

**LEANDRO PARUSSOLO**

**DETECÇÃO DE FATORES DE VIRULÊNCIA E DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE  
SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *Escherichia coli* E *Listeria  
monocytogenes* ISOLADAS DE QUEIJO ARTESANAL SERRANO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Orientadora: Sandra Maria Ferraz

**LAGES  
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com  
auxílio do programa de geração automática da  
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC

Parussolo, Leandro

Detecção de fatores de virulência e determinação  
do perfil de susceptibilidade antimicrobiana de  
Escherichia coli e Listeria monocytogenes isoladas  
de queijo artesanal serrano / Leandro Parussolo. -  
Lages , 2018.

102 p.

Orientador: Sandra Maria Ferraz

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias,  
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages,  
2018.

1. Produtos lácteos. 2. Genes de virulência. 3.  
Multirresistência. 4. ESBL. I. Ferraz, Sandra  
Maria. II. Universidade do Estado de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação. III. Título.

**LEANDRO PARUSSOLO**  
**DETECÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA E DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE**  
**SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *Escherichia coli* E *Listeria***  
***monocytogenes* ISOLADOS DE QUEIJO ARTESANAL SERRANO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

**Banca examinadora:**

Orientadora:

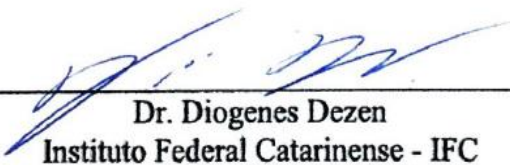


\_\_\_\_\_  
Dra. Sandra Maria Ferraz  
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Membros:




\_\_\_\_\_  
Dra. Karine Pires  
Instituto Federal de Santa Catarina - IFSC



\_\_\_\_\_  
Dr. Diogenes Dezen  
Instituto Federal Catarinense - IFC



\_\_\_\_\_  
Dr. Ubirajara Maciel da Costa  
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC



\_\_\_\_\_  
Dra. Eliana Knackfuss Vaz  
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Lages, 07 de Junho de 2018



## AGRADECIMENTOS

A elaboração desse trabalho não seria possível sem a colaboração, estímulo e empenho de diversas pessoas. Gostaria de expressar a minha gratidão e apreço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta tarefa se tornasse realidade.

A Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para enfrentar os problemas, as dificuldades e seguir em frente com os meus objetivos.

Aos meus pais, Maria Fernandes Parussolo e Celeste Parussolo, por serem modelos de coragem, pelo amor incondicional, apoio, incentivo, paciência e carinho dedicados ao longo de todas as etapas da minha vida.

À minha orientadora, Sandra Maria Ferraz, que admiro muito como pessoa e profissional e que além de me orientar, me apoiou diante das adversidades encontradas ao longo desta trajetória.

Aos meus amigos, Giovanni, Tiago, Elaine, Karine, Danilo, Rogério, Alexandre, João, Rosineide, Rosana, Patrícia, Douglas, Fábio, Cristielen, Lisandra, Giliane e Luciane que nunca estiveram ausentes, me fizeram rir nos momentos de tensão, me apoiaram, ouviram e aconselharam, sempre com muito bom humor e carinho.

À equipe de Biologia do IFSC, Eduardo, Karine, Leônidas, Marcelo e Marília, que além da amizade e carinho, me apoiaram e auxiliaram ao longo dessa etapa.

Ao Instituto Federal de Santa Catarina por conceder o afastamento das atividades de trabalho para concluir essa etapa que foi muito importante em minha vida.

À minha amiga Pedrina, que além de me apoiar em toda essa trajetória, dedicou seu tempo na tradução dos manuscritos para a língua inglesa.

Ao meu amigo Ricardo, um “anjo” que conheci no doutorado. Além de ser um amigo para todas as horas, me ajudou em todas as etapas do doutorado, me recebeu todas as semanas em sua casa, me ensinou e auxiliou na execução desse trabalho. Muito obrigado, você é uma pessoa incrível.

A todos do CEDIMA, especialmente Cláudia, Fernanda, Giseli, Karine, Ricardo e Rosane, pela ajuda na realização desse trabalho, pela parceria, conversas, desabafos e muitas risadas. Muito obrigado por essa amável convivência.



“O mundo está nas mãos daqueles que têm a coragem de sonhar e de correr o risco de viver seus sonhos.” (Paulo Coelho)





## RESUMO

O queijo artesanal serrano é um produto típico da região sul do Brasil e se caracteriza por ser produzido a partir de leite cru, em propriedades rurais. A contaminação desse alimento por *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* assume grande relevância para a saúde pública, pois oferece risco a saúde dos consumidores. O objetivo desse estudo foi investigar a presença de genes de virulência e traçar o perfil de susceptibilidade de *E. coli* e *L. monocytogenes* aos antimicrobianos, bem como verificar a potencial capacidade de formação de biofilme de *E. coli* isolados de leite cru e queijo artesanal serrano produzidos no estado de Santa Catarina, região sul do Brasil. Um total de 117 isolados de *E. coli* e 9 de *L. monocytogenes* (sorotipos 1/2b e 4b) foram caracterizadas por meio de reações de PCR para detecção dos seguintes genes de virulência: *eae* para *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *lt* e *st* para *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *stx* para *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *ipaH* para *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *aggR* para *E. coli* enteroagregativa (EAEC) e *hly*, *inlA*, *inlC*, *inlJ*, *actA*, *plcB* e *iap* para *L. monocytogenes*. O perfil de susceptibilidade de *E. coli* e *L. monocytogenes* à 23 e 12 antimicrobianos, respectivamente, foi determinado fenotipicamente por meio da técnica de disco difusão e a busca de isolados de *E. coli* produtores de Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e carbapenemase foram realizadas genotipicamente pela detecção dos genes *Bla*<sub>TEM</sub>, *Bla*<sub>SHV</sub>, *Bla*<sub>OXA</sub>, *Bla*<sub>CTX-M</sub> para ESBL e *Bla*<sub>OXA-48</sub> para carbapenemase. Adicionalmente, a potencial capacidade dos isolados de *E. coli* em produzir biofilme foi determinada pela técnica do ágar vermelho Congo. Os genes de virulência de *E. coli* foram identificados em 21,36% dos isolados testados, que foram classificados em EPEC (patótipo mais prevalente), ETEC ou EAEC. Dez (8,55%) dos isolados de *E. coli*, apresentaram perfil de multirresistência, enquanto que quatro (3,41%) foram classificados como produtores de ESBL, sendo identificado o gene *Bla*<sub>TEM</sub>. Nenhum isolado foi classificado como produtor de carbapenemase e 67,52% foram considerados potenciais produtores de biofilme. Todos os isolados de *L. monocytogenes* apresentaram os genes *hly* e *plcB*, enquanto que os demais genes (*iap*, *actA*, *inlA*, *inlC* e *inlJ*) foram detectados em oito isolados (88,9%). Verificou-se que todos os isolados foram resistentes à pelo menos um antimicrobiano e 33,3% apresentaram perfil de multirresistência. Esses resultados alertam para um problema de saúde pública, pois o queijo artesanal serrano oferece risco a saúde dos consumidores e evidenciam a necessidade de melhoria e adequações nos processos de fabricação desses produtos, a fim de evitar a disseminação de micro-organismos potencialmente patogênicos.

