínios como a pasteurização.

De acordo com Bartoszewicz *et al.* (2008), *Bacillus* spp é um contaminante do leite cru e é considerado o quarto principal agente responsável por doenças transmitidas por alimentos (DTAs) (TRANT *et al.*, 2011). Por ser um microrganismo formador de esporo termorresistente, o *Bacillus* spp tem sido associado à contaminação de produtos lácteos (GRANUM; LUND, 1997). O *Bacillus* spp pode estar presente em biofilmes formados em ambientes de processamento de leite e derivados, devido ao acúmulo de matéria orgânica e

inorgânica na superfície, juntamente com a colonização das bactérias e dos seus esporos sendo estes resistentes aos processos de higienização (RIBEIRO *et al.*, 2019).

O segundo maior número de isolados de microrganismos em termos percentual foi o *Staphylococcus* spp (16,6%). Quanto ao isolamento de *Staphylococcus* spp., observou-se sua presença nos equipamentos, mãos de manipuladores, linha de leite cru e tanques de resfriamento.

A formação de biofilmes por *Staphylococcus* nas superfícies de contato com o leite no ambiente das fábricas de laticínios é uma fonte potencial de contaminação para o leite e produtos lácteos representando um risco para os consumidores (MICHU *et al.*, 2011).

Meira *et al.* (2012) avaliaram a formação de biofilmes de três isolados de *Staphylococcus aureus* associados à indústria de alimentos em superfície de aço inoxidável e polipropileno incubados a duas temperaturas (7 e 28°C/ 15 dias), observando-se que a formação de biofilmes foi favorecida a 28°C, assim como a composição nutricional da solução são propriedades que determinam a aderência dos microrganismos à superfície (DONLAN, 2002), como também a presença de leite integral, pois o mesmo pode competir por locais de ligação na superfície do aço inoxidável, podendo alterar as propriedades físico-químicas resultando em baixa adesão.

Em torno de 21,86% dos microrganismos formadores de biofilmes eram de diferentes espécies, ou seja, a indústria de laticínios alberga uma grande variedade de microrganismos multi-espécies, formando um verdadeiro nicho dos mais variados gêneros. Esses resultados vão de acordo com Sauer *et al.* (2007), que relataram em seu estudo que os biofilmes comumente encontrados na natureza são multi-espécies. Biofilmes proporcionam um nicho ideal para transferência de DNA extracromossômico (plasmidial), e essa característica permite que determinados clones contribuam para um alto índice de manutenção de genes. Nesse sentido, as interações metabólicas entre as bactérias podem influenciar a expressão fenotípica decorrente de alterações genéticas (FROLUND *et al.*, 1996).

Nesse contexto, atenta-se para o preocupante quadro de resistência a sanitizantes, fator potencializado pela transferência diferenciada de genes dentro da comunidade do biofilme. Ademais, sanitizantes também apresentam eficácia reduzida devido à proteção mecânica conferida pela matriz de EPS que envolve o biofilme maduro (FLEMMING *et al.*, 2005; MONROE, 2007). O desenvolvimento de biofilmes bacterianos em superfície é favorecido principalmente por procedimentos inadequados de limpeza e sanitização, especialmente em áreas de difícil acesso como tubos, válvulas e trocadores de calor na indústria de laticínios (BRIDIER *et al.*, 2015). Portanto as diferenças observadas na capacidade de formação de

biofilmes dos isolados, levam a diferentes capacidades de resistência do patógeno no ambiente industrial (LEE *et al.*, 2017).

Assim como *Bacillus* spp foi o grupo encontrado em maior número nos equipamentos, observou-se uma predominância deste no leite e seus derivados. Devido ao risco para a saúde pública e a sua associação com a deterioração do leite e produtos lácteos, vários estudos investigaram a ocorrência de *Bacillus cereus* no leite cru, leite pasteurizado, leite UHT e iogurte (BANYKÓ; VYLETĚLOVÁ, 2009; BARTOSZEWICZ *et al.*, 2008; VIDAL *et al.*, 2016).

Na linha de produção da indústria de laticínios, a formação de biofilmes eleva a carga microbiana dos produtos durante o processamento e, muitas vezes, os contamina com patógenos devido ao eventual desprendimento de células anteriormente aderidas. Desta forma, podem colocar em risco a saúde do consumidor, além de ocasionar prejuízos financeiros à indústria em decorrência da diminuição da vida de prateleira dos produtos (SANTOS; PEREIRA, 2009; SIMÕES *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2011).

A formação de biofilmes é uma problemática na indústria de laticínios, dificultando os processos de higienização e interferindo na qualidade e segurança do produto. É fundamental conhecer os fatores que influenciam na intensidade de sua formação, de modo a desenvolver sistemas eficientes de higienização, capazes de promover a remoção e controle das incrustações, e permitir equipamentos e linhas em condições ideais de operação (SANTOS e PEREIRA, 2009).

3 Conclusão

A formação de biofilmes é um mecanismo que os microrganismos encontram para se tornarem mais resistentes aos processos de higienização comumente utilizados pelas indústrias de laticínios, tornando-se desta forma alvo de preocupação pois muitas dessas bactérias formadores de biofilmes são patogênicas e podem ser veiculadas pelos alimentos, tornando-se assim um potencial perigo para o consumidor.

É necessário que novas tecnologias nos procedimentos de higienização sejam empregadas para evitar a incrustação dos microrganismos, pois de acordo com essa revisão sistemática foi possível observar que existe uma grande variedade de bactérias que se aderem à superfície e formam biofilmes, e assim permitem uma troca de material genético. Sendo assim é necessário conhecer quais os principais microrganismos encontrados na formação de biofilmes em indústria de laticínios e as possíveis formas de eliminá-lo através dos diferentes processos de higienização.

O resultado do presente estudo nos mostrou uma preocupação emergente, pois foi possível observar que *Bacillus* spp, *Staphylococcus* spp e *Listeria* spp foram os agentes encontrados com maior frequência na formação de biofilmes, e assim se faz necessária a adoção de medidas mais eficazes para a eliminação desses potenciais perigos na indústria láctea.

Referências

- AKBAS, M.Y.; KOKUMER, T. The prevention and removal of biofilm formation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from raw milk samples by citric acid treatments. *Int. J. Food. Sci. Tech.*, v.50, p.1666–1672, 2015. doi: 10.1111/ijfs.12823.
- ALBUQUERQUE, A.C.; ANDRADE, C.; NEVES, B. Biocorrosão – da integridade do biofilme à integridade do material. *Corros. Prot. Mater.*, vol.33, n.1-2.
- ALONSO, V.P.P; KABUKI, D.Y. Formation and dispersal of biofilms in dairy substrates. *Int. J. Dairy Technol.*, v.70, p.1-7, 2019. doi.org/10.1111/1471-0307.12587.
- ANAND, S. *et al.* Development and control of bacterial biofilms on dairy processing membranes. *Compr. Rev. Food Sci. F.*, v.13, p.18-33, 2014. doi: 10.1111/1541-4337.12048.
- ANDRADE, N.J. Higiene na indústria de alimentos: avaliação e controle de adesão e formação de biofilmes bacterianos. São Paulo: Varela, 2008.
- ARAÚJO, V.L *et al.* Biossurfactantes: propriedade anticorrosivas, antibiofilmes e antimicrobianas. *Quím. Nova*, vol. 36, n.6, 2013. doi.org/10.1590/S0100-40422013000600019
- ARAÚJO, L.V. Biossurfatantes como agentes inibidores de adesão de *Listeria monocytogenes* em superfícies de aço inox. Monografia- Medicina Veterinária. Universidade Estácio de Sá. 2006. 45p.

- AVILA-NOVOA, M.G.A. *et al.* Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* Isolated from food contact surfaces in the dairy industry of Jalisco, Mexico. *J. Food Qual.*, v.2018, p.1-8, 2018. doi: 10.1155/2018/1746139.
- BALSAMO, C.A. *et al.* Remoção de biofilme em canais de endoscópios: avaliação de métodos de desinfecção atualmente utilizados. *Rev. Esc. Enferm.*, vol.46, n. special, 2012. doi.org/10.1590/S0080-62342012000700014.
- BANSAL, B.; CHEN, X.D. A critical review of Milk fouling in heat exchanges. *Compr. Rev. Food Sci. F.*, v.5, n.2, p.27-33, 2006. doi: 10.1111/j.1541-4337.2006.tb00080.x.
- BANYKÓ, J.; VYLETĚLOVÁ, M. Determining the source of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* isolated from raw milk, pasteurized milk and yoghurt. *Lett. Appl. Microbiol.*, v.48, n.3, p.318-323, 2009. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02526.x.
- BARTOSZEWICZ, M.; HANSEN, B. M.; SWIECIEKA, L. The members of the *Bacillus cereus* group are commonly presente contaminants of fresh and a heat-treated milk. *Food Microbiol.*, v.25, n.4, p.588-596, 2008. doi: 10.1016/j.fm.2008.02.001.
- BASSI, D. *et al.* Biofilm Formation on Stainless Steel by *Streptococcus thermophilus* UC8547 in Milk Environments Is Mediated by the Proteinase PrtS. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.83, p.1-12, 2017. doi: 10.1128/AEM.02840-16.
- BEAUREGARD, P.B. *et al.* *Bacillus subtilis* biofilm induction by plant polysaccharides. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, v.110, n.17, p.1621–1630, 2013. doi: 10.1073/pnas.1218984110.
- BREMER, P. J.; FILLERY, S.; MCQUILLAN, A. J. Laboratory scale clean-in-place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. *Int. J. Food Microbiol.*, Amsterdam, v.106, n.3, p.254-262, 2006. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.07.004.
- BRIDIER, A. *et al.* Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiol.*, v.45, p.167–178, 2015. doi: 10.1016/j.fm.2014.04.015.

BOYLE, E.K. *et al.* Integration of metabolic and quórum sensing signals governing the decision to cooperate in a bacterial social trait. *PLoS Comput Biol.*, v.11, n.6, 2015. doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004279.

CHAMBERLAND, J. *et al.* Influence of feed temperature to biofouling of ultrafiltration membrane during skim milk processing. *Int. Dairy J.*, v.93, p.99-105, 2019. doi.org/10.1016/j.idairyj.2019.02.005.

CHMIELEWSKI, R.A.N.; FRANK, J.F. Biofilm formation and control in food processing facilities. *Compr. Rev. Food Sci. F.*, v.2, n.1, p.23-32, 2003. doi: 10.1111/j.1541-4337.2003.tb00012.x.

CLETO, S. *et al.* Characterization of contaminants from a sanitized milk processing plant. *PLoS One.*, v.7, n.6, 2012. doi.org/10.1371/journal.pone.0040189.

COSTA, E.T.R. Desenvolvimento de metodologia para detecção da adesão microbiana em superfície de aço inoxidável. Seropédica. Dissertação- Mestrado em Microbiologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1999, 81p.

DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.*, v.8, n.9, p.881-890, 2002. doi: 10.3201/eid0809.020063.

FERNANDES, M.S. *et al.* Enterotoxigenic profile, antimicrobial susceptibility, and biofilm formation of *Bacillus cereus* isolated from ricotta processing. *Int. Dairy J.*, v.38, p.16-23, 2014. doi.org/10.1016/j.idairyj.2014.03.009.

FERNANDES, M.S.; KABUKI, D.Y.; KUAYE, A.Y. Behavior of *Listeria monocytogenes* in a multi-species biofilm with *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* and control through sanitation procedures. *Int. J. Food Microbiol.*, v.200, p.5–12, 2015. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.01.003.

FERNANDES, M.S. *et al.* Formation of multi-species biofilms by *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, and *Bacillus cereus* isolated from ricotta processing and effectiveness

of chemical procedures. *Int. Dairy J.*, v.72, p.23-28, 2017. doi: 10.1016/j.idairyj.2017.03.016. 2017.

FILLIPELLO, V. *et al.* Molecular characterisation and biofilm production in *Staphylococcus aureus* isolates from the dairy production chain in Northern Italy. *Int. Dairy J.*, v.91, p.110-118, 2019. doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.10.002.

FLEMMING, H.C. *et al.* Physico-chemical Properties of Biofilms. In: EVANS, L.V. *Biofilms: recent advances in their study and control*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, 2005.

FLORJANIČ, M.; KRISTL, J. The control of biofilm formation by hydrodynamics of purified water in industrial distribution system. *Intl. J. Pharm.*, v.405, n.1–2, p.16–22, 2011. doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.11.038.

FRØLUND, B. *et al.* Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Res.*, v.30, n.8, p.1749-1758, 1996. doi: 10.1016/0043-1354(95)00323-1.

GRANUM, P.E.; LUND, T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiol. Lett.*, v.157, n.2, p.223-228, 1997. doi: 10.1111/j.1574-6968.1997.tb12776.x.

GUILLEMOT, G. *et al.* Shear-flow induced detachment of *Saccharomyces cerevisiae* from stainless steel: influence of yeast and solid surface properties. *Colloid Surface B.*, v.49, n.2, p.126–135, 2006. doi: 10.1016/j.colsurfb.2006.03.001.

GUTIÉRREZ, D. *et al.* Bacteriophages as weapons against bacterial biofilms in the food industry. *Front. Microbiol.*, v.7, n.8., 2016. doi.org/10.3389/fmicb.2016.00825.

JAY, J.M. Biofilmes. In: FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. *Microbiologia de Alimentos*. 6th ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

KANANEH, A.B. *et al.* Reduction of milk fouling inside gasketed plate heat exchanger using nano-coatings. *Food Bioprod. Process.*, v.88, n.4, p.349-356, 2010. doi: 10.1016/j.fbp.2010.09.010.