**Palavras-chave:** Produtos lácteos. Genes de virulência. Multirresistência. ESBL.



## ABSTRACT

The serrano artisanal cheese is a typical product from South region of Brazil and is characterized by being produced from raw milk on rural properties. The contamination of this food by *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* has a great impact on public health, since it could threaten the consumers' health. The aim of this study was to investigate the presence of virulence genes and to define the antimicrobial susceptibility profiles of *E. coli* and *L. monocytogenes*, as well as to verify the potential biofilm formation ability of *E. coli* isolates, recovered from raw milk and serrano artisanal cheese produced in Santa Catarina state, south region of Brazil. A total of 117 isolates of *E. coli* and 9 of *L. monocytogenes* (serotypes 1/2b and 4b) were characterized by PCR to detect the following virulence genes: *eae* for enteropathogenic *E. coli* (EPEC), *lt* and *st* for enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), *stx* for enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), *ipaH* for enteroinvasive *E. coli* (EIEC), *aggR* for enteroaggregative *E. coli* (EAEC) and *hly*, *inlA*, *inlC*, *actA*, *plcB* and *iap* for *L. monocytogenes*. The antimicrobial susceptibility profile of *E. coli* and *L. monocytogenes* to 23 and 12 antimicrobial agents, respectively, was phenotypically performed by disk diffusion method, and we searched of ESBL- producing *E. coli* and/or carbapenemase- producing isolates were genotypically by the detection of the genes *Bla*<sub>TEM</sub>, *Bla*<sub>SHV</sub>, *Bla*<sub>OXA</sub>, *Bla*<sub>CTX-M</sub> for ESBL and *Bla*<sub>OXA-48</sub> for carbapenemase. Additionally, we verified the ability of *E. coli* isolates to potential form biofilm by the Congo red method. Virulence genes of *E. coli* were identified in 21.36% of the tested isolates, which were classified as EPEC (the most prevalent pathotype), ETEC or EAEC. Ten (8.55%) of the total studied *E. coli* isolates revealed a multidrug-resistant profile, since they were resistant to three or more antimicrobial classes; whereas four isolates (3.41%) were classified as ESBL-producers and showed the presence of *Bla*<sub>TEM</sub> gene. None of the isolates exhibited carbapenemase profile and 67.52% of them were considered potential biofilm producers. All isolates exhibited the presence of the genes *hly* and *plcB*, whereas the other genes (*iap*, *actA*, *inlA*, *inlC* and *inlJ*) were only detected in eight isolates (88.9%). All isolates were resistant to at least one antimicrobial agent and 33.3% of them showed multidrug resistance. The results demonstrated the serrano artisanal cheese offers risks to consumers' health and point to a need for improvement and adaptations in the manufacturing process of this food, in order to prevent the dissemination of potentially pathogenic microorganisms.

**Keywords:** Dairy products. Virulence genes. Multi-drug resistance. ESBL.



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
2.1	QUEIJO ARTESANAL SERRANO.....	19
2.2	<i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	20
<b>2.2.1</b>	<b><i>Escherichia coli</i> Enteropatogênica (EPEC).....</b>	<b>20</b>
<b>2.2.2</b>	<b><i>Escherichia coli</i> Entorotoxigênica (ETEC).....</b>	<b>21</b>
<b>2.2.3</b>	<b><i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa (EAEC).....</b>	<b>22</b>
<b>2.2.4</b>	<b><i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica (EHEC).....</b>	<b>23</b>
<b>2.2.5</b>	<b><i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva (EIEC).....</b>	<b>24</b>
<b>2.2.6</b>	<b><i>Escherichia coli</i> diarreio gênicas em alimentos.....</b>	<b>25</b>
2.2.6.1	<i>Escherichia coli</i> diarreio gênicas em leite e produtos lácteos.....	27
<b>2.2.7</b>	<b>Resistência antimicrobiana.....</b>	<b>29</b>
2.2.7.1	<i>Beta-Lactamases de Especto Extendido (ESBL)</i> .....	30
2.2.7.2	<i>Carbapenemases</i> .....	31
<b>2.2.8</b>	<b>Biofilmes.....</b>	<b>32</b>
2.3	<i>LISTERIA MONOCYTOGENES</i> .....	35
<b>2.3.1</b>	<b>Fatores de virulência de <i>L. monocytogenes</i>.....</b>	<b>37</b>
<b>2.3.2</b>	<b><i>Listeria monocytogenes</i> em alimentos.....</b>	<b>38</b>
<b>2.3.3</b>	<b>Resistência antimicrobiana.....</b>	<b>40</b>
<b>3</b>	<b>ARTIGO 1.....</b>	<b>43</b>
3.1	ABSTRACT.....	43
3.2	INTRODUCTION.....	43
3.3	MATERIAL AND METHODS.....	46
3.4	RESULTS AND DISCUSSION.....	51
3.5	CONCLUSION.....	56
3.6	REFERENCES.....	56
<b>4</b>	<b>ARTIGO 2.....</b>	<b>65</b>
4.1	ABSTRACT.....	65
4.2	INTRODUCTION.....	65
4.3	MATERIAL AND METHODS.....	67
4.4	RESULTS AND DISCUSSION.....	69
4.5	CONCLUSIONS.....	72
4.6	REFERENCES.....	72
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>79</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>



## 1 INTRODUÇÃO

O queijo artesanal serrano é um produto tradicional na região Serrana de Santa Catarina, caracterizado por ser fabricado a partir de leite cru proveniente de vacas que recebem alimentação a base de pastagens naturais (PEREIRA et al., 2014). No entanto, a utilização de leite cru associada a condições higiênico-sanitárias precárias pode acarretar a veiculação de micro-organismos potencialmente patogênicos nesse alimento (SOUZA; DALLA ROSA; AYUB, 2003; ZAFFARI et al., 2007). Estudos atuais têm demonstrado altos índices de contaminação microbiana no queijo artesanal serrano produzido em Santa Catarina e dentre os principais micro-organismos detectados, destacam-se *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* (MELO et al., 2013; PONTAROLO et al., 2017).