KASNOWSKI, M.C. *et al.* Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. *Rev. Cient. Eletrônica de Med. Vet.*, v.8, n.15, p.1-23, 2010.

KOSTAKI, M. *et al.* Differential biofilm formation and chemical disinfection resistance of sessile cells of *Listeria monocytogenes* strains under monospecies and dual-species (with *Salmonella enterica*) conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.78, p.2586–2595, 2012. doi: 10.1128/AEM.07099-11.

KUMARI, S.; SARKAR, P.K. *In vitro* model study for biofilm formation by *Bacillus cereus* in dairy chilling tanks and optimization of clean-in-place (CIP) regimes using response surface methodology. *Food Control*, v.36, p.153-158, 2014. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.08.014.

KUMARI, S.; SARKAR, P.K. Optimisation of *Bacillus cereus* biofilm removal in the dairy industry using an in vitro model of cleaning-in-place incorporating serine protease. *Int. J. Dairy Technol.*, v.71, n.2, p.512-518, 2017. doi.org/10.1111/1471-0307.12454.

LEE, J.H.; KAPLAN, J.B.; LEE, W.Y. Microfluidic devices for studying growth and detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Biomed. Microdevices*, v.10, n.4, p.489-98, 2008. doi: 10.1007/s10544-007-9157-0.

LEE, S.H. *et al.* Biofilm-producing ability of *Listeria monocytogenes* isolates from Brazilian cheese processing plants. *Food Res. Int.*, v.91, p.88–91, 2017. doi: 10.1016/j.foodres.2016.11.039.

LEE, S.H.I. *et al.* Effect of peracetic acid on biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* isolated from dairy plants. *Int. J. Dairy Sci.*, v.99, n.3, p.2384-2390, 2016.

LEWANDOWSKI, Z.; BEYENAL, H. Fundamentals of Biofilm Research. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, 2014.

MARCHAND, S. *et al.* Seasonal influence on heat-resistant proteolytic capacity of *Pseudomonas lundensis* and *Pseudomonas fragi*, predominant milk spoilers isolated from Belgian raw milk samples. *Environ. Microbiol.* v.11, n.2, p.467–482, 2009. doi: 10.1111/j.1462-2920.2008.01785.x.

MARCHAND, S. *et al.* Biofilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. *Compr. Rev. Food Sci. F.*, v.11, n.2, p.133–147, 2012. doi: 10.1111/j.1541-4337.2011.00183.x.

MEIRA, Q.G.S. *et al.* Influence of temperature and surface kind on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* from food-contact surfaces and sensitivity to sanitizers. *Food Control.*, v.25, n.2, p.469–475, 2012. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.11.030.

MICHU, E. *et al.* Biofilm formation on stainless steel by *Staphylococcus epidermidis* in milk and influence of glucose and sodium chloride on the development of ica-mediated biofilms. *Int. Dairy J.*, v.21, n.3, p.179–184, 2011. doi:10.1016/j.idairyj.2010.10.004.

MITTELMAN, M.W.; KOHRING, L.L.; WHITE, D.C. The role of biofilms in contamination of process fluids by biological particulates. In: *Particles in gases and liquids*, 2nd ed. New York: Plenum Press, 1990.

MOHER, D. *et al.* Prisma Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med.*, v.6, n.7, e1000097, 2009. doi: 10.1371/journal.pmed.1000097.

MONROE, D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biol.*, v.5, n.11, p.2458-2461, 2007. doi: 10.1371/journal.pbio.0050307.

NAIK, M.M. *et al.* Enhanced exopolysaccharide production and biofilm forming ability in methicillin resistant *Staphylococcus sciuri* isolated from dairy in response to acyl homoserine lactone (AHL). *J Food Sci Technol.*, v.55, n.6, p.2087-2094, 2018. doi.org/10.1007/s13197-018-3123-0.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes em indústrias de laticínios: aspectos gerais e uso de óleos essenciais como nova alternativa de controle. *Rev. Inst. Latic.* “Cândido Tostes”, v.68, n. 390, p.65-73, 2013. doi.org/10.5935/2238-6416.20130010.

PAGEDAR, A.; SINGH, J. Evaluation of antibiofilm effect of benzalkonium chloride, iodophore and sodium hypochlorite against biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* of dairy origin. *J Food Sci Technol.*, v.52, n.8, p.5317–5322, 2014. doi: 10.1007/s13197-014-1575-4.

REMENANT, B. *et al.* Bacterial spoilers of food: Behavior, fitness and functional properties. *Food Microbiol.* v.45, p.45–53, 2015. doi: 10.1016/j.fm.2014.03.009.

RIBEIRO, M.C.E. *et al.* Influence of different cleaning and sanitisation procedures on the removal of adhered *Bacillus cereus* spores. *Int. Dairy J.*, v.94, p.22-28, 2019. doi: 10.1016/j.idairyj.2019.02.011.

RICE, S.A. *et al.* Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues. *J Bacteriol.*, v.187, n.10, p.3477–3485, 2005. doi: 10.1128/JB.187.10.3477-3485.2005.

SADIG, F.A. *et al.* Propensity for biofilm formation by aerobic mesophilic and thermophilic spore forming bacteria isolated from Chinese milk powders. *Int. J. Food Microbiol.*, v.262, p.89–98, 2017. doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.09.015.

SANTOS, A. L.; PEREIRA, D.B.C. A formação de incrustações no processamento do leite. Aspectos Químicos e Tecnológicos. In: CONGRESSO NACIONAL DE LATICÍNIOS, 26., 2009, Juiz de Fora. Anais eletrônicos... Juiz de Fora: Epamig/ILCT, 2009. 1 CD-ROM.

SANTOS, A.L.; PEREIRA, D.B.C.; SARAIVA, C.B. A formação do Fouling e seus impactos no processamento e limpeza de indústrias de laticínios (Parte 2). *Revista Leite e Derivados*, n.126, p.80-84, 2011.

SAUER, K.; RICKARD, A.H.; DAVIES, G.D. Biofilms and Biocomplexity. *Microbe*, v.2, n.7, p.347-353, 2007. doi: [10.1128/microbe.2.347.1](https://doi.org/10.1128/microbe.2.347.1).

SHARMA, M.; ANAND, S.K. Biofilms evaluation as an essential component of HACCP for food/dairy processing industry – a case. *Food Control.*, v.13, p.469–477, 2002. [doi.org/10.1016/S0956-7135\(01\)00068-8](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(01)00068-8).

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C.; VIEIRA, M.J. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT - Food Sci. Technol.*, v.43, n.4, p.573-583, 2010. doi: 10.1016/j.lwt.2009.12.008.

SREY, S.; JAHID, I.K.; HA, S.D. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, v.31, n.2, p.572-585, 2013. doi: 10.1016/j.foodcont.2012.12.001.

TANG, X. *et al.* The efficacy of different cleaners and sanitisers in cleaning biofilms on UF membranes used in the dairy industry. *J. Membr. Sci.*, v.352, n.1-2, p.71–75, 2010. doi.org/10.1016/j.memsci.2010.01.063.

TANG, X. *et al.* Biofilm growth of individual and dual strains of *Klebsiella oxytoca* from the dairy industry on ultrafiltration membranes. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, v.36, p.1491–1497, 2009. doi 10.1007/s10295-009-0637-5.

TEH, K.H. *et al.* Biofilm – An unrecognised source of spoilage enzymes in dairy products? *Int. Dairy J.*, v.34, n.1, p.32-40. 2014. doi: 10.1016/j.idairyj.2013.07.002.

TEH, K.H. *et al.* Proteolysis produced within biofilms of bacterial isolates from raw milk tankers. *Int. J. Food Microbiol.*, v.157, n.1, p.28-34, 2012. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.008.

TRANT, S.L. *et al.* Haemolysin II is a *Bacillus cereus* virulence factor that induces apoptosis of macrophages. *Cell. Microbiol.*, v.13, n.1, p.92-108, 2011. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01522.x.

TREMBLAY, N.D.Y; HATHROUBI, S; JACQUES, M. Les biofilms bactériens: Leur importance em santé animale et em santé publique. *Can. J. Vet. R.*, v.78, n.2, p.110- 116, 2014.

VAN HOUTT, R.; MICHELIS, C.W. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surfasse. *J. Appl. Microbiol.*, v.109, n.4, p.1117-1131, 2010. doi: 10.1111/j.1365-2672.2010.04756.x.

VERRAN, J. Biofouling in food processing: biofilm or biotransfer potential? *Food. Bioprod. Process.*, v.80, p.292–298, 2002. doi: 10.1205/096030802321154808.

VIDAL, A.M.C. *et al.* Detection of *Bacillus cereus* isolated during ultra high temperature milk production flowchart through random amplified polymorphic DNA polymerase chain reaction. *Cienc. Rural*, v.46, n.2, p.286-292, 2016. doi: 10.1590/0103-8478cr20141539.

VITAL-LOPEZ, F.G.; REIFMAN, J.; WALLQVIST, A. Biofilm formation mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* predicted via genome- scale kinetic models of bacterial metabolism. *Plos. Comput. Biol.*, v.11, p.1–24, 2015. doi: 10.1371/journal.pcbi.1004452.

WANG, N. *et al.* Tandem mass tag-based quantitative proteomics reveals the regulators in biofilm formation and biofilm control of *Bacillus licheniformis*. *Food Control*, v.110, p.107029, 2019. doi: [10.1016/j.foodcont.2019.107029](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.107029).

WATNICK P, KOLTER R. Minireview: biofilm, city of microbes. *J Bacteriol.*, 2000; 182 (10): 2675-9. doi: 10.1128/JB.182.10.2675-2679.2000.

ZOU, M.; LIU, D. A systematic characterization of the distribution, biofilm-forming potential and the resistance of the biofilms to the CIP processes of the bacteria in a milk powder processing factory. *Food Res. Int.*, v.113, p.316-326, 2018. doi: 10.1016/j.foodres.2018.07.020.

CAPÍTULO II

Avaliação da qualidade higiênica sanitária das usinas de leite de cabra do Cariri paraibano

Publicado no periódico Research, Society and Development-Qualis A3
v. 10, n. 12, e596101220735, 2021
ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i12.20735>

Avaliação da qualidade higiênica sanitária das usinas de leite de cabra do Cariri paraibano

Iara Nunes de Siqueira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9972-0064> Federal University of Campina Grande,
Brazil E-mail: nunesdesiqueiraiara@gmail.com

Aline Antas Cordeiro Cavalcanti

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0904-1517> Federal University of Campina Grande,
Brazil. E-mail: aline.antas@gmail.com

Joyce Galvão de Souza

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5492-6317> Federal University of Campina Grande,
Brazil E-mail: joycegalvaosouza@gmail.com

Filipe Jordão Pereira de Medeiros

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3099-5929> Federal University of Campina Grande,
Brazil E-mail: filipejordaomedvet@gmail.com

João Carlos Taveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9512-8549> Federal University of Campina Grande,
Brazil E-mail: apenas_xx@hotmail.com

Samuel Fernandes Garcia

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4447-6716> Federal University of Campina Grande,
Brazil E-mail: samuelfernandes1998@hotmail.com

Claudia Morgana Soares.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2726-5709> Integrated Colleges of Patos, Brazil. E-mail:
claudiamorganavet@gmail.com

Suely Cristina Pereira de Lima Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9408-6364> Federal Institute of Paraíba, Brazil. E-mail:
suely.oliveira@ifpb.edu.br

Abrahão Alves de Oliveira Filho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7466-9933> Federal University of Campina Grande,
Brazil E-mail: abrahão.alves@professor.ufcg.edu.br

Marcia Almeida de Melo.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4229-9640> Federal University of Campina Grande,
Brazil E-mail: marcia.melo@ufcg.edu.br

ABSTRACT: The Cariri, in Paraíba, Brazil, became the leading goat milk producer and then increased microbiological contaminants. Poorly sanitized equipment and workers with inadequate personal hygiene are

pathogen transmission sources. Thus, the sanitary evaluation of equipment and hands is fundamental to investigate the presence of pathogens in the dairy industry. Then, this study aims to evaluate the sanitization of equipment, workers' hands, raw and pasteurized milk in goat milk dairies in the Cariri region, state of Paraíba. Collected 32 samples of four dairies represented by letters A, B, C, and D. The followings contents were analyzed: mesophiles, total and thermotolerant coliforms, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Samonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in the reception tank, pasteurization tank, packing machine, package, wall, workers' hand, and each dairy's raw and pasteurized milk. After isolation, 84 colonies were confirmed by MALDI TOF. The indicator microorganisms presented variations for the workers' hands, while A and B stayed within the patterns. For the equipment, only dairy B was within limits. They were out of the standard for mesophiles, total coliforms, and thermotolerant regarding raw and pasteurized milk. The microorganisms, the *Enterobacteriaceae* family presented a higher frequency, with 77.38%, and within this family, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., and *Enterobacter* spp. were the most prevalent. Gram-positive corresponded to 22.62%, *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., and *Macroccoccus caseolyticus*. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. were not isolated. These demonstrate failures in goat milk processing with pathogenic bacteria in several dairy plants, indicating the need to adjust the product's quality control.

Key words: Dairy; hygiene; microorganisms

RESUMO: O Cariri paraibano tornou-se o principal produtor de leite caprino e com isso vieram os contaminantes microbiológicos que podem comprometer a qualidade sanitária do produto. Equipamentos mal higienizados, assim como manipuladores sem um adequado asseio corporal, podem se tornar fontes de transmissão de patógenos, sendo assim, a avaliação da higienização dos equipamentos e mãos dos manipuladores torna-se fundamental para investigar a presença de patógenos na indústria de laticínios. Diante disso o objetivo deste trabalho foi avaliar a higienização dos equipamentos, mãos dos manipuladores e do leite *in natura* e pasteurizado nas usinas de leite de cabra do Cariri paraibano. No total foram coletadas 32 amostras, de quatro laticínios representados pelas letras A, B, C e D, onde realizou-se a pesquisa de mesófilos, coliformes totais e termotolerantes, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Samonella* spp. e *Listeria monocytogenes* no tanque de recepção, tanque de pasteurização, embaladeira, embalagem, parede, mão do manipulador, leite *in natura* e leite pasteurizado de cada laticínio. Após o isolamento, 84 colônias foram confirmadas pelo MALDI TOF. Os resultados para os microrganismos indicadores apresentaram variações para as mãos dos manipuladores, estando as usinas A e B dentro dos padrões, já para os equipamentos apenas a usina B encontrou-se dentro dos limites estabelecidos. Em relação aos leites *in natura* e o pasteurizado observou-se que os mesmos estavam fora dos padrões para mesófilos, coliformes totais e termotolerantes. Com relação aos microrganismos patogênicos observou-se que a família *Enterobacteriaceae* apresentou uma maior frequência, com 77,38%, e dentro desta família *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. foram os mais prevalentes. Já os isolados Gram positivos corresponderam a 22,62%, com destaque para *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. e *Macroccoccus caseolyticus*. *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp. não foram isoladas. Esses resultados demonstram falhas no processamento do leite caprino com presença de bactérias patogênicas em diversos ambientes da indústria, demonstrando desta forma necessidades de ajustes no controle da qualidade do produto.

PALAVRAS CHAVE: Laticínios, higienização, micro-organismos.

Introdução

O Cariri paraibano no final dos anos 90 era uma das regiões mais pobres do Brasil, tornando-se o maior problema socioeconômico, que se agravava nos períodos de longas estiagens, em decorrência da precária organização produtiva mercantil. No início dos anos 2000, com este cenário, tornou-se patente a necessidade de uma intervenção capaz de promover profundas transformações no ambiente socioeconômico, ambiental e produtivo. Partiu-se então para a implantação do programa da caprinocultura leiteira (RODRIGUES; QUINTANS, 2015), tornando o estado o maior produtor de leite caprino no país, produzindo mais de 5,5 milhões de litros de leite por ano de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2018).

O leite caprino é um alimento rico em vitaminas e minerais, sendo apropriado para a dieta de idosos, doentes e crianças, uma vez que possui digestão e absorção duas vezes mais rápida, se comparado ao leite bovino (MENDES; SILVA; ABRANTES, 2009; CENACI *et al.*, 2011), é facilmente digerido, tem alto valor nutricional e contém muitos probióticos, incluindo bactérias ácido lácticas (GARCIA *et al.*, 2014), mas para que o leite seja competitivo no mercado é preciso ter o controle da qualidade desse produto, estabelecendo um sistema de produção que preconize a competitividade e a segurança ao consumidor (ROSA *et al.*, 2017).

Devido ao seu alto valor nutritivo o leite caprino torna-se um ambiente ideal para o crescimento e a multiplicação dos microrganismos. Além da contaminação primária durante a criação do animal, existem pontos críticos durante a cadeia de produção de produtos lácteos, como processamento, transporte e armazenamento dos produtos finais (WESCHENFELDER *et al.*, 2016; AGRIMONTI *et al.*, 2017), que podem comprometer a qualidade do produto.

De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) (2013), os manipuladores podem se tornar transmissores viáveis de agentes patogênicos de doenças alimentares, quando falhas e erros são cometidos. Já os equipamentos e utensílios oferecem esse risco quando não são higienizados adequadamente e assim podem favorecer a multiplicação microbiana (ANDRADE, 2008). Desta forma, observa-se que a falta de cuidados higiênicos na cadeia produtiva resultará na obtenção de leite com alta contagem microbiana, de qualidade duvidosa e fora dos padrões exigidos pela legislação, o que aumenta a probabilidade de riscos à saúde humana (SILVA *et al.*, 2017). Portanto, controlar e monitorar a contaminação, a multiplicação e a sobrevivência microbiana nos produtos, superfícies, equipamentos, utensílios e manipuladores é imprescindível, contribuindo para a obtenção de alimentos de boa qualidade (ANDRADE, 2008).

Diante disso o objetivo desse trabalho foi avaliar a presença de microrganismos nos equipamentos, no leite *in natura* e no leite pasteurizado em usinas de leite de cabra do Cariri paraibano.

Material e Métodos

Foram selecionadas quatro usinas de leite de cabra do Cariri paraibano que foram identificadas como A, B, C e D, e que fornecem leite ao Programa de Aquisição de Alimentos (PAC). De cada um dos laticínios foram coletadas uma amostra do tanque de recepção, uma do tanque de pasteurização, uma da embaladeira, uma das embalagens, uma da mão do manipulador e uma da parede. Para avaliar a qualidade do leite foram selecionadas

duas amostras de leite por usina, sendo uma de leite *in natura*, proveniente do tanque de resfriamento (leite do conjunto) e a outra do leite após o processo de pasteurização. As coletas se repetiram por quatro vezes, totalizando 32 amostras.

A coleta do material dos equipamentos foi realizada após o procedimento de higienização. Para as amostras de superfície friccionou-se um *swab* estéril, com haste de 12 cm e umedecido em solução de água peptonada a 0,1%. Com o uso de um molde esterilizado delimitou-se o tamanho da superfície avaliada com 100cm². Aplicou-se o *swab* com pressão constante, em movimentos giratórios, numa inclinação aproximada de 30°, descrevendo movimentos da esquerda para a direita inicialmente e, depois da direita para a esquerda. A parte manuseada do *swab* foi quebrada na borda interna do frasco de 10 ml de água peptonada que continha a solução da diluição. Em seguida foi realizado o plaqueamento de alíquotas em meio de cultura apropriados (ANDRADE, 2008).

Para as mãos dos manipuladores usou-se um *swab* estéril, com haste de 12cm de comprimento, que foi umedecido em uma solução de água peptonada a 0,1%, friccionando o algodão três vezes em direção a cada um dos dedos a partir do punho. Em seguida, a começar do punho, friccionou-se o *swab* entre os dedos, retornando novamente ao punho. Os microrganismos coletados foram transferidos para tubo contendo 10 ml de solução de água peptonada (ANDRADE, 2008). Em seguida foram realizadas as diluições para os meios adequados para cada microrganismo.

Análises microbiológicas

Pesquisa de Mesófilos

Para a contagem padrão de microrganismos mesófilos viáveis foram preparadas diluições decimais usando água peptonada a 0,1%. Em seguida, 1 ml de cada diluição de 10⁰ a 10³ para equipamentos, mãos dos manipuladores e leite pasteurizado, e de 10¹ a 10⁴ para o leite *in natura*, que foi depositada no fundo de placas de Petri esterilizadas, em duplicata, distribuídas em duas séries e adicionadas de 15 a 17 ml de ágar padrão (SWANSON *et al.* 1992). Após a homogeneização e solidificação do ágar em temperatura ambiente, as placas foram incubadas a 35°C por 48 horas para a contagem de mesófilos. As contagens foram realizadas em contador de colônias, segundo a técnica padrão, em placas com 25 a 250 UFC/mL (Unidades Formadoras de Colônia por mililitro), e no caso de negatividade para este intervalo, os resultados obtidos foram considerados como estimados.

Enumeração de coliformes totais e termotolerantes

Foram adicionadas 25ml da amostra em 225mL de água peptonada tamponada 0,1%. As análises foram realizadas por meio do teste de tubos múltiplos (APHA, 2001). As amostras foram diluídas e as alíquotas foram transferidas para tubos de ensaio contendo caldo Lauril Triptose, e incubados a 37°C por 24-48h. Os tubos de ensaio que apresentaram resultados positivos foram repicados em tubos de ensaio contendo caldo Lactose Biliar Verde Brilhante 2% e caldo EC, para confirmação os quais foram incubados a 37 e 45°C por 24 e 48h, respectivamente. As densidades dos coliformes totais e termotolerantes nas amostras foram obtidas na tabela do Número Mais Provável (NMP) (APHA, 2001).

Escherichia coli

A presença de *Escherichia coli* foi confirmada com a inoculação de alíquotas dos tubos positivos para coliformes termotolerantes em placas contendo ágar eosina azul de metileno (EMB). As colônias típicas foram transferidas para tubos contendo ágar padrão para contagem (PCA), incubados a 37°C por 24 horas, e, em seguida, submetidas à caracterização fenotípica através do teste do indol, citrato e VM-VP (APHA, 2001).

Contagem de estafilococos coagulase positiva

Foram adicionadas 25ml da amostra em 225 ml de água peptonada a 0,1% (Acumedia) para o leite segundo APHA (2001). Para o *swabs* dos equipamentos retirou-se uma alíquota de 1 ml da água peptonada e realizaram-se as diluições decimais. As diluições decimais das amostras foram inoculadas em Ágar Baird Parker, suplementado com gema de ovo e telurito de potássio, e incubadas a 37°C por 48h. Após a incubação, foi realizada uma contagem presuntiva de unidades formadoras de colônia (UFC). As colônias presuntivas foram selecionadas e transferidas para caldo Infusão de Cérebro e Coração, e a confirmação foi realizada por testes fenotípicos de coloração de Gram, catalase e produção de coagulase.

Salmonella spp.

Foram adicionadas 25ml da amostra em 225 ml de água peptonada a 0,1% (Acumedia). Para o *swabs* dos equipamentos retirou-se uma alíquota de 1 ml da água peptonada e realizaram-se as diluições decimais. Para o enriquecimento seletivo, alíquotas foram transferidas para tubos de ensaio contendo os caldos Tetrionato e Rappaport Vassiliadis, sendo os respectivos tubos incubados a 37°C por 24h. Em seguida, foi utilizado um meio seletivo ágar *Salmonella* diferencial, incubado a 37°C por 24h. Colônias com características típicas de *Salmonella spp.* foram submetidas a testes fenotípicos em ágar Triplo Açúcar Ferro, ágar Lisina Ferro, caldo Uréia, indol, citrato e VM-VP (APHA, 2001).

Listeria monocytogenes

Em 25ml de cada amostra foram adicionados 225mL de caldo de enriquecimento de *Listeria* (LEB-Oxoid). Para os *swabs* dos equipamentos retirou-se 25 ml da água peptonada e colocou em caldo de enriquecimento de *Listeria* (LEB- Oxoid). Em seguida o caldo Fraser foi utilizado para enriquecimento seletivo e incubado a 37°C por 48h. Posteriormente, a inoculação foi realizada em ágar Oxford e incubado a 37°C por 48h. Colônias típicas de *Listeria* foram submetidas à identificação fenotípica com base na coloração de Gram, produção de catalase, motilidade e fermentação de carboidratos.

Análise MALDI TOF MS

Um total de 84 colônias isoladas foram submetidas à identificação, utilizando espectrometria de massa de tempo de voo de dessorção / ionização por laser assistida por matriz (MALDI-TOF MS), seguindo protocolo descrito por Barcelos *et al.* (2019).

Resultados e discussão

Os resultados microbiológicos são apresentados na Tabela 1. No total, foram 84 isolados identificados, sendo a *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* e *Enterobacter spp.*, os microrganismos que se

apresentaram com maior frequência. *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens* e *Providencia* apresentaram menor frequência. Entre os isolados de *Klebsiella* spp, as espécies identificadas foram *K. oxytoca* e *K. Pneumoniae*, as de *Enterobacter* spp., foram *E. Asburiae*, *E. cloacae* e *E. Kobei*. Apenas 11 amostras eram bactérias Gram positivas, entre elas *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp., *Enterococcus* spp. e *Macroccoccus caseolyticus*.

Tabela 1- Microrganismos identificados por MALDI-TOF MS e sua ocorrência nas amostras de produtos lácteos.

Microrganismo	Nº de isolados	Frequência(%)
<i>Escherichia coli</i>	22	26,19
<i>Klebsiella (pneumoneae e oxytoca)</i>	19	22,61
<i>Enterobacter (asburiae, cloacae e kobei)</i>	15	17,85
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8	9,52
<i>Enterococcus (faecium, faecalis)</i>	6	7,14
<i>Proteus</i>	6	7,14
<i>Bacillus (subtilis e megaterium)</i>	2	2,38
<i>Serratia (marcescens)</i>	2	2,38
<i>Staphylococcus (aureus e epidermidis)</i>	2	2,38
<i>Macroccoccus caseolyticus</i>	1	1,19
<i>Providencia</i>	1	1,19
Total	84	100

Os resultados dos microrganismos indicadores encontram-se na tabela 2. De acordo com Andrade (2008), não há padrões ou especificações para contagem microbiana em mãos de manipuladores de alimentos, apenas determina-se faixas que servem de orientação para definir as condições higiênico-sanitárias, tanto para mesófilos como para coliformes, que encontra se entre 10^3 e 10^4 UFC/mão. De acordo com os dados encontrados nesta pesquisa para mesófilos das mãos dos manipuladores todas as usinas encontram-se dentro dos padrões. Furlan e Valejo (2017) encontraram resultados insatisfatórios para mesófilos em 80% das amostras de mãos de manipuladores que coletam leite em propriedades rurais no Paraná. Esta manipulação inadequada e o descuido em relação às normas higiênicas ajudam na contaminação por microrganismos patogênicos (MELLO *et al.*, 2010).