Algumas cepas de *Escherichia coli* são consideradas comensais, podendo eventualmente causar infecções oportunistas em pessoas debilitadas. Enquanto que cepas patogênicas estão associadas a doenças graves que podem, inclusive, levar a morte. Dentre as linhagens patogênicas (diarreio gênicas) estão inclusas *Escherichia coli* dos seguintes patótipos: enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatogênica (EPEC), enterotoxigênica (ETEC) e enterohemorrágica (EHEC) (FRANCO; LANDGRAF, 2008; TOMA et al., 2003). Uma das formas de identificar isolados de *E. coli* potencialmente patogênicos é por meio da utilização de técnicas moleculares para detectar a presença de genes característicos de cada patótipo, tais como os genes *eae* (EPEC), *stx* (EHEC); *elt* e *est* (ETEC), *ipaH* (EIEC) e *aggR* (EAEC) (TOMA et al., 2003). Vários estudos atuais têm identificado *E. coli* diarreio gênicas isoladas de diferentes tipos de alimentos, inclusive leite e produtos lácteos (CAMPOS et al., 2018; CANIZALEZ-ROMAN et al., 2013; NOBILI et al., 2016; OMBARAK et al., 2016).

Aliado a isso, *E. coli* é um micro-organismo que apresenta uma ampla gama de mecanismos de resistência e tem se mostrado cada vez mais resistente a maioria dos antimicrobianos existentes na atualidade (SLAMA et al., 2010). Embora medidas tenham sido tomadas na medicina humana e veterinária a fim de minimizar a utilização de antimicrobianos, boa parte da transferência de bactérias resistentes está relacionada ao processo de produção, transformação, preparação e comércio de alimentos (KIRBIS; KRIZMANN, 2015).

Diversos estudos têm detectado altos índices de multirresistência antimicrobiana em *E. coli* isolados de alimentos (RASHID et al., 2013; RIBEIRO et al., 2016; VRABEC et al., 2015), bem como isolados apresentando perfis de resistência, tais como ESBL (Beta-lactamases de espectro estendido) e carbapenemases (MO et al., 2016; SINGH et al., 2016; TEKINER; OZPINAR, 2016). Cepas de *E. coli* ESBL são caracterizadas pela produção de enzimas que

hidrolisam o anel beta-lactâmico, conferindo resistência aos antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos - penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos (ECDC, 2013; PFEIFER; CULLIK; WITTE, 2010), enquanto que as carbapenemases são enzimas que conferem resistência aos carbapenêmicos (THOMSON, 2010).

Um fator que pode aumentar a resistência aos antimicrobianos é a capacidade de formação de biofilme por *E. coli*, pois funcionam como barreiras que protegem as bactérias contra os efeitos de desinfetantes e antimicrobianos (HOBLEY et al., 2015) e representa um grande problema nos ambientes de processamento de alimentos, pois seu controle é um desafio constante na indústria de alimentos (CULLER et al., 2014; SILAGYI et al., 2009; SREY; JAHID; HA, 2013).

*Listeria monocytogenes* é um patógeno ubiqüitário muito versátil, pois sobrevive em condições de temperatura e pH muito diversificadas e tem sido considerado um grande problema na indústria, pois já foi isolado em diferentes tipos de alimentos (ALMEIDA et al., 2017; CAGRI-MEHMETOGLU et al., 2011; FRANCO; LANDGRAF, 2008). Devido as habilidades específicas desse patógeno em superar os mais diversos obstáculos do processamento de alimentos, seu controle continua sendo um desafio na indústria (MELO, ANDREW; FALEIRO, 2015). A presença de *L. monocytogenes* em alimentos é um problema de saúde pública, uma vez que os consumidores desses alimentos podem desenvolver a listeriose, uma doença que pode ser invasiva e até mesmo fatal e está associada, principalmente, a pessoas imunocomprometidas, idosos e gestantes (DREVETS; BRONZE, 2008; SCHLECK et al., 1983).

A patogenicidade de *L. monocytogenes* está relacionada à diversos fatores de virulência (Ex: Internalinas, Listeriolisina O, Fosfolipases C, Proteína polimerizadora de actina, Proteína associada à invasão) que podem ser expressos por esses micro-organismos a fim de garantir a invasão, sobrevivência e multiplicação intracelular, bem como a disseminação do micro-organismo entre as células do hospedeiro (LIU, 2006; VASQUÉZ-BOLAND et al., 2001). *Listeria monocytogenes* é geralmente suscetível à inúmeros antibióticos, no entanto, estudos recentes têm demonstrado um emergente aumento de cepas isoladas de alimentos resistentes aos antimicrobianos utilizados no tratamento da listeriose humana (DOMÉNECH et al, 2015; FALLAH; SAEI-DEKORDI; MAHZOUNIEH, 2013; GÓMEZ et al., 2014). Tal fato é preocupante, uma vez que *L. monocytogenes* é, aparentemente, suscetível à aquisição de resistência antimicrobiana por meio da transmissão de material genético de outros gêneros (BERTSCH et al., 2013; TOOMEY et al., 2009).



Diante dos fatos, conhecer os perfis de virulência e resistência de *E. coli* e *L. monocytogenes* isolados de alimentos é importante para o monitoramento e melhoria dos processos de fabricação. Como poucos são os estudos realizados com o queijo artesanal serrano e a maioria deles buscam apenas verificar a qualidade microbiológica por meio do isolamento e contagem de micro-organismos, o objetivo do presente estudo foi detectar os genes de virulência e traçar o perfil de susceptibilidade de *E. coli* e *L. monocytogenes* aos antimicrobianos, bem como verificar a potencial capacidade de produção de biofilme de *E. coli* isolados de leite cru e queijo artesanal serrano produzidos no estado de Santa Catarina, região sul do Brasil.



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 QUEIJO ARTESANAL SERRANO

O queijo artesanal serrano é um produto fabricado nos campos de altitude, acima de 1.000 m do nível do mar, do sul do Brasil, região conhecida como Campos de Cima da Serra, que compreende os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina (CRUZ et al., 2008). Esse queijo é caracterizado por sua elaboração a partir de leite cru proveniente de vacas de raças de corte que recebem alimentação a base de pastagens naturais na própria propriedade rural (PEREIRA et al., 2014). As técnicas artesanais de fabricação do queijo serrano, associadas ao microclima da região, conferem ao produto características físicas e organolépticas únicas, diferenciando esse dos demais tipos de queijos produzidos (CRUZ et al., 2008; KRONE, 2009).