Assim como para as mãos dos manipuladores, no nosso país não dispomos de legislação com padrões microbiológicos para equipamentos e utensílios. Muitos pesquisadores seguem as recomendações da Organização Mundial de Saúde (OMS) e Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) que admitem contagens de 50 UFCcm² para mesófilos aeróbios e de 76,7 NMP para coliformes totais (ANDRADE, 2008). Dos equipamentos avaliados para mesófilos observa-se que o tanque de pasteurização, embalagem e o tanque de recepção apresentaram-se fora dos padrões nas usinas A, C e D. Na usina B todos os pontos avaliados encontraram-se dentro dos padrões estabelecidos pela legislação internacional

Os padrões de mesófilos para o leite caprino *in natura* estão regulamentados pela IN nº 37 de outubro de 2000, que estabelece valor máximo de 5×10^5 UFC/mL (BRASIL, 2000). Nesta pesquisa o leite *in natura* do Cariri paraibano apresentou altas contagens de mesófilos nas usinas A, B e C, sendo que apenas a usina D estava dentro dos padrões, porém com valores muito próximos dos limites estabelecidos pela legislação, corroborando

com os valores de Coelho *et al.* (2018), que encontraram mesófilos com valores de $5,3 \times 10^2$ a $5,3 \times 10^5$, segundo o qual, a falta de higiene durante a ordenha e a demora na refrigeração do leite podem contribuir para as altas contagens de bactérias aeróbias mesófilas, já Padua *et al.* (2019) encontraram média de $7,6 \times 10^3$ UFC/mL, ou seja, valores dentro dos padrões.

A contagem de mesófilos do leite pasteurizado encontra-se dentro dos limites estabelecidos, com exceção da usina C, que obteve contagens de $2,5 \times 10^5$ UFC/ml. O grupo das bactérias mesófilas é constituído por *Enterobacterales*, *Clostridium* spp., *Streptococcus* spp., *Corynebacterium* spp., etc. Dentre elas as *Enterobacterales* são as mais importantes e perigosas, podendo causar infecções intestinais, urinárias, septicemias, e até a morte celular das hemácias por conta da capacidade da produção de ácido láctico (FURLAN; VALEJO, 2017).

Os coliformes totais e termotolerantes das mãos dos manipuladores estavam dentro dos padrões de acordo com Andrade (2008). Os valores de coliformes totais variaram de $<0,3$ a $2,3$ NMP/mL e de $<0,3$ a $1,5$ NMP/mL para coliformes termotolerantes, e esses dados corroboram com os de Candeira *et al.* (2020) e Figueiredo *et al.* (2016), que encontraram resultados satisfatórios para as mãos de manipuladores de leite em uma indústria de laticínios no Pará. Já nos equipamentos e utensílios todas as usinas do presente estudo encontraram-se dentro dos padrões, com valores que variaram de $<0,3$ a 24 , para coliformes totais e termotolerantes, corroborando com Candeira *et al.* (2020), que encontraram resultados satisfatórios na avaliação dos equipamentos em uma indústria de laticínios.

Os coliformes totais são compostos por bactérias da família *Enterobacterales*, capazes de fermentar a lactose com produção de gás, quando incubados a $35-37^\circ\text{C}$ por 48 horas (MENDES *et al.*, 2009), já os coliformes termotolerantes são caracterizados pela sua capacidade de fermentar a lactose com produção de ácido e gás em temperatura de 45°C (COELHO *et al.*, 2018). Estes microrganismos se constituem em um subgrupo dos coliformes totais, onde sua presença indica a probabilidade de contaminação com material de origem fecal (MENDES *et al.*, 2009). Em trabalho realizado por Dutra *et al.* (2014) com leite de cabra *in natura* em diferentes temperaturas de conservação, foi encontrada variação de <3 a >1100 NMP/mL. Apesar de não existir padrão de coliformes para o leite *in natura*, de acordo com Coelho *et al.* (2018) a presença de bactérias do grupo coliformes nas amostras de leite de cabra *in natura* pode indicar a existência de contaminação do leite.

Os resultados de coliformes totais e termotolerantes do leite pasteurizado variaram de $2,1$ a 240 NMP/mL e de $2,1$ a 460 NMP/mL, respectivamente. De acordo com a legislação, o limite estabelecido é de 2 NMP para coliformes totais e 0 NMP/ml para coliformes termotolerantes, demonstrando que todas as usinas avaliadas apresentam se fora dos padrões para coliformes totais e termotolerantes (BRASIL, 2000).

Vários trabalhos encontraram qualidade higiênica insatisfatória em pesquisa de coliformes totais e termotolerantes em leite de cabra pasteurizado (MARASCHIN *et al.* 2004; ANDRADE *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2017;), já Santos *et al.* (2012) e Fonseca *et al.* (2006) não encontraram coliformes termotolerantes no leite pasteurizado.

Os coliformes são destruídos na pasteurização e a presença destes em leite pasteurizado indica a necessidade de uma ação mais efetiva no controle do tempo e temperatura do pasteurizador, na seleção de fornecedores de leite cru e na sanitização dos equipamentos que entram em contato com o leite após pasteurização e que evidencia a necessidade de reavaliação dessas etapas, a fim de se identificar e diagnosticar todos os focos de contaminação. (SILVA *et al.*, 2008; MARTINS *et al.*, 2012).

As colônias isoladas dos equipamentos, do leite *in natura* e pasteurizado analisadas neste estudo foram submetidas à identificação por MALDI-TOF MS. Na tabela 3 observa-se que das 24 amostras dos equipamentos e mãos dos manipuladores, 66,67% apresentavam-se contaminados. De acordo com Andrade (2008), nas superfícies de equipamentos devem estar ausentes patógenos. A embalagem foi um dos locais com maior presença de microrganismos patogênicos em todas as usinas e existe uma relação direta entre eles já que os funcionários são responsáveis pela manipulação da embalagem, o que torna esses locais pontos críticos de controle dentro do estabelecimento. Observou-se que a usina D foi a mais contaminada, com presença de microrganismos patogênicos em todos os locais avaliados, já a usina C apresentou uma menor frequência de contaminação com a presença de microrganismos na mão do manipulador, tanque de pasteurização e embalagem.

Tabela 2 – Enumeração de coliformes totais, termotolerantes e de mesófilos nos equipamentos, no leite de cabra *in natura* e pasteurizado do Cariri paraibano, durante o período de janeiro a fevereiro de 2019.

Microorganismos	Usina	Mão do manipulador	Tanque de recepção	Tanque de pasteurização	Embaladeira	Embalagem	Parede	Leite <i>in natura</i>	Leite pasteurizado
Mesófilos UFC/cm ²	A	7,4x10 ²	1,7x10 ²	5,5x10 ²	Negativo	3,7x10 ²	Negativo	>2,5 x 10 ⁴	9,0x10 ³
	B	5,5x10 ¹	2,4x10 ¹	<2,5x10 ¹	<2,5x10 ¹	Negativo	Negativo	>2,5 x 10 ⁴	4,3x10 ²
	C	4,5 x 10 ³	>2,5x10 ²	5,1x10 ⁴	Negativo	4,3x10 ³	>2,5x10 ²	>2,5 x 10 ⁴	>2,5 x 10 ³
	D	1,3x10 ³	4,6x10 ²	>2,5x10 ²	<2,5x10 ¹	2,7x10 ²	1,1x10 ³	4,8x10 ⁵	8,3x10 ²
Coliformes Totais NMP/cm ²	A	2,3	2,3	0,9	<0,3	0,9	<0,3	2,4 x 10 ⁵	460
	B	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	2,4x10 ⁵	>240
	C	1,5	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	2,4x10 ⁵	2,1
	D	<0,3	24	<0,3	<0,3	1,5	<0,3	2,4x10 ⁵	110
Coliformes Termotolerantes NMP/cm ²	A	0,4	<0,4	0,4	<0,3	0,9	<0,3	2,4x10 ⁵	460
	B	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	1,5x10 ⁴	110
	C	1,5	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	<0,3	2,4x10 ⁵	2,1
	D	<0,3	24	<0,3	<0,3	4,3	<0,3	2,4x10 ⁵	110

Tabela 3- Espécies bacterianas identificadas pelo MALDI TOF em equipamentos, no leite de cabra *in natura* e pasteurizado em usina do Cariri paraibano durante o período de janeiro a fevereiro de 2019.

Nicho	Usinas			
	A	B	C	D
Mão do manipulador	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Bacillus megaterium</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Bacillus subtilis</i>	<i>Providencia</i>
Tanque de recepção	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Enterococcus spp.</i>
Tanque de pasteurização	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Enterococcus spp.</i>
Embaladeira	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Enterococcus spp.</i>
Embalagem	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Serratia marcescens</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Enterococcus spp.</i>
Parede	-	-	-	-
Leite <i>in natura</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Enterococcus spp.</i>	<i>Escherichia coli</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter kobei</i> <i>Enterobacter asburie</i> <i>Enterococcus spp.</i>

Leite pasteurizado

Klebsiella pneumoniae

Enterobacter kobei

Escherichia coli

Klebsiella pneumoniae

Proteus mirabilis

Pseudomonas aeruginosa

Escherichia coli

Enterococcus spp.

Escherichia coli

Enterobacter cloacae

Dos 84 isolados obtidos nas indústrias de leite de cabra do Cariri paraibano, 77,38% pertencem à família *Enterobacterales*, com 6 gêneros diferentes, sendo que a *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. foram as espécies com a maior frequência de isolamento, com 66,66% dos isolados. Esses microrganismos têm como habitat de origem o trato gastrointestinal de humanos e animais. São consideradas bons indicadores das condições higiênico-sanitárias dos alimentos (CRUZ *et al.*, 2019) e capazes também de gerar quebra das proteínas e dos lipídios, contribuindo para perdas econômicas e desperdício (BAYLIS *et al.*, 2011), devido a produção de enzimas.

Na Europa, a família *Enterobacterales* tem sido utilizada como indicador de qualidade em laticínios e do estado higiênico dos produtos lácteos e do ambiente de processamento (HERVERT *et al.*, 2016), sendo assim a mesma é usada como um marcador para contaminação e condições de higiene durante processamento ou pós-processamento pois sua presença pode indicar patógenos entéricos (MORAES *et al.*, 2009; OKURA; MARIN, 2014). A *Escherichia coli* foi encontrada apenas no leite *in natura* e no leite pasteurizado, o que indica falhas no controle de qualidade do estabelecimento.

Klebsiella spp. e *Enterobacter* spp. foram encontradas em vários ambientes de processamento de leite de cabra, entre eles mão do manipulador, tanque de recepção, tanque de pasteurização, embalagem, leite *in natura* e leite pasteurizado, demonstrando que existem lacunas no processo de higienização que precisam ser reavaliadas para assegurar a qualidade higiênica do produto. *Klebsiella* spp. causa mastite, e é comumente encontrada no ambiente, água, camas e solos, sendo que as duas espécies mais frequentes são *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* (SANTOS *et al.*, 2019; SANTOS JÚNIOR *et al.*, 2019; PODSCHUM; ULLMANN, 1998; CERQUEIRA *et al.*, 2011).

Enterobacter spp. possui ampla disseminação, compondo a flora do trato gastrointestinal humano e animal e, por vezes, tornam-se agentes patogênicos oportunistas (MEZZATESTA; GONA; STEFANI, 2012). Ganham significância clínica crescente durante os últimos anos e foram reconhecidos como os principais patógenos nosocomiais, especialmente para pacientes de terapia intensiva (por exemplo, causando septicemia). Esses microrganismos são amplamente difundidos no meio ambiente, uma vez que são encontrados no solo e esgoto (WISPLINGHOFF *et al.*, 2004; DENTON, 2007).

Listeria monocytogenes e *Salmonella* spp. não foram encontradas nas amostras pesquisadas, mas trabalhos demonstram sua presença na indústria de laticínios (ZEGARRA *et al.*, 2009; Monte *et al.*, 2016), e são microrganismos envolvidos em surtos associados a ingestão de leite (CRUZ *et al.*, 2019).

Os outros gêneros identificados como *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. e *Macrococcus* são microrganismos Gram positivos. Muitas dessas espécies são patógenos com potenciais para formação de biofilmes (LIRA *et al.*, 2016; NOVOA *et al.*, 2018; ALONSO e KABUKI, 2019; WANG *et al.*, 2019) e, quando aderidos aos equipamentos torna-se mais difícil sua eliminação, podendo funcionar como fontes de micro-organismos patogênicos para o produto processado.

CONCLUSÃO:

A presença de diversas espécies bacterianas patogênicas nos equipamentos e no leite de cabra *in natura* e pasteurizado nas usinas do Cariri paraibano revelam falhas nos procedimentos de higiene, sendo necessário a

reavaliação das práticas de higiene e controle de qualidade dos produtos processados adotadas nos estabelecimentos, para assegurar a qualidade sanitária do produto final.