A produção artesanal do queijo serrano é uma das principais atividades na rotina da família, sendo uma considerável fonte de renda desses pequenos agricultores. O processo de produção é heterogêneo, não existe uma padronização de técnicas de fabricação entre as propriedades rurais, o que gera uma diversidade na composição desse produto (CÓRDOVA et al., 2010; RIES; LUZ; WAGNER, 2012; ZAFFARI; MELLO; COSTA, 2007). Esse alimento pode ser encontrado em prateleiras de supermercados, açougues e feiras públicas. No entanto, sua comercialização era considerada irregular perante a legislação brasileira que estabelece que o queijo deve ser produzido a partir de leite pasteurizado (BRASIL, 1996) e somente em setembro de 2016 foi sancionada uma lei estadual n. 17003/2016 que dispõe sobre a produção e comercialização do queijo artesanal serrano no estado de Santa Catarina (SANTA CATARINA, 2016).

A principal característica do queijo artesanal é a utilização do leite cru, que, quando de qualidade, é um produto rico em micro-organismos benéficos que influenciam no gosto, cheiro e qualidade do queijo serrano. No entanto, existe a possibilidade de o leite utilizado conter micro-organismos potencialmente prejudiciais à saúde. Além disso, o queijo artesanal serrano muitas vezes é produzido sob condições higiênico-sanitárias precárias, constituindo um risco para a saúde dos consumidores (IDE; BENEDET, 2001; SOUZA; DALLA ROSA; AYUB, 2003; ZAFFARI; MELLO; COSTA, 2007).

A contaminação microbiana dos queijos assume grande relevância para a saúde pública, já que o consumo desse produto contaminado pode desencadear intoxicações e infecções alimentares em consumidores. Dentre os principais contaminantes, destacam-se *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* (ALVES, 2013). Estudos analisando amostras de queijo serrano

produzidos em Santa Catarina, detectaram contaminação por *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes* em taxas superiores a 45% e 3%, respectivamente, o que demonstra inadequadas condições de higiene durante o processo de fabricação e armazenamento dos queijos e torna o produto impróprio para o consumo (MELO et al., 2013; PONTAROLO et al., 2017).

## 2.2 *ESCHERICHIA COLI*

*Escherichia coli*, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, é o principal microorganismo do grupo dos Coliformes Termotolerantes e caracterizado por ser um bacilo Gram-negativo, não esporulado e anaeróbio facultativo. É uma bactéria originária do trato gastrointestinal de animais de sangue quente e de humanos, capaz de fermentar a glicose com produção de gás quando em temperaturas entre 44-45°C durante 24-48 horas (FRANCO; LANDGRAF, 2008; SILVA et al., 2010). *E. coli* é uma das bactérias mais envolvidas na contaminação de alimentos, em especial o leite e os produtos lácteos não pasteurizados (LEEDOM, 2006).

Por se tratar de uma bactéria que faz parte da microbiota normal do intestino do homem e outros animais, a maioria das cepas de *E. coli* são consideradas não patogênicas aos humanos (CROXEN; FINLAY, 2010). No entanto, existem algumas cepas de baixa virulência que podem causar infecções oportunistas em pessoas debilitadas e cepas patogênicas, que são associadas a doenças graves que podem, inclusive, levar a morte. Dentre as linhagens patogênicas estão incluídas *E. coli* dos patótipos EAEC (enteroagregativa), EIEC (enteroinvasiva), EPEC (enteropatogênica), ETEC (enterotoxigênica) e EHEC (enterohemorrágica) (FRANCO; LANDGRAF, 2008; TOMA et al., 2003).

### 2.2.1 *Escherichia coli* Enteropatogênica (EPEC)

EPEC foi a primeira categoria de *E. coli* diarreiogênica identificada, devido a sua ligação com casos de diarreia infantil no Reino Unido em 1945 (YANG; WANG, 2014) e, atualmente, é considerada uma das principais causas de diarreia infantil em países em desenvolvimento (HU; TORRES, 2015). EPEC é caracterizada pela capacidade de produzir na histopatologia uma lesão denominada A/E (*attaching and effacing*) e a não produção da toxina Shiga. Na lesão A/E observa-se a destruição das microvilosidades intestinais e rearranjo do citoesqueleto com formação de um pedestal no qual a bactéria se liga intimamente ao epitélio intestinal do hospedeiro (NATARO; KAPER, 1998; YANG; WANG, 2014). A formação desse

tipo de lesões resulta em diarreia devido diversos mecanismos, incluindo a redução da capacidade de absorção do epitélio intestinal, alterações da secreção de íons, permeabilidade e inflamação intestinal (SHAW et al., 2005).

As lesões A/E promovidas por EPEC em células do hospedeiro são mediadas pela *intimina*, uma proteína de adesão da membrana externa codificada pelo gene *eae* (*E. coli attaching-effacing*) presente em uma ilha de patogenicidade LEE no cromossomo bacteriano (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; MAINIL, 2013). Em 1995, foram reconhecidas duas categorias de EPEC durante o 2º Simpósio Internacional sobre EPEC realizado em São Paulo, que foram denominadas EPEC típica (tEPEC) e EPEC atípica (aEPEC), ambas não produzem toxina Shiga e são capazes de causar lesão A/E (YANG; WANG, 2014). Cepas típicas de EPEC formam um padrão de “aderência localizada” na presença de células epiteliais, devido a presença da fímbria BFP (*Bundle-forming pilus*) codificada pelo gene *bfp* contido no plasmídeo EAF, enquanto que as cepas atípicas não apresentam o plasmídeo EAF. Embora a presença do plasmídeo EAF não seja essencial para a formação da lesão A/E, pode aumentar a eficiência do processo. Assim, infecções por tEPEC são, geralmente, mais graves que as causadas por aEPEC (HERNANDES et al., 2009; HU; TORRES, 2015; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; NATARO; KAPER, 1998).

Os habitats naturais de tEPEC são os humanos (YANG; WANG, 2014) e está relacionada a diarreia infantil, principalmente em crianças menores de 1 ano. Raramente acomete adultos, porém os acometidos são, geralmente, aqueles em situação de imunossupressão (NATARO; KAPER, 1998). Já aEPEC tem como habitat natural os humanos e animais (YANG; WANG, 2014), e foi detectada em pessoas com diarreia em todas as faixas etárias, bem como em adultos imunocomprometidos (ASSIS et al., 2014; GOMES et al., 2004, LOZER et al., 2013). Cepas de aEPEC tem sido a causa frequente de diarreia tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento (FOSTER et al., 2015; HERNANDES et al., 2009; HU; TORRES, 2015; TRABULSI; KELLER; GOMES, 2002).

### **2.2.2 *Escherichia coli* Enterotoxigênica (ETEC)**

ETEC foi descrita pela primeira vez no final da década de 1960 relacionada à quadros de diarreia. Essa bactéria é conhecida como uma das principais causas de diarreia infantil e “*diarreia dos viajantes*” em países em desenvolvimento, sendo raros os relatos em países desenvolvidos (DUBREUIL, 2014; YANG; WANG, 2014). ETEC é caracterizada pela produção de fatores de colonização (adesinas) e ao menos um dos dois tipos de enterotoxinas,

termolábil (LT) e termoestável (ST). Essas toxinas diferem quanto à estrutura, tolerância à temperatura, mecanismos de ação e características imunogênicas. Os genes que codificam essas proteínas (*lt*, *st*) estão localizados em um plasmídeo (pEnt), que pode ser transferido para cepas não patogênicas (GYLES; FAIRBROTHER, 2010; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

Existem dois tipos de enterotoxinas LT (LT-I e LT-II), sendo a LT-I produzida por cepas de ETEC patogênicas para humanos e animais (NATARO; KAPER, 1998) e a LT-II tem sido encontrada em cepas isoladas de alimentos, animais e raramente associada a humanos (DUBREUIL, 2014). As enterotoxinas ST são também subdivididas em grupos STa e STb, sendo a primeira relacionada principalmente à doença humana e a segunda geralmente encontrada em cepas derivadas de suínos, embora tenha sido isolada também de humanos (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; NATARO; KAPER, 1998). As toxinas LT e ST, em conjunto ou separadamente, provocam um desequilíbrio hidroeletrolítico nas células, o que contribui para a patogênese de ETEC (GOMES et al., 2016). Concentrações muito baixas dessas moléculas podem interromper a homeostase do intestino, sendo LT considerada como altamente antigênica e ST pouco antigênica (DUBREUIL, 2014).

A forma comum de transmissão de ETEC se dá pela ingestão de água ou alimentos contaminados e o homem é, provavelmente, o principal reservatório natural desse micro-organismo. ETEC também está associado a diarreia aquosa em animais de produção, principalmente recém-nascidos e jovens (GYLES; FAIRBROTHER, 2010; YANG; WANG, 2014). As cepas de ETEC produzem fatores de colonização, estruturas proteicas fimbriais ou não fimbriais, que facilitam a fixação e colonização da mucosa intestinal e conferem a especificidade ao hospedeiro, com posterior produção de enterotoxinas que promovem a diarreia (DUBREUIL, 2014; GAASTRA; SVENNERHOLM, 1996).

### **2.2.3 *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC)**

EAEC é um patógeno entérico emergente associado a casos de diarreia aguda ou persistente em crianças e adultos (KAUR; CHAKRABORT; ASEA, 2010), caracterizado pela capacidade de apresentar um padrão de adesão exclusivo em cultivos celulares *in vitro*, denominado adesão agregativa (AA), uma característica descoberta por Nataro et al. (1987) ao estudar amostras de *E. coli* isoladas de crianças com diarreia e cultivá-las em células da linhagem HEp-2. Nesse padrão de aderência AA, as bactérias são encontradas aderidas umas às outras e à superfície das células do hospedeiro, formando um aspecto similar a “tijolos empilhados” (GOMES et al., 2016; NATARO et al., 1987).

Vários fatores de virulência foram descritos para EAEC, incluindo as adesinas, denominadas fatores de aderência agregativa (AAF/I a AAF/IV), envolvidas na colonização bacteriana do intestino, as quais são codificadas por plasmídeo e necessárias para a expressão do padrão de aderência AA (JENSEN et al., 2014); as toxinas, como a toxina termoestável EAST-1, a toxina codificada por plasmídeo (Pet), a enterotoxina de *Shigella* (ShET1) e a hemolisina E (HlyE); os fatores de colonização (Pic); uma proteína (dispersina) que promove a dispersão de EAEC na mucosa intestinal (BRÜSSOW, 2014); e um regulador transcricional (AggR) que regula a transcrição de fatores de virulência plasmidiais e cromossômicos, sendo que a presença desse último pode ser utilizada para caracterizar uma cepa como EAEC típica (HARRINGTON; DUDLEY; NATARO, 2006; MORIN et al., 2013; NATARO, 2005). No entanto, a heterogeneidade das cepas de EAEC dificulta a identificação dos mecanismos de patogenicidade desse patótipo, pois nenhum dos fatores de virulência foi identificado como comum a todas as cepas de EAEC (GOMES et al., 2016; KAUR; CHAKRABORT; ASEA, 2010).

EAEC é um emergente patógeno de origem alimentar associado a quadros de diarreia aquosa e mucoide, com pouca ou nenhuma febre, em crianças de países desenvolvidos e em desenvolvimento, bem como em adultos, viajantes e pessoas infectadas pelo vírus HIV em países em desenvolvimento, tendo o homem como seu reservatório natural (BRÜSSOW, 2014; HUANG et al., 2006). São descritos alguns estágios da patogênese por EAEC, que consistem na inicial aderência à superfície da mucosa, seguido de formação de biofilme e indução de resposta inflamatória e liberação de toxinas (JENSEN et al., 2014). No entanto a patogênese da diarreia causada por EAEC ainda não é muito bem estabelecida e depende do conhecimento mais aprofundado envolvendo a heterogeneidade da virulência das cepas, as interações complexas entre patógeno e hospedeiro, bem como a quantidade de bactérias ingeridas pelo hospedeiro infectado (BRÜSSOW, 2014; GOMES et al., 2016).

#### **2.2.4 *Escherichia coli* Enterohemorrágica (EHEC)**

EHEC, também conhecida como VTEC (*E. coli* Verocitotoxigênica) ou STEC (*E. coli* produtora de toxina Shiga), foi descrita como uma classe distinta de *E. coli* a partir de dois estudos publicados em 1983, sendo um relativo a um surto de diarreia sanguinolenta, denominada colite hemorrágica, provocado pela ingestão de hambúrgueres (RILEY et al., 1983) e o outro relativo a casos de síndrome hemolítica urêmica associada à presença de uma citotoxina produzida por *E. coli* O157:H7, detectada nas fezes dos pacientes (KARMALI et al.,

1983). Esse patótipo de *E. coli* é caracterizado pela produção de pelo menos uma das toxinas Shiga (Stx1 ou Stx2), assim denominadas devido a semelhança com a toxina produzida por *Shigella dysenteriae*, que são também conhecidas como verotoxinas, pois apresentam atividade tóxica em células da linhagem *Vero* (DUFFY, 2014). As toxinas Stx são do tipo A/B e atuam inibindo a síntese proteica, bem como na sinalização celular e modulação imune, gerando respostas pró-inflamatórias e morte celular (GOMES et al., 2016; MELTON-CELSA, 2014). Os genes das toxinas Shiga (*stx*) estão localizados no cromossomo bacteriano, em fagos lambda, indicando sua origem por eventos de transferência de genes mediados por fagos, o que possibilita a transferência de *stx* entre cepas de *E. coli* (GYLES, 2007; YANG; WANG, 2014).