Referências:

- Agrimonti, C., Botari, B., Sardaro, M. L. S. & Marmiroli, N. (2017). Application of realtime PCR (qPCR) for characterization of microbial populations and type of milk in dairy food products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53 (7): 1157- 1226.
- Alonso, V. P. P. & Kabuki, D. Y. (2019). Formation and dispersal of biofilms in dairy substrates. *International Journal of Dairy Technology*, 72 (3), 472-478.
- American Public Health Association – APHA. (2001). *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. (4th ed.), American Public Health Association.
- Andrade, N. J. (2008). *Higiene na indústria de Alimentos: Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos*. Varela
- Andrade, P. V. D., Souza, M. R., Penna, C. F. A. M. & Ferreira, J. M. (2008). Características microbiológicas e físico-químicas do leite de cabra submetido à pasteurização lenta pós-envase e ao congelamento. *Ciência Rural*, 38 (5), 1424-1430.
- Barcelos, M. M., Martins, L., Grenfell, R. C., Juliano, L., Anderson, K. L., Santos, M. V. & Gonçalves, J. L. (2019). Comparison of standard and on-plate extraction protocols for identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF MS. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50, 849–857.
- Baylis, C., Uyttendaele, M., Joosten, H. & Davies, A. (2011). *The Enterobacteriaceae and their significance to the food industry*. ILSI Europe, Brussels. www.ils.eu.
- Brasil. Instrução Normativa nº 37, de 31 de outubro de (2000). Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leite de Cabra. Brasília, 2000.
- Candeira, R. P., Lacerda, L. M., Silva, A. S., Galeno, L. S., Moreno, B. F. S. & Durães, C. C. (2020). Evaluation of the hygienic-sanitary conditions of a dairy localized in the Island of São Luís, Maranhão. *Arquivos do Instituto Biológico*, 87, 1-5.
- CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic Resistance Threats in the United States (2013). U.S. Department of Health and Human Services.
- Cenaci, D. B., Furtado, M. A. M., Bell, M. J. V., Pereira, M. S., Amigo, L. & Pinto, M. A. O. (2011). Aspectos composicionais, propriedades funcionais, nutricionais e sensoriais do

leite de cabra: uma revisão. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 66 (382), 12-20.

Cerqueira, A. S., Machado, P., Marto, J., Lito, L., Melo-Cristino, J. & Duarte, A. (2011). Persistência de *Klebsiella pneumoniae* em doentes de unidades pediátricas do Hospital de Santa Maria, em Lisboa. *Acta Pediátrica*, 42 (2), 49-53.

Coelho, M. C. S. C., Rodrigues, B. R., Coelho, M. I. S., Libório, R. C., Costa, F. F. P. & Silva, G. L. (2018). Características físico-química e microbiológica do leite de cabra produzido em Petrolina-PE. *Agropecuária Científica no Semiárido*, 14 (3), 175-182.

Cruz, A. G., Zacarchenco, P. B., Oliveira, C. A. F. & Corassin, C. H. (2019). *Microbiologia, higiene e controle de qualidade no processamento de leite e derivados*. 1 ed. Rio de Janeiro: Elsevier.

Denton, M. (2007). Enterobacteriaceae. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29 (3), 9–22.

Dutra C. M. C., Svierk, B., Ribeiro, M. E. R., Pinto, A. T., Zanela, M. B. & Schmidt, V. (2014). Parâmetros de qualidade do leite de cabra armazenado sob frio. *Arquivos do Instituto Biológico*, 81 (1), 36-42.

Figueiredo, E. L., Melo, J. K. L. & Neves, N. C. O. (2016). Diagnóstico higiênico-sanitário e da qualidade microbiológica de produtos lácteos em um laticínio localizado em Tucuruí-Pará. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 71 (2), 53-64.

Fonseca, C. R., Porto, E., Dias, C. T. S., & Susin, I. (2006). Qualidade do leite de cabra *in natura* e do produto pasteurizado armazenados por diferentes períodos. *Food Science and Technology*, 26 (4), 944-949.

Furlan, M. F. & Valejo, N. M. (2017). Avaliação da ocorrência de bactérias mesófilas no leite cru e análise do enquadramento das boas práticas de manuseio feito pelos produtores rurais de Ji-Paraná. *Journal of basic Education, Technical and Technological*, 4 (2), 30-42.

Hervert, C. J., Alles, A. S., Martin, N. H., Boor, K. J. & Wiedmann, M. (2016). Evaluation of different methods to detect microbial hygiene indicators relevant in the dairy industry. *Journal Dairy Science*, 99, 7033–7042.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2018). Censo Agropecuário. <https://censos.ibge.gov.br/agro/2017>.

Lira, M. C., Givisiez, P. E. N., Sousa, F. G. C., Magnani, M., Souza, E. L., Spricigo, D. A. & Gebreyes, W. A. (2016). Biofilm-forming and antimicrobial resistance traits of staphylococci isolated from goat dairy plants. *The Journal of Infection in Developing Counties*, 10 (9), 932-938.

Maraschin, F. L., Pinto, A. T. & Schmidt, V. (2004). Presença de coliformes e parâmetros físico-químicos de leite de cabra integral pasteurizado de um laticínio sob inspeção estadual, no Rio Grande do Sul. *Pesquisa Agropecuária Gaúcha*, 10 (2), 73-77.

Martins, J. N., Santos, D. C., Oliveira, E. N. A. & Albuquerque, E. M. B. (2012). Qualidade microbiológica de leites pasteurizados comercializados na cidade de Morada Nova, Ceará. *Revista Verde [online]*, 7 (3), 119-123.

Mendes, C. G., Silva, J. B. A. & Abrantes, M. R. (2009). Caracterização organoléptica, físico-química, e microbiológica do leite de cabra: uma revisão. *Acta Veterinaria Brasilica*, 3 (1), 5-12.

Mello, A. G., Gama, M. P., Marin, V. A. & Colares, L. G. T. (2010). Conhecimento dos manipuladores de alimentos sobre boas práticas nos restaurantes públicos populares do Estado do Rio de Janeiro. *Brazilian Journal of Food Technology*, 13 (1), 60-68.

Mezzatesta, M. L., Gona, F. & Stefani, S. (2012). Enterobacter cloacae complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiology*, 7 (7), 887-902.

Monte, D. F. M., Lopes Júnior, W. D., Oliveira, C. J. B. & Moura, J. F. P. (2016). Indicadores de qualidade microbiológica do leite caprino produzido na Paraíba. *Agropecuária Científica no Semiárido*, 12 (4), 354-358.

Moraes, P. M., Viçosa, G. N., Yamazi, A. K., Ortolani, M. B. T. & Nero, L.A. (2009). Foodborne pathogens and microbiological characteristics of raw milk soft cheese produced and on retail sale in Brazil. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6, 245-249.

Novoa, M. G. A., Moreno, I. M. M., Solis, V. O. A., Gonzalez, G. J. P., Guerreo, M. P. J. & Lomeli, G. M. (2018). Biofilm formation by *Staphylococcus aureus* isolated from food contact surfaces in the dairy industry of Jalisco, Mexico. *Journal of Food Quality*, 2018, 1-8.

Okura, M. H. & Marin, J. M. (2014). Survey of Minas frescal cheese from Southwest Minas Gerais for virulence factors and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates. *Ciência Rural*, 44, 1506-1511.

Padua, F. S., Couto, E. P., Nero, L. A. & Ferreira, M. A. (2019). Qualidade físico-química e microbiológica de leite de cabra produzido no Distrito Federal.

Ciência Animal Brasileira, 20 (1-9), e-43357.

Pereira, A. S., Shitsuka, D. M., Parreira, F. J. & Shitsuka, R. (2018). Metodologia da Pesquisa Científica. [free e-book]. Santa Maria/RS. Ed. UAB/NTE/UFSM.

Podschun, R. & Ullmann, R. (1998). *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*, 11 (4), 589-603.

Rodrigues, A. & Quintans, L. J. (2015). Importância da caprinocultura leiteira para o desenvolvimento do Cariri paraibano. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, 18 (2), 15-22.

Rosa, J. F., Domingues, L. S. P., Silva, R. H., Lima, H. G. & Cereser, N. D. (2017). Pontos críticos de contaminação na produção leiteira. *Expressa Extensão*, 22 (1), 90-103.

Santos, D. C., Martins, J. N., Oliveira, E. N. A. & Falcão, L. V. (2012). Caracterização de leite caprino comercializado na região do Vale do Jaguaribe, Ceará.

Revista Verde, 7 (2), 289-295.

Santos Júnior, D. A. S., Matos, R. A. T., Melo, D. B., Garino Júnior, F., Simões, S. V. D. & Neto, E. G. M. (2019). Etiologia e sensibilidade antimicrobiana in vitro de bactérias isoladas de cabras com mastite no sertão e cariri paraibano. *Ciência Animal Brasileira*, 20, e-44848.

Santos, J. V. I., Lima Júnior, A. C., Araújo, T. G. P., Farias, J. P. & Lisboa, A. C. C. (2019). Avaliação da qualidade do leite de cabra em uma propriedade no município de Monteiro – PB. *Revista Craibeiras de Agroecologia*, 4 (1), e7682.

Silva Júnior, E. A. (2014). Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação. (7a ed.), Varela.

Silva, M. C. D., Silva, J. V. L., Ramos, A. C. S., Melo, R. O. & Oliveira, J. O. (2008). Características microbiológicas e físico-químicas de leite pasteurizado destinado ao programa do leite no Estado de Alagoas. *Ciência e Tecnologia Alimentar*, 28 (1), 226-230.

Silva, J. B. P., Macêdo, C. S., Oliveira, S. M. S., Rangel, A. H. N. & Mirmann, L. (2017). Qualidade microbiológica do leite caprino em propriedades rurais da região de Macaíba/RN. *Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes*, 72 (2), 67-73.

Swanson, K. M. J., Busta, F. F., Peterson, E. H. & Johnson, M. G. (1992). *Colony count methods*. In: American Public Health Association. Committee on microbiological methods for foods. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Washington: American Public Health Association. p. 75-95.

Wang, B., Tan, X., Du, R., Zhang, L., Han, Y. & Zhou, Z. (2019). Bacterial composition of biofilms formed on dairy processing equipment. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 49 (5), 477-484.

Weschenfelder, S., Paim, M. P., Gerhardt, C. & Wiest, J. M. (2016). Avaliação da rotulagem nutricional e das características físico-químicas e microbiológicas de diferentes marcas de leite pasteurizado e leite UHT. *Boletim de Indústria Animal*, 73 (1), 32-38.

Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S.M., Seifert, H., Wenzel, R.P. & Edmond, M.B. (2004). Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clinical Infectious Diseases*, 39 (3), 309–317.

Zegarra, J. J. Q., Botteon, R. C. C. M., Oliveira, B. C. R. S., Botteon, P. T. L. & Souza, M. M. (2009). Pesquisa de microrganismos em utensílios, leite e queijos de produção artesanal em unidades de produção familiar no município de Seropédica, Rio de Janeiro. *Ciência Animal Brasileira*, 10 (1), 312-32

CAPÍTULO III

Pesquisa de integrons em *Klebsiella* spp e *Escherichia coli* isolados nas unidades de beneficiamento de leite caprine

Submetido a Revista Letter in Applied Microbiology, Qualis A3

ISSN on-line: 1472765X

Pesquisa de integrons em *Klebsiella* spp e *Escherichia coli* isolados em unidades de beneficiamento de leite caprino

Integrons na caprinocultura leiteira

Iara Nunes de Siqueira¹, Aline Antas Cordeiro Cavalcanti², Abrahão Alves de Oliveira Filho³, Marcia Almeida de Melo⁴

¹Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciência e Saúde Animal-UFCG/CSTR-Patos/PB, Brasil

²Doutora em Ciência e Saúde Animal-UFCG/CSTR-Patos/PB, Brasil

³Professor Associado do curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina / Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Campus-Patos-PB.

⁴Professora Associada do curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Campina Grande/ Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Campus-Patos-PB.

Autor para correspondência: nunesdesiqueiraiara@gmail.com

Impacto do estudo: A caprinocultura leiteira desempenha um papel social de grande relevância para a região tornando-se fonte de renda e considerado um alimento nobre para a população carente da região. A presença de genes de integrons e ESBL nesta atividade demonstra a necessidade de políticas sanitárias para a prevenção de microrganismos com genes de resistência tornando esse trabalho pioneiro com pesquisa de integrons no beneficiamento do leite caprino.

Resumo: O leite caprino pode ser fonte de contaminação de microrganismos patogênicos, com resistência aos diversos fármacos. Diante do impacto social que a caprinocultura leiteira

desempenha, este trabalho teve como objetivo identificar genes de integrons em *Enterobacteriales* e ESBL isoladas no leite caprino. Foi realizado o isolamento no tanque de pasteurização, embalagem, tanque de recepção, manipulador, no leite *in natura* (leite do conjunto) e leite pasteurizado. Foram semeados nos meios de cultura McConkey e EMB e identificados por MALDI TOF. A avaliação da resistência bacteriana foi feita através de disco difusão e a pesquisa de ESBL pelo método de aproximação dos discos. A pesquisa dos genes de integrons foi realizada pela técnica de PCR. Foram obtidos 13 isolados de *Klebsiella* spp e 14 de *E. coli*. *E. coli* foi isolada no leite *in natura* e leite pasteurizado. *Klebsiella* spp foi encontrada no tanque de recepção, tanque de pasteurização, embalagem, mão do manipulador, leite *in natura* e leite pasteurizado. Das 27 cepas avaliadas, 51,8% (14/27) foram resistentes a, pelo menos, três ou mais classes de antimicrobianos. Entre os isolados de *Klebsiella* spp, 38,4% (5/13) apresentaram resistência a três ou mais classes de antimicrobianos, sendo que 92,3% (12/13) dos isolados foram resistentes à cefalotina. Os antimicrobianos que foram mais eficazes contra *Klebsiella* spp foram cloranfenicol e gentamicina ambos com 7,69% (1/13) de resistência. Com relação à *E. coli*, 64,2% (9/14) das amostras avaliadas apresentaram resistência a, pelo menos, três ou mais classes de antimicrobianos. A tetraciclina e a cefalotina apresentaram os maiores percentuais de resistência com 64,2% (9/14) para cada antimicrobiano. Verifica-se que o antimicrobiano mais eficaz contra os isolados foi o cloranfenicol com apenas uma amostra resistente de *Klebsiella* spp e nenhuma amostra resistente de *E. coli*. Quanto aos integrons não houve amplificação para os genes *IntI1*, *IntI2* e *IntI3*. Por outro lado, a região cassette dos integrons foi amplificada em 11,1% dos isolados (3/27), sendo 15,3% (2/13) de *E. coli* e 7,14% (1/14) de *K. pneumoniae*. Já para a pesquisa de ESBL observou que 37% (10/27) dos isolados resistentes aos antibióticos beta-lactâmicos apresentaram fenótipos para ESBL. A identificação de genes de integrons em isolados provenientes de unidades de beneficiamento de leite de cabra demonstra um risco potencial

deste alimento na disseminação de *Enterobacteriales* com perfil de resistência a antimicrobianos, principalmente considerando que o destino do produto é o Programa Alimenta Brasil (PAB), tornando esta pesquisa pioneira com esses genes de resistência na cadeia produtiva do leite caprino.

Palavras chaves: Integron, *Enterobacteriales*, Gene cassettes,

Abstract: Goat milk can be a source of contamination by pathogenic microorganisms, with resistance to various drugs. Given the social impact that dairy goat farming plays in the Cariri region of Paraíba, this work aimed to identify integron genes in Enterobacteriaceae isolated in a goat milk processing plant. Isolation was performed using McConkey and EMB culture media and identified by MALDI TOF. The evaluation of bacterial resistance was performed using disk diffusion and the search for ESBL using the disk approach method. The research of integron genes was performed by the PCR technique. 13 isolates of *Klebsiella* spp and 14 of *E. coli* were obtained. *E. coli* was isolated from raw milk and pasteurized milk. *Klebsiella* spp was found in the reception tank, pasteurization tank, packaging, handler's hand, in natura and pasteurized milk. Of the 27 strains evaluated, 51.8% (14/27) were resistant to at least three or more classes of antimicrobials. Among the *Klebsiella* spp isolates, 38.4% (5/13) were resistant to three or more classes of antimicrobials, and 92.3% (12/13) of the isolates were resistant to cephalothin. The antimicrobials that were most effective against *Klebsiella* spp were chloramphenicol and gentamicin, both with 7.69% (1/13) of resistance. Regarding *E. coli*, 64.2% (9/14) of the samples evaluated showed resistance to at least three or more classes of antimicrobials. Tetracycline and cephalothin showed the highest percentages of resistance with 64.2% (9/14) for each antimicrobial. It appears that the most effective antimicrobial against the isolates was chloramphenicol with only one resistant sample of *Klebsiella* spp and

no resistant sample of *E. coli*. There was no amplification for the *IntI1*, *IntI2* and *IntI3* genes. On the other hand, the cassette region of the integrons was amplified in 11.1% of the isolates (3/27), with 15.3% (2/13) of *E. coli* and 7.14% (1/14) of *K. pneumoniae* (Table 3). As for the ESBL research, it was observed that 37% (10/27) of the isolates resistant to beta-lactam antibiotics presented ESBL phenotypes. The identification of integron genes in isolates from mini plants for goat milk processing demonstrates a potential risk of this food in the dissemination of Enterobacteriaceae with a profile of resistance to 4th generation antibiotics, especially considering that the product is destined for the Programa Alimenta Brasil (PAB), making this research pioneer with these resistance genes in the goat milk production chain.

Key word: integron; *Enterobacteriales*; cassette genes.

Introdução:

Microrganismos patogênicos podem contaminar o leite caprino, tornando-o um veículo potencial de Doenças Veiculadas por Alimentos (DVAs). Na literatura, relata-se isolamento de vários microrganismos no leite caprino como *Staphylococcus* spp. (Siqueira *et al.* 2021), bolores e leveduras (Padua *et al.* 2019), *Klebsiella* spp, *Escherichia coli* (Siqueira *et al.* 2021), *Bacillus*, *Enterococcus* e *Macrocooccus* (Siqueira *et al.* 2021), que se tornam resistentes aos antimicrobianos. Mundialmente, a resistência bacteriana tornou-se um dos problemas mais graves para a saúde humana e animal devido ao uso indiscriminado. Os alimentos, entre eles o leite e seus derivados, podem atuar como veículo de bactérias resistentes aos antimicrobianos para humanos. A contaminação de alimentos com bactérias pode ser um grande problema e ameaça pois microrganismos com genes de resistência podem realizar transferência para outras bactérias de importância clínica (Van *et al.* 2008).

O uso não específico de antimicrobianos promoveu uma rápida propagação de resistência de muitos microrganismos e causa um grande problema para tratamento de tais infecções (Magiorakos *et al.* 2012). Essa resistência é transportada por transposons, plasmídeos e genes de integrons que são os principais genes e tem uma grande prevalência em especial na família *Enterobacterales* (Cergole-Novella *et al.* 2011). Os gêneros desta família são habitantes naturais do trato intestinal de humanos e animais, membros como *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella*, *Klebsiella* e *Yersinia* são comumente implicadas em doenças intestinais, geniturinárias e infecções da corrente sanguínea (Donnenber e Donnernber, 2005).

Integrons são elementos genéticos, não móveis, com papel na aquisição e expressão de genes que conferem resistência a antimicrobinos, mediada por uma integrase codificada por integron, que captura genes que fazem parte de cassetes e são transferidos entre bactérias (Chunfeng *et al.* 2013). Os íntegros podem ser considerados uma das principais causas de disseminação de resistência bacteriana e desempenham um papel importante na aquisição e difusão de genes de resistência a antimicrobianos e na propagação de multirresistência em bactérias Gram-negativas, devido à sua capacidade de capturar os cassetes de genes no ambiente e incorporá-los (Farshad *et al.* 2008; Guerin *et al.* 2017; Ding *et al.* 2019). Assim, a detecção e a caracterização dos integrons contendo genes de resistência aos antimicrobianos são passos fundamentais na avaliação do potencial de um determinado ambiente representar um reservatório de resistência aos antimicrobianos (Pires *et al.*, 2019).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi identificar genes de integrons e beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) em *Klebsiella* spp e *Escherichia coli* isolados de unidades de beneficiamento de leite de cabra.

Material e Métodos

Obtenção das amostras

Foram selecionadas quatro unidades de beneficiamento de leite de cabra, identificadas como A, B, C e D, e que fornecem leite ao Programa Alimenta Brasil (PAB) no estado da Paraíba, Brasil. O PAB é um programa do governo federal em parceria com os estados para destinar a população carente da região alimentos. De cada uma das unidades de beneficiamento, foram coletadas amostras do tanque de recepção, do tanque de pasteurização, da embaladeira, da embalagem, da mão do manipulador e do ambiente (parede) do estabelecimento. As amostras de leite foram obtidas do produto *in natura*, proveniente do tanque de resfriamento (leite do conjunto), e a outra do leite após o processo de pasteurização. As coletas se repetiram por quatro vezes, totalizando 32 amostras.

A coleta do material dos equipamentos foi realizada após o procedimento de higienização. Para as amostras de superfície, friccionou-se um *swab* estéril, com haste de 12 cm, umedecido em solução de água peptonada a 0,1%. Com o uso de um molde esterilizado, delimitou-se o tamanho da superfície avaliada com 100cm². Aplicou-se o *swab* com pressão constante, em movimentos giratórios, numa inclinação aproximada de 30°, descrevendo movimentos da esquerda para a direita inicialmente e, depois da direita para a esquerda. A parte manuseada do *swab* foi quebrada na borda interna do frasco de 10 ml de água peptonada que continha a solução da diluição. Em seguida, foi realizado o plaqueamento de alíquotas em meio de cultura apropriados (ANDRADE, 2008).

Para as mãos dos manipuladores, usou-se um *swab* estéril, com haste de 12cm de comprimento, que foi umedecido em uma solução de água peptonada a 0,1%, friccionando o algodão três vezes em direção a cada um dos dedos a partir do punho. Em seguida, a começar do punho, friccionou-se o *swab* entre os dedos, retornando novamente ao punho. Os microrganismos coletados foram transferidos para tubo contendo 10 ml de solução de água peptonada (ANDRADE, 2008). Em seguida, foram realizadas as diluições para os meios adequados para cada microrganismo.

Isolamento bacteriano

O isolamento de *Klebsiella* spp e *Escherichia coli* foi realizado no Laboratório de Inspeção e Tecnologia de Leite e Derivados da UFCG/Patos-PB utilizando o ágar MacConkey (Merck) e o ágar Eosina Azul de Metileno (EMB), respectivamente, a 37°C por 48h horas por superfície (APHA, 2001; Pinto, 2004). As colônias típicas foram submetidas à identificação por espectrometria de massa (MALDI-TOF MS) na Universidade de São Paulo, campus Pirassununga, no Laboratório QUALILEITE de acordo com o protocolo de Barcelos *et al.* (2019).

Determinação do perfil de suscetibilidade a antimicrobianos

O perfil de resistência antimicrobiana dos isolados foi determinado pelo método de disco difusão. Os antimicrobianos testados foram ampicilina (10 µg), amoxicilina/ácido clavulânico (30 µg), cefalotina (30 µg), ceftazidima (30 µg), cloranfenicol (30 µg), gentamicina (10 µg), meropenem (10 µg), norfloxacina (10 µg), sulfametoxazol/trimetoprim (25 µg) e tetraciclina (30 µg) seguindo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI) (2020).

β-lactamases de espectro ampliado (ESBL)

A identificação de ESBL foi realizada pelo método de aproximação em discos. Os inóculos foram semeados em placas contendo agar Mueller Hinton, segundo as normas do CLSI (2020), com adição dos discos de: amoxicilina/ácido clavulânico (10 µg), aztreonam (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefotaxima (30 µg) e cefepime (30 µg) (Laborclin) e incubadas à 37°C por 24-48 horas. Os inóculos foram considerados produtores de ESBL quando ocorreu o aumento do diâmetro do halo de inibição de β-lactâmico em direção ao disco de amoxicilina/ácido clavulânico ou o aparecimento da zona fantasma (CLSI, 2020).

Amplificação por PCR de genes de integrase e cassetes de genes

A extração do DNA genômico dos isolados de *Klebsiella* spp e *Escherichia coli* foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular do Semiárido na UFCG/Patos-PB utilizando o Kit Dneasy Blood and Tissue (Qiagen, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante.

A subsistência dos integrons 1, 2 e 3 e da região variável das classes 1 e 2 foram avaliadas através da reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex com os primers (Quadro 1) e metodologia descritos por Rizk e El-Mahdy (2017).

Quadro 1. Gene, sequência dos primers e tamanho do amplicon em pares de base (pb)

GENE	SEQUÊNCIA DOS PRIMERS	Tamanho do amplicon em pares de base (pb)
<i>Int1</i>		
F	GGTCAAGGATCTGGATTTTCG	436 bp
R	ACATGCGTGTAATCATCGTC	
<i>Int2</i>		
F	CACGGATATGCGACAAAAGG	788 bp
R	TGTAGCAAACGAGTGACGAAATG	
<i>Int3</i>		
F	AGTGGGTGGCGAATGAGTG	600 bp
R	TGTTCTTGTATCGGCAGGTG	
5'CS	GGCATCCAAGCAGCAAG	Variável
3'CS	AAGCAGACTTGACCTGA	
attI2-F	GACGGCATGCACGATTTGTA	Variável
orfX-R	GATGCCATCGCAAGTACGAG	

Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP)

Para avliar se os cassetes gênicos dos diferentes isolados eram idênticos, os produtos da PCR foram purificados e digeridos com *HinfI* (CutSmart, New England Biolabs), seguindo a metodologia descrita por Rizk e El-Mahdy (2017). A reação de digestão foi composta por 3 µl dos produtos de PCR purificados em uma mistura de reação de 50 µl contendo 1 µl de *HinfI*, 5 µl de Tampão 10X NE e 41 µl de água destilada deionizada e incubado à 37°C por 15 minutos.

Resultados

Isolados bacterianos e suscetibilidade aos antimicrobianos

A partir das amostras coletadas da mão do manipulador, do tanque de pasteurização, do tanque de recepção, da embalagem, da embaladeira, do leite *in natura* e do leite pasteurizado, foram obtidos 13 e 14 isolados de *Klebsiella* spp e de *Escherichia coli*, respectivamente.

Na tabela 1, verifica-se o percentual da resistência antimicrobiana. Das 27 cepas avaliadas 51,8% (14/27) foram resistentes a, pelo menos, três ou mais classes de antimicrobianos (aminoglicosídeos, quinolonas, cefalosporinas, penicilinas, tetraciclina, sulfonamidas e carbapenêmicos). Entre os isolados de *Klebsiella* spp., 38,4% (5/13) apresentaram resistência a três ou mais classes de antimicrobianos, sendo que 92,3% (12/13) dos isolados foram resistentes à cefalotina, entre eles uma amostra de *K. oxytoca*. Os antimicrobianos que foram mais eficazes contra *Klebsiella* spp foram cloranfenicol e gentamicina ambos com 7,69% (1/13) de resistência. Com relação à *E. coli*, 64,2% das amostras (9/14) avaliadas apresentaram resistência a, pelo menos três ou mais classes de antimicrobianos. A tetraciclina, ampicilina e a cefalotina apresentaram os maiores percentuais de resistência com 48,1% (13), 66,6% (18) e 77,7% (21). Ainda de acordo com a tabela 1,

verifica-se que o antimicrobiano mais eficaz contra os isolados foi o cloranfenicol com apenas uma amostra resistente de *Klebsiella* spp e nenhuma amostra resistente de *E. coli*.