Outros fatores de virulência também podem ser encontrados em cepas de EHEC e atuam na patogênese, tais como a proteína de adesão (intimina), que promove lesões A/E (*attaching-effacing*) codificada pelo gene *eae* presente em uma ilha de patogenicidade LEE no cromossomo bacteriano, assim como em EPEC (STEVENS; FRANKEL, 2014). A enterohemolisina e outros fatores adicionais, como as fímbrias, que auxiliam a bactéria na aderência às células do hospedeiro, podem ser encontradas em cepas de EHEC, embora sua importância na patogênese ainda não seja muito bem estabelecida (DUFFY, 2014).

EHEC tem causado infecção diarreica em humanos a partir do consumo de alimentos contaminados no mundo todo, geralmente devido a inadequadas condições de manuseio, saneamento da água e higiene pessoal, sendo o sorotipo O157:H7 considerado o responsável por casos mais graves, como colite hemorrágica e síndrome hemolítica urêmica (PAGE; LILES, 2013). O habitat natural de EHEC é o trato intestinal de diversos ruminantes, principalmente os bovinos (YANG; WANG, 2014). Os alimentos de origem animal, como carnes e produtos lácteos, são considerados as principais fontes em casos de infecções causadas por EHEC. Além disso, cepas de EHEC podem sobreviver no ambiente (solo, esterco, pastagens e água), o que também representa um importante veículo de disseminação desse patógeno (DUFFY, 2014).

### **2.2.5 *Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC)**

EIEC foi descrita pela primeira vez em 1971, por causar doença diarreica, semelhante à causada por *Shigella*, em experimentos com humanos saudáveis (DUPONT et al., 1971). EIEC e *Shigella* apresentam características bioquímicas similares e utilizam o mesmo método de invasão da mucosa intestinal do hospedeiro e, dessa forma, a doença intestinal causada por essas bactérias é semelhante (VAN DEN BELD; REUBSAET, 2012). Tanto EIEC como *Shigella* apresentam proteínas efetoras, *IPAs* (Antígenos plasmidiais de invasão), localizadas em um



plasmídeo (pINV) e estão relacionadas à ligação e invasão de células epiteliais do cólon (SASAKAWA, 2010; SMALL; FALKOW, 1988). O pINV contém vários genes de virulência que, associados à genes de virulência cromossômicos, evocam uma cascata de eventos que levam a infecção (VAN DEN BELD; REUBSAET, 2012) e algumas cepas de EIEC podem produzir uma enterotoxina, também codificada pelo plasmídeo pINV (YANG; WANG, 2014). O gene *ipaH*, presente tanto no pINV como no cromossomo bacteriano de EIEC e *Shigella*, tem sido utilizado para diferencia-los dos outros patótipos de *E. coli* (LAMPEL, 2014; VAN DEN BELD; REUBSAET, 2012).

A patogênese da infecção por EIEC envolve a penetração em células epiteliais intestinais, a lise do vacúolo endocítico, a multiplicação intracelular, o movimento direcional através do citoplasma e a disseminação para as células epiteliais adjacentes (NATARO; KAPER, 1998). EIEC pode causar colite inflamatória invasiva e disenteria, caracterizada por cólicas abdominais, febre e fezes contendo sangue, muco e pus (KAPER; NATARO; MOBLEY; 2004; LAMPEL, 2014). O provável reservatório natural de EIEC é o homem infectado, uma vez que nenhum hospedeiro animal tem sido identificado (YANG; WANG, 2014) e existem poucos relatos sobre as rotas de transmissão e distribuição dessa bactéria na natureza, embora tenha sido responsável por vários surtos no mundo (GOMES et al., 2016). De acordo com o *Food and Drug Administration* – FDA (2012), qualquer alimento contaminado com fezes humanas de indivíduo doente, diretamente ou via água contaminada, pode ser infeccioso.

### **2.2.6 *Escherichia coli* diarreiogênicas em alimentos**

Estudos realizados em diversos países, desenvolvidos e em desenvolvimento, têm descrito a presença de cepas de *Escherichia coli* diarreiogênicas em diferentes tipos de alimentos, como vegetais, frutas, carnes (bovinas, suínas e de aves), frutos do mar, produtos lácteos, alimentos prontos para o consumo, dentre outros (BADRI et al., 2009; CANIZALEZ-ROMAN et al. 2013; ESCHER et al., 2014; GÓMEZ-ALDAPA et al., 2016; MICHELACCI et al., 2016; NEWITT et al., 2016; WANG et al., 2017).

Os alimentos podem ser contaminados direta ou indiretamente pelas fezes de indivíduos e/ou animais infectados e atuam como vetores para a transmissão de cepas de *E. coli* diarreiogênicas aos consumidores, gerando um problema de saúde pública, uma vez que o consumo desses alimentos pode causar desde infecções subclínicas à severas e fatais em crianças e adultos (DUBREUIL, 2014; YANG; WANG, 2014). Como exemplo dos problemas

ocasionados pelo consumo de alimentos contaminados por *E. coli* diarrreio gênicas, vários surtos de doença de origem alimentar foram relatados nos últimos anos em diversos países e alguns são relacionados na tabela 1.

**Tabela 1 – Casos de surto de origem alimentar causados por *E. coli* diarrreio gênicas.**

<i>Patótipo de E. coli</i>	<i>Fonte</i>	<i>País (ano)</i>	<i>Características</i>	<i>Referência</i>
EAEC	Festival de alimentos	Inglaterra (2013)	592 casos de diarreia persistente após participarem de um festival de alimentos.	(DALMANN et al., 2014)
ETEC	Cebolinha e ovos mexidos	Noruega (2012)	Mais de 300 pessoas doentes após um buffet de Natal em um hotel.	(MACDONALD et al., 2015)
	Comida Japonesa	Japão (2012)	102 casos de doença gastrointestinal relacionados a um restaurante japonês em um festival – A cepa de ETEC foi também isolada de um manipulador de alimentos que teve diarreia dias antes do festival.	(HARADA et al., 2013)
EPEC	Sopa de ovos e bibimbap de atum	Coréia do Sul (2013)	33 casos de gastroenterite em uma escola.	(PARK et al., 2014)
STEC/ EHEC	Salada de frango vendida em uma rede de lojas	Estados Unidos (2015)	19 casos de diarreia (em sete estados) - 5 hospitalizações, sendo que 2 desses desenvolveram síndrome urêmica hemolítica. Cepa EHEC O157:H7 foi isolada.	(CDC, 2015)
	Carne moída	Estados Unidos (2014)	12 pessoas infectadas com a cepa EHEC O157:H7 (58% foram hospitalizados)	(CDC, 2014)
	Carne moída	França (2011)	18 crianças desenvolveram síndrome urêmica hemolítica em decorrência do consumo de carne moída contaminada com EHEC O157:H7, comercializada em uma rede de supermercados.	(KING et al., 2014)