Tabela 1- Perfil de resistência antimicrobiana de *Klebsiella* spp. e *Escherichia coli* isoladas de unidades de beneficiamento de leite de cabra do Cariri paraibano.

Agentes antimicrobianos	Nº (%) dos isolados resistentes		
	<i>Klebsiella</i> spp (13)	<i>E. coli</i> (14)	Total (27)
Ampicilina	11 (84,1)	7 (50,0)	18 (66,6)
Amoxicilina/ácido clavulânico	5 (38,4)	3 (21,4)	8 (29,6)
Cefalotina	12 (92,3)	9 (64,2)	21 (77,7)
Ceftazidina	2 (15,3)	3 (21,4)	5 (18,5)
Cloranfenicol	1 (7,69)	-	1 (3,70)
Gentamicina	1 (7,69)	5 (35,7)	6 (22,2)
Meropenem	2 (15,3)	4 (28,5)	6 (22,2)
Norfloxacina	1 (7,69)	2 (14,2)	3 (11,1)
Sulfametoxazol/trimetropin	5 (38,4)	2 (14,2)	7 (25,9)
Tetraciclina	4 (30,7)	9 (64,2)	13 (48,1)

De acordo com a tabela 2, *E. coli* foi isolada apenas no leite *in natura* e leite pasteurizado demonstrando uma contaminação cruzada. *Klebsiella* spp foi isolada do tanque de recepção, do tanque de pasteurização, da embalagem, da mão do manipulador, do leite *in natura* e do leite pasteurizado.

Detecção dos integrons e caracterização dos genes cassetes por PCR

Os isolados que apresentaram resistência a várias classes de antimicrobianos foram submetidos à identificação dos genes das classes de integrons por PCR multiplex. Não houve amplificação dos genes *IntI1*, *IntI2* e *IntI3*. Por outro lado, a região cassette dos integrons foi amplificada em 11,1% dos isolados (3/27), sendo 15,3% (2/13) de *E. coli* e 7,14% (1/14) de *K. pneumoniae* (Tabela 2). Observou-se a presença de integrons em *E. coli* no leite *in natura*.

Detecção de ESBL:

A ESBL foi identificada nos isolados de *Klebsiella* spp e *E. coli*. Na *Klebsiella* spp, a ESBL apresentou com 30,76 (4/13) dos, já *E. coli* com 42,85 (6/14). *Klebsiella* spp com fenótipo de ESBL estava presente no leite pasteurizado, leite *in natura* e na embalagem. *E. coli* foi encontrado apenas no leite *in natura*.

Ainda de acordo com a tabela 2, observa-se que 37% (10/27) dos isolados resistentes aos antimicrobianos apresentaram fenótipos para ESBL. A presença de ESBL foi observada nos isolados provenientes do leite *in natura*, leite pasteurizado e na embalagem.

Tabela 2. Perfil de resistência antimicrobiana, presença de integrons e de ESBL em *Klebsiella* spp e *E. coli* isoladas de unidades de beneficiamento de leite de cabra do estado da Paraíba, durante o período de janeiro a fevereiro de 2019.

Isolados	Perfil de resistência antimicrobiana	Origem das amostras	Presença dos integrons	Presença de ESBL
1- <i>K. pneumoniae</i>	AMP, AMC, CFL, SUT, TET	Leite pasteurizado	-	+
47- <i>K. pneumoniae</i>	AMP, CFL, CAZ	Embalagem	-	-
48- <i>K pneumoniae</i>	CFL	Leite <i>in natura</i>	-	+
49- <i>Kpneumoniae</i>	AMP, CFL, SUT	Leite <i>in natura</i>	-	+
76- <i>K pneumoniae</i>	AMP, AMC, CFL, TET	Leite pasteurizado	-	-
21- <i>K pneumoniae</i>	AMP, CFL, CAZ, GEN, MPM, NOR, SUT	Leite pasteurizado	-	-
27- <i>K. oxytoca</i>	AMP, CFL	Leite <i>in natura</i>	-	-
28- <i>K penumoniae</i>	AMP, AMC, CFL, MPM	Tanque de recepção	+	-
50- <i>K pneumoniae</i>	AMP, AMC, CFL	Mão do manipulador	-	-
38- <i>K pneumoniae</i>	AMP, CFL, SUT, TET	Leite <i>in natura</i>	-	-
36- <i>K pneumoniae</i>	CFL	Embalagem	-	+
68- <i>K pneumoniae</i>	AMP, AMC, CFL, CLO, SUT, TET	Tanque de pasteurização	-	-
72- <i>K pneumoniae</i>	AMP	Leite pasteurizado	-	-
3- <i>E. coli</i>	CAZ, MPM	Leite <i>in natura</i>	-	-
18- <i>E coli</i>	AMP, CFL. TET	Leite <i>in natura</i>	-	-

19- <i>E. coli</i>	AMP, TET	Leite in natura	-	-
6- <i>E. coli</i>	AMP, CFL, TET	Leite in natura	-	+
75- <i>E. coli</i>	-	Leite in natura	-	-
62- <i>E. coli</i>	AMP, GEN, MPM, SUT, TET	Leite pasteurizado	-	-
24- <i>E. coli</i>	CFL, CAZ, GEN, TET	Leite <i>in natura</i>	-	+
15- <i>E. coli</i>	-	Leite <i>in natura</i>	-	-
16- <i>E. coli</i>	AMP, AMC, CFL, TET	Leite <i>in natura</i>	-	-
32- <i>E. coli</i>	CFL, GEN, MPM, TET	Leite <i>in natura</i>	+	+
33- <i>E. coli</i>	CFL, GEN, NOR	Leite <i>in natura</i>	-	+
34- <i>E. coli</i>	AMP, AMC, CFL, TET	Leite <i>in natura</i>	-	+
77- <i>E. coli</i>	CFL, SUT	Leite pasteurizado	-	+
231- <i>E. coli</i>	AMP, AMC, CFL, CAZ, GEN, MPM, NOR, TET	Leite <i>in natura</i>	+	-

-: ausência de resistência; AMP: Ampicilina, AMC: Amoxicilina+ác. clavunânico, CFL: Cefalotina, CAZ: Ceftazidina, CLO: Cloranfenicol, GEN: Gentamicina, MPM:

Meropenen, NOR: Norfloxacin, SUT: Sulfametoxazol+trimetoprim, TET: Tetraciclina

Discussão

Os alimentos de origem animal são pontos finais na disseminação, seleção e dispersão de bactérias resistentes a antimicrobianos e de genes de resistência. O uso extensivo de antimicrobianos na agricultura para promoção do crescimento e prevenção de doenças em animais tem impacto na disseminação de genes de resistência entre bactérias, resultando em pacientes com doenças não tratáveis (Thamer *et al.* 2016; Watkins *et al.* 2016) e essa resistência tem se refletido no leite e seus derivados (Carvalho *et al.* 2018; Silva *et al.* 2019; Siqueira *et al.* 2022), tornando risco potencial para a população.

Nas bactérias isoladas de unidades de beneficiamento que processam leite caprino participantes desse estudo, observou-se um maior perfil de resistência à cefalotina, ampicilina e tetraciclina que pode ser resultado do maior uso desses antimicrobianos na sanidade dos animais leiteiras.

Esses dados corroboram com os dados de Ombarak *et al.* (2018), que encontraram 61% das bactérias isoladas de leite e queijo com resistência à tetraciclina e 42% à ampicilina. Chen *et al.* (2017), Ombarak *et al.* (2018) e Hassen *et al.* (2019) também observaram que a *E. coli* foi mais resistente à tetraciclina. Já Silva *et al.*, (2019) verificou uma maior eficiência da tetraciclina nos isolados de leite cru.

O percentual de resistência a tetraciclina, ampicilina e cefalotina que são drogas pertencentes a diferentes classes torna este fator preocupante em uma atividade leiteira de grande impacto para a região. Além das classes anteriormente citadas, observou-se que a *Klebsiella spp* e *E. coli* foram resistentes a outras classes de antimicrobianos como sulfametoxazol/trimetropin muito utilizados na agropecuária no tratamento das mais diversas infecções.

Neste estudo, obteve-se resistência de cepas de *E. coli*, ao meropenem, cefalosporina de 4ª geração (carbapenêmicos). A resistência de microrganismos na cadeia produtiva de leite

cabra resistentes aos carbapenêmicos (meropenem) pode ser resultado de uma contaminação cruzada uma transmissão homem-animal, tornando estes resultados preocupantes do ponto de vista de saúde pública. Os carbapenêmicos são drogas de última instância, portanto, seu uso inadequado leva à produção de enzimas β -lactamases contra esse antimicrobiano, denominadas de carbapenemases (NORDMANN *et al.* 2011; HARRIS *et al.* 2015).

A resistência aos antimicrobianos está intrinsicamente associada ao seu uso de forma indiscriminada, que pode acarretar na disseminação de bactérias resistentes comprometendo a cura de doenças infecciosas e com impacto na saúde pública mundial. Na maioria dos países em desenvolvimento, o baixo custo, a disponibilidade de antimicrobianos e a falta de orientações técnicas sobre o uso adequado do fármaco são as principais razões para seu amplo uso.

Quanto a resistência genotípica, estava presente em diversas amostras em especial no leite *in natura* que é resultado provavelmente devido a práticas adotadas pelos produtores na administração de fármacos sem orientações técnicas.

Klebsiella spp apresentou genes de integrons no tanque de recepção e pode ser resultado de falhas na sanitização dos equipamentos ou mesmo uma contaminação cruzada dos manipuladores já que nesse tanque a higienização é feito pelo manipulador e não pelo sistema Cleaning in place (CIP), já *E. coli* estava presente no leite *in natura*, que torna as práticas sanitárias adotadas com esse animal de grande importância na veiculação de microrganismos resistentes para o leite.

Os integrons são responsáveis pela introdução de cassetes de genes de resistência, sendo a principal causa para o desenvolvimento de resistência a antibióticos entre isolados clínicos (Hall e Collis, 1998; Ochman *et al.* 2000; Ploy *et al.* 2000; Maynard *et al.* 2004), havendo sido demonstrado por alguns estudos que há correlação entre a resistência bacteriana e a presença de íntegrons (Fluit Schmitz, 2004 e Leverstein 2003; Lee e Yonn, 2022). Com

relação ao percentual de genes dos integrons amplificados nas *Enterobacterales* isoladas nas unidades de beneficiamento de leite caprino, 7,40% (2/14) foram amplificados em *E. coli* e 3,70% (1/13) em *Klebsiella* spp. Os integrons apresentam cinco classes. O integron da classe 1 é a classe de integrons mais onipresente em bactéria entéricas, incluindo patógenos comuns como *E. coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia* e outras doenças causado por *Proteus*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Serratia* (Goldstein *et al.* 2001). Não houve amplificação para os genes *ntI1*, *IntI2* e *IntI3*. Por outro lado, a região cassette dos integrons foi amplificada em 11,1% dos isolados, o que demonstra a sua presença em bactérias contaminantes de leite caprino, que, além de torná-lo inadequado para consumo, poderá comprometer o tratamento de pessoas acometidas por DVAs.

A prevalência de amostras que apresentaram genes de íntegros foi baixa quando comparamos com outros estudos (Rizk e El-Mahdy 2017; Chen *et al.* 2017), mas sua importância se deve as características que os integrons possuem no poder de disseminação do clone entre os isolados (Rizk e El-Mahdy 2017) e isso pode agravar a resistência.

Quanto as ESBL, estava presente em vários isolados, mas em apenas uma amostra houve amplificação de genes de integrons e a ESBL. Tradicionalmente, os isolados produtores de ESBL principalmente blaTEM e produtores de blaSHV, exibem corresponsabilidade a aminoglicosídeos, tetraciclina e sulfonamidas (Morosini *et al.*, (2006), corroborando com os dados desta pesquisa onde as amostras produtoras de ESBL foram resistentes a esses antimicrobianos. Neste estudo, observou-se que 37% (10/27) dos isolados resistentes aos antimicrobianos apresentaram fenótipos para ESBL.

As β -lactamases de espectro estendido são enzimas reconhecidas por sua capacidade de fornecer resistência à cefotaxima, ceftazidima e outras cefalosporinas de amplo espectro e a monobactâmicos, bem como a antimicrobianos β -lactâmicos mais antigos (Jacoby e Carreras, 1990).

Estudo mais recente sobre genes de ESBL demonstrou que tais genes foram localizados em integrons. Assim sendo, os genes de ESBL podem ser localizados em integrons e facilmente transferidos para diversas bactérias (Hadizadeh *et al.* 2017), o que pode ter levado a identificação fenotípica de ESBL nos isolados do leite de cabra, pois muitas amostras apresentaram resistência aos β -lactâmicos, tornando este alimento um veiculador final de genes de resistência a população.

Conclusão

A presença de genes de integrons e ESBL em *Klebsiella* spp e *E. coli* provenientes de unidades de beneficiamento de leite de cabra demonstra um risco potencial deste alimento na disseminação de bactérias multirresistentes da ordem *Enterobacteriales*, o que é preocupante uma vez que o produto é destinado ao Programa Alimenta Brasil (PAB), como parte do combate a insegurança alimentar.

Agradecimentos:

À CAPES pela concessão da bolsa de pós-graduação.

Conflito de Interesses:

Os autores declaram que não há conflito de interesses.