**Tabela 1 – Casos de surto de origem alimentar causados por *E. coli* diarreiogênicas (Continuação).**

EIEC	Salada mista (alface, pepino, tomate e cebola)	Reino Unido (2014)	Dois surtos: Um envolvendo 142 pessoas com doença gastrointestinal após consumirem alimentos em um restaurante. Outro envolveu 15 pessoas que participaram de uma festa de casamento (nesse caso o alimento não foi definido).	(NEWITT et al., 2016)
------	--	--------------------	--	-----------------------

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

Tais fatos evidenciam que a contaminação bacteriana dos alimentos pode ocorrer desde o cultivo até o processamento final, a partir de fontes ambientais, animais ou humanas e causar doenças transmitidas por alimentos nos consumidores desses produtos (YANG et al., 2017).

#### 2.2.6.1 *Escherichia coli* diarreiogênicas em leite e produtos lácteos

Cerca de 2 a 6% dos surtos de doenças causadas por alimentos na Europa e nos Estados Unidos estão relacionados a leite e produtos lácteos (MÜHLEMANN, 2014). O leite, devido à sua composição química rica em proteínas, vitaminas e sais minerais, torna-se um excelente meio para o desenvolvimento de micro-organismos benéficos e patógenos (YOON; LEE; CHOI, 2016). A contaminação por micro-organismos potencialmente patogênicos ocorre principalmente durante o processo de ordenha, devido a higienização inadequada dos utensílios e do homem, bem como por doenças do rebanho, no entanto, falhas no transporte, beneficiamento e estocagem podem interferir na qualidade do leite (FRANCO; LANDGRAF, 2008; YOON; LEE; CHOI, 2016).

Assim, os queijos produzidos a partir de leite cru têm sido considerados inseguros tanto pelo fato da presença de patógenos no leite como pela contaminação durante o processo produtivo (YOON; LEE; CHOI, 2016). Ao categorizar o risco de patógenos em queijos, as cepas de *E. coli* diarreiogênicas são classificadas como de alto risco (MÜHLEMANN, 2014). Diversos estudos têm relatado a presença de *E. coli* diarreiogênicas em leite e queijos, principalmente produzidos a partir de leite cru, conforme descrito na tabela 2.

**Tabela 2 – Estudos que isolaram *E. coli* diarreiogênicas em leite e produtos lácteos.**

<b>País</b>	<b>Alimento</b>	<b>Patótipos de <i>E. coli</i> (gene identificado)</b>	<b>Referência</b>
Eslováquia	Queijos produzidos a partir de leite cru de ovelha	EPEC ( <i>eae</i> ); ETEC ( <i>lt, st</i> ); VTEC/EHEC ( <i>vt</i> ).	(HOLKO et al., 2006)
Arábia Saudita	Leite cru e produtos de leite cru	EPEC ( <i>eae</i> ); EHEC ( <i>stx</i> )	(ALTALHI; HASSAN, 2009)
Líbano	Queijos e bebida láctea fermentada	EPEC ( <i>eae</i> ); ETEC ( <i>lt, st</i> ); EHEC ( <i>stx</i> ); EAEC ( <i>pCVD</i> )	(SALEH et al., 2013)
Índia	Leite cru de Iaque e queijos de leite cru	EPEC ( <i>eae</i> ); STEC/EHEC ( <i>stx</i> ).	(BANDYOPADHYAY et al., 2012)
México	Diversos tipos de alimentos, incluindo produtos lácteos	EPEC ( <i>eae</i> ); ETEC ( <i>lt, st</i> ); EAEC ( <i>aggR</i> ); STEC/EHEC ( <i>stx</i> )	(CANIZALEZ-ROMAN et al., 2013)
Espanha	Leite de cabra	EPEC ( <i>eae</i> ); STEC/EHEC ( <i>stx</i> )	(ÁLVAREZ-SUÁREZ et al., 2015)
África do Sul	Leite cru e pasteurizado	STEC/EHEC ( <i>stx</i> )	(NTULI; NJAGE; BUYS, 2016)
Itália	Leite cru e queijos de leite cru	STEC/EHEC ( <i>stx</i> )	(NOBILI et al., 2016)
Egito	Leite cru e queijos de leite cru	EPEC ( <i>eae</i> ); EHEC ( <i>stx</i> )	(OMBARAK et al., 2016)
Brasil	Queijos produzidos a partir de leite cru	EPEC ( <i>eae</i> )	(CAMPOS et al., 2018)

Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

### 2.2.7 Resistência antimicrobiana

Um dos grandes problemas enfrentados nos últimos anos é a resistência bacteriana aos antibióticos, e embora muito tenha sido feito a fim de minimizar a aplicação de antibióticos na medicina humana e veterinária, uma grande parte da transferência de bactérias resistentes está relacionada ao processo de produção, transformação, preparação e comércio de alimentos (KIRBIS; KRIZMAN, 2015). Os produtos consumidos crus apresentam maior risco de transferência de resistência antimicrobiana, pois as bactérias não são eliminadas por tratamentos prévios (VERRAES et al., 2013). *Enterobacteriaceae* é uma das famílias de micro-organismos com os principais agentes causadores de doenças graves e as bactérias mais importantes dessa família estão se tornando cada vez mais resistentes aos antimicrobianos existentes na atualidade. Dentre os principais micro-organismos de interesse está a *Escherichia coli* (SLAMA et al., 2010).

Estudos de diversas partes do mundo têm demonstrado preocupantes índices de resistência antimicrobiana em cepas de *E. coli* isoladas a partir de alimentos, especialmente leite, queijo e demais produtos lácteos. Dentre a classe dos  $\beta$ -lactâmicos, estudos tem demonstrado cepas de *E. coli* com taxas de resistência variando entre 0,4 e 18% para amoxicilina com clavulanato; 2,4-31% para cefoxitina; 14,3-72% para ampicilina e 30-52% para cefotaxima. Dentre os aminoglicosídeos, foram encontrados índices de resistência à estreptomicina variando entre 5,9 e 28% e à gentamicina, entre 0,4 e 50%. Cepas de *E. coli* com taxas de resistência superiores à 80%, 40%, 30% e 20%, à tetraciclina, sulfametoxazol-trimetoprima, ciprofloxacina e cloranfenicol, respectivamente, também foram identificadas em amostras de leite, queijos e outros produtos lácteos (CAMPOS et al., 2018; CANIZALEZ-ROMAN et al., 2013; GUILÉN; MILLÁN; ARAQUE, 2014; RASHID et al., 2013; RIBEIRO et al., 2016; SALEH et al., 2013; SKOČKOVÁ et al., 2015; VRABEC et al., 2015).