Referências

- Allen, H., Donato, J.; Wang, K. H.; Cloud-Hansen, K. A.; Davies, J.; Handelsman, J (2010). *Focus on antimicrobial resistance*. 8, 251.
- American Public Health Association - APHA. (2001) Committee on Microbiological Methods for Foods. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. 4. ed. Washington, 676.

- Andrade, N. J. (2008). Higiene na indústria de Alimentos: Avaliação e controle da adesão e formação de biofilmes bacterianos. *Varela*.
- Barcelos, M. M., Martins, L., Grenfell, R. C., Juliano, L., Anderson, K. L., Santos, M. V., Gonçalves, J. L. (2019) Comparison of standard and on-plate extraction protocols for identification of mastitis-causing bacteria by MALDI-TOF MS. *Braz Journal Microbiol.* 50, 849–857.
- Barraud, O., and Ploy, M-C. (2015) Diversity of class 1 integron gene cassette rearrangements selected under antibiotic pressure. *J. Bacteriol.* 197, 2171–2178
- Bengtsson-Palme, J. et al. (2017) Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 42, 053.
- Blair S. Nield, Andrew J. Holmes, Michael R. Gillings, Gavin D. Recchia, Bridget C. Mabbutt, K. M. Helena Nevalainen, Harold W. Stokes (2001) Recovery of new integron classes from environmental DNA. *FEMS Microbiology Letters*, 195, 59-65.
- Carvalho, A. S. S., Serra, J. L., Rorigues, L. C., Júnior, L. S. R., Mouchres, A. N., Ferreira, E. M (2018) Susceptibilidade de *Staphylococcus aureus* isolados de leite cru a antibióticos comerciais. *Medicina Veterinária. Ciênc Anim, bras.* 19.
- Cergole-Novella MC, Pignatari AC, Castanheira M, Guth B.E (2011). Molecular typing of antimicrobial-resistant Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains (STEC) in Brazil. *Res Microbiol.* 162, 117–123.

Cheng, G.; Dai, M.; Ahmed, S.; Hao, H.; Wang, X.; Yuan, Z (2016) Fármacos Antimicrobianos no Combate à Resistência Antimicrobiana. Frente. *Microbiol.*

Chen, C-M., Ke, S-C., Li, C-R., Wu, Y., Chen, T-H., Lai, C-H., Wu, X-X., Wu, L.T (2017). High Diversity of Antimicrobial Resistance Genes, Class 1 Integrons, and Genotypes of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* in Beef Carcasses. *Microbial Drug Resistance* 00.

Chunfeng R, Yongjing Z, Yan S (2013). Analysis of the effect of integrons on drug-resistant *Staphylococcus aureus* by multiplex PCR detection. *Mol Med Rep*, 7, 719-724.

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (2020). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 30th ed.

Donnenberg, V.S, Donnenberg, A.D (2005). Multiple Drug Resistance in Cancer Revisited: The 450 Cancer Stem Cell Hypothesis. *J Clin Pharmacol.* 45, 872-7.

Ding. J, Zhuochang Chen. Z, Li. Y, Zhang. Q, Li X (2019). Detection of integrons in *Escherichia coli* producing plasmid-mediated AmpC, β -lactamases. *Inst. J. Clin. Exp. Med.* 12, 1690-1696.

Farshad S, Japoni A, Hosseini M (2008). Low distribution of integrons among multidrug resistant *E. coli* strains isolated from children with community-acquired urinary tract infections in Shiraz, Iran. *Pol J Microbiol.* 57, 193- 8.

Fluit AC, Schmitz F.J (2004). Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect.*10: 272–288. DOI: 10.1111/j.1198-743X.2004.00858.x

Goldstein C, Lee MD, Sanchez S, Hudson C, Phillips B, Register B (2001). Incidence of 479 Class 1 and 2 Integrases in Clinical and Commensal Bacteria from Livestock, Companion 480 Animals, and Exotics. *Antimicrob Agents Chemother.* 45, 723-6.

Guerin E, Cambray G, Sanchez-Alberola N, Campoy S, Erill I, Da Re S (2009). The SOS response controls integron recombination. *Science*. 324, 1034.

Hadizadeh M, Norouzi A, Taghadosi R, Mohebi S, Mohammadi M, Hasanzadeh A (2017).. Prevalence of qnr, intI, and intII genes in extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from clinical samples in Iran. *Trop J Pharm Res*. 16, 141-7.

Hall, H. M. C.M. Collis (1998). Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. *Drug Resist Updat* 1, 109-119.

Harris, P.N. Tambyah, P.A., Paterson, D.L (2015). β -lactam and β -lactamase inhibitor combinations in the treatment of extended-spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae: time for a reappraisal in the era of few antibiotic options? *Lancet. Infect. Dis*. 15, 475-485.

Hassen, B. Saloura, B. Abbassi, M. S. Ruiz-Ripa, L. Mama, M. Hassen, A. Hammam, S. Torres, C. (2019). *mcr -1* codificando resistência à colistina em isolados de *Escherichia coli* produtores de CTX-M-1/CTX-M-15 de origem bovina e caprina na Tunísia. Primeiro relato de CTX-M-15-ST394/D *E. coli* de cabras. *Imunologia Comparada, Microbiologia e Doenças Infeciosas*. 67 , 101-366.

Karuniawati A, Saharman Y. R, Lestari D.C (2013). Detection of carbapenemase encoding genes in enterobacteriace, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* isolated

from patients at intensive Care Unit Cipto Mangunkusumo Hospital in 2011. *Acta Med Indones.* 45, 101-106.

Jacoby, G. A., Carreras I (1990). Activities of β -lactam antibiotics against *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 34, 858–862.

Lee, Y. J., Yoon, S., (2022). Molecular characteristics of *Escherichia coli* from bulk tank milk in Korea. *J Vet Sci.* 23.

Leverstein, M. A., Blok H. E. M., Donders A. R. T., Paauw, A., Fluit. A.C., Verhoef, J., (2003). Multidrug resistance among Enterobacteriaceae is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. *J Infect Dis* 187, 251-259. DOI:10.1086/345880

Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C.G., (2012) Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 18, 268 - 281.

Maynard, C., Bekal, S., Sanschagrín, F., Levesque, R. C., Brousseau, R., Masson, L., Larivière, S., Harel, J. (2004). Heterogeneity among virulence antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5444 a 5452.

Morosini, M. I., Castillo, M. G., Coque, T. M., Valverde, A., Novais, A., Loza, E (2006) Antibiotic coresistance in extended-spectrum-lactamase-producing Enterobacteriaceae and in vitro activity of tigecycline. *Antimicrob Agents Chemother.* 50, 2695-2699.

Nordmann, P., Naas. T., Poirel, L., (2011). Global spread of Carbapenemase-production Enterobacteriaceae. *17*, 1791-1798.

Ochman, H. E.A., Lawrence, J. G., Groisman (2000). Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation, *Nature* 405, 299 a 304.

Ombarak, R. A., Hinenoya, A., Elbagory, A-R. M., Yamasaki, S., (2018). Prevalence and Molecular Characterization of Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Raw Milk and Raw Milk Cheese in Egypt. *Journal of Food Protection*. 81, 226–232.

Padua, F. S., Couto, E. P., Nero, L. A., & Ferreira, M. A., (2019). Qualidade físico-química e microbiológica de leite de cabra produzido no Distrito Federal. *Ciência Animal Brasileira*, 20, 1-9.

Pinto, U, M., Cardoso, R, R., Vanetti, M, C, D. (2004). Detecção de *Listeria*, *Salmonella* e *Klebsiella* em serviço de alimentação hospitalar. *Rev. de Nutr.* 17, 319-326.

Pires, B. A. D., Oliveira, J. W. S., Silva, C. R., Abrantes, S. M. P., Marin, V. A., (2019). Resistência antimicrobiana em cepas de *Escherichia coli* isoladas de queijo Minas Frescal no município do Rio de Janeiro – Perfil fenotípico e genotípico. *Vigilância Sanitária em Debate, INCQS-FIOCRUZ*, 7, 86-91.

Ploy, M. T. Lambert, A. Gassama, F. Denis (2000). The role of integrons in dissemination of antibiotic resistance, *Ann. Biol. Clin. Paris*. 58, 439 a 444.

Rizk, D. E., El-Mahdy, A. M (2017). Emergence of class 1 to 3 integrons among members of Enterobacteriaceae in Egypt. *Microbial Pathogenesis* 112, 50 a 56

Siqueira, I. N., Cavalcanti, A. A. C., Souza, J. G., Medeiros, F. J. P., Taveira, J. C. Garcia, S. F., Soares, C. M., Oliveira, S. C. P. L., Filho, A. A. O., Melo, M. A., (2021). Evaluation of Sanitary quality of goat milk in dairy industries from the Cariri region, state of Paraíba. *Research, Society and Development*, 10.

Siqueira, I. N., Cavalcanti, A. A. C., Sousa, D. L. C., Aquino, V. V. F., Oliveira, L. B. S., Silva, J. G., Santos, C. S. A. B., Mota, R. A., Filho, A. A. O., Melo, M. A., (2022). Isolamento e perfil de resistência antimicrobiana de *Enterococcus* spp em linhas de processamento de leite de cabra. *Research, Society and Development*, 11.

Silva, R. T., Lopes, J. B. A., Oliveira, K. L. L., Júnior, J. C. R., Beloti, V., (2019). Perfil de sensibilidade a antimicrobianos de bactérias patogênicas humanas isoladas de leite cru. *Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes*, 74, 185-194.

Soufi, L. Y., Sa'enz, L., Vinue, M. S., Abbassi, E., Ruiz, M., Zarazaga, A. B., Hassen, S., Hammami, and C. Torres (2011). Escherichia coli of poultry food origin as reservoir of sulphonamide resistance genes and integrons. *Int. J. Food Microbiol.* 144, 497–502

Thanner, S., Drissner, D., & Walsh, F. (2016). Antimicrobial Resistance in Agriculture. *MBio*, 7.

Van, T. T. H. J., Chin, T., Chapman, L. T., Tran, and P. J. Coloe. (2008). Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of Escherichia coli isolations for antibiotic resistance and virulence genes. *Int. J. Food Microbiol.* 124, 217–223.

Watkins, R. R. Smith, T. C. Bonomo, R. A. (2016). On the path to untreatable infections: colistin use in agriculture and the end of 'last resort' antibiotics, *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 9, 785-788.

Xi, M., Feng, Y., Li, Q., Yang, Q., Zhang, B., Li, G., Shi, C., Xia, X., (2015). Prevalence, distribution, and diversity of *Escherichia coli* in plants manufacturing goat milk powder in Shaanxi, China. *Journal of Dairy Science*, 98, 4.

Resumo gráfico:

Tabela 1- Perfil de resistência antimicrobiana de *Klebsiella* spp. e *Escherichia coli* isoladas de unidades de beneficiamento de leite de cabra do Cariri paraibano.

Agentes antimicrobianos	Nº (%) dos isolados resistentes		
	<i>Klebsiella</i> spp (13)	<i>E. coli</i> (14)	Total (27)
Ampicilina	11 (84,1)	7 (50,0)	18 (66,6)
Amoxicilina/ácido clavulânico	5 (38,4)	3 (21,4)	8 (29,6)
Cefalotina	12 (92,3)	9 (64,2)	21 (77,7)
Ceftazidina	2 (15,3)	3 (21,4)	5 (18,5)
Cloranfenicol	1 (7,69)	-	1 (3,70)
Gentamicina	1 (7,69)	5 (35,7)	6 (22,2)
Meropenem	2 (15,3)	4 (28,5)	6 (22,2)
Norfloxacina	1 (7,69)	2 (14,2)	3 (11,1)
Sulfametoxazol/trimetropin	5 (38,4)	2 (14,2)	7 (25,9)
Tetraciclina	4 (30,7)	9 (64,2)	13 (48,1)

CONCLUSÃO GERAL:

Os resultados obtidos no presente trabalho de tese possibilitam concluir que:

- A) Foi possível verificar a contaminação do leite de cabra, antes e após o seu beneficiamento, em unidades de beneficiamento de leite cabra no Estado da Paraíba com o envolvimento de patógenos previamente descritos na literatura como causadores de Doenças Veiculadas pelos Alimentos (DVAs);
- B) Prováveis falhas nos procedimentos de higienização e a contaminação cruzada do leite processado pode ter permitido a colonização e proliferação de vários microrganismos, em especial da família *Enterobacterales*, com destaque para *Klebsiella* sp, *Escherichia coli* e *Enterobacter* spp.;

- C) Microrganismos isolados foram capazes de formar biofilmes e apresentaram características fenotípicas e genotípicas de resistência a antimicrobianos, tornando-os resistentes à ação dos sanitizantes e, a possibilidade de desprendimento, pode causar a contaminação de um alimento que será fornecido e ingerido, principalmente, por indivíduos vulneráveis que fazem parte do Programa Alimenta Brasil;
- D) Isolados de *Klebsiella* spp e *Escherichia coli* apresentaram perfil de resistência a várias classes de antimicrobianos, entre eles antimicrobianos de quarta geração e que não são utilizados no tratamento de pequenos ruminantes;
- E) Quanto aos genes de resistência, este é o primeiro relato da presença de integrons e fenótipos de ESBL no ambiente de processamento e no leite de cabra, tornando este alimento uma via de disseminação de resistência bacteriana;
- F) Torna-se imprescindível a implantação de medidas que visem a) a orientação dos envolvidos na produção e beneficiamento do leite; b) ajustes na higienização e sanitização dos equipamentos; c) orientações quanto à higienização das mãos dos funcionários envolvidos com a manipulação do leite e e) melhor fiscalização da Vigilância Sanitária Estadual.