Multirresistência antimicrobiana foi identificada em *E. coli* isolados de leite cru, queijos e outros produtos lácteos, com índices variando entre 2 e 20%, no Brasil (CAMPOS et al., 2018; RIBEIRO et al., 2016), entre 21 a 48%, no México e Índia (CANIZALEZ-ROMAN et al., 2013; RASHID et al., 2013), e superiores à 60%, na Eslováquia (VRABEC et al., 2015). Esses dados são preocupantes, uma vez que esses micro-organismos resistentes podem causar doenças graves em consumidores desses produtos contaminados, gerando efeitos como a falha terapêutica e a limitada escolha de antimicrobianos para o tratamento (VERRAES et al., 2013).

### 2.2.7.1 Beta-Lactamases de Espectro Estendido (ESBL)

ESBL, um dos principais mecanismos de resistência encontrados em *E. coli*, consiste na hidrólise do anel beta-lactâmico através de enzimas, conferindo resistência aos antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos (ECDC, 2013; PFEIFER; CULLIK; WITTE, 2010). Porém, essas enzimas não hidrolisam as cefamicinas e os carbapenêmicos, além de serem inativadas pelos inibidores de beta-lactamase (ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam) (LEE; BAE; LEE, 2012; PATERSON; BONOMO, 2005). Essas enzimas são divididas em três principais famílias: TEM, SHV e CTX-M (BUSH; JACOBY, 2010). Os genes que codificam ESBL estão localizados em plasmídeos conjugativos ou em integrons e podem ser transferidos para outras espécies de enterobactérias facilitando ainda mais sua propagação (CARATTOLI, 2013; WOODFORD; TURTON; LIVERMORE, 2011).

A triagem para identificar, fenotipicamente, possíveis cepas bacterianas produtoras de ESBL é realizada pelo teste de aproximação dos discos – método de disco difusão, no qual coloca-se um disco de amoxicilina com ácido clavulânico no centro de uma placa e distante a 30 mm (de centro a centro) dos outros discos de beta-lactâmicos: ceftazidima, cefotaxima/cefotriaxona e cefepima (cefalosporinas de amplo espectro) e aztreonam (monobactâmico). O aumento do diâmetro do halo de inibição ou o aparecimento da zona fantasma, distorção do halo ao redor do disco beta-lactâmico, sugere a presença de uma amostra produtora de ESBL (CLSI, 2018). Esses dados podem ser confirmados pela utilização de técnicas moleculares para a detecção dos genes das principais famílias de ESBL – TEM, SHV e CTX-M (DALLENNE et al., 2010).

Diversos estudos têm sido realizados a fim de investigar a presença de *Enterobacteriaceae*, bem como detectar a presença de *E. coli* produtora da ESBL em alimentos. Gundogan e Avci (2013) encontraram *E. coli* com fenótipo produtor de ESBL em 44,5% das amostras de alimentos analisados (carne, leite e queijo) e Tepeli e Zorba (2018) detectaram que 71,4% das cepas de *E. coli* isoladas de leite cru apresentavam perfil fenotípico de ESBL, na Turquia. Su et al. (2016) avaliaram amostras de leite cru oriundo de vacas com mastite em Taiwan e observaram que 10,7% de *E. coli* isolados foram produtores de ESBL das famílias TEM, SHV e CTX-M, sendo que 47% dos isolados apresentaram gene *bla*<sub>TEM</sub>. Também avaliando amostras de leite cru na República Tcheca, Skočková et al. (2015) isolaram *E. coli* e os genes de ESBL, *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>CTX-M</sub>, foram detectados em 7,1% dos isolados. Tekiner e Ozpinar (2016) detectaram 22% de enterobactérias isoladas de alimentos (leite cru, queijo e

carne de frango) na Turquia, positivas para o fenótipo que produz ESBL, das quais 80% eram *E. coli*, com múltiplas distribuições coexistentes dos genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-8</sub> e *bla*<sub>SHV</sub>. Vrabec et al. (2015) avaliou o perfil de *E. coli* isolados de queijos na Eslováquia e verificou que 42,2% eram produtores de ESBL, sendo identificados os genes *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>SHV</sub>. Ribeiro et al. (2016) também analisando *E. coli* oriundas de queijos produzidos a partir de leite cru, no Brasil, identificou que mais de 10% dos isolados eram produtores de ESBL e apresentavam o gene *bla*<sub>TEM</sub> sozinho ou coexistente com outro gene.

#### 2.2.7.2 Carbapenemases

Como a resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em *E. coli* vem se tornando um problema mundial emergente nos últimos anos, os carbapenêmicos (antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos) são considerados a última escolha para tratamentos, inclusive contra bactérias produtoras de ESBL, sendo utilizados com frequência para o tratamento de infecções humanas na atualidade (GENC; AKSU; GULCAN, 2016; SPELLBERG, 2011). No entanto, já são registrados casos de bactérias da família *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011). Com isso, foram descobertas enzimas que conferem essa resistência – as *carbapenemases* (THOMSON, 2010).

A resistência aos carbapenêmicos pode ser mediada pela produção de enzimas capazes de hidrolisar quase todos os beta-lactâmicos (as carbapenemases) ou através de modificações na membrana celular, pela diminuição permeabilidade da membrana celular devido a modificação da porina e/ou pela produção de bombas de efluxo, que é frequentemente encontrado em combinação com as enzimas cefalosporinases (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011).

Vários tipos de carbapenemases já foram descritas em bactérias da família *Enterobacteriaceae*, das quais destacam-se as *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC), as carbapenemases dependentes de zinco como fator enzimático, também conhecidas como metallo-beta-lactamases (IMP – imipemenase, VIM – Verona imipemenase, SPM – São Paulo imipemenase, NDM – New Delhi imipemenase) e as oxacilinas (OXAs) (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011; TZOUVELEKIS et al., 2012).

Os genes que codificam as enzimas das famílias KPC e OXA são encontrados em plasmídeos e, são facilmente disseminados entre as bactérias. As metallo-beta-lactamases, NDM e SPM também são codificadas por genes plasmidiais (DAHIYA et al., 2015; NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011), enquanto que as enzimas das famílias IMP e VIM são codificadas por

uma variedade de integrons e podem ser facilmente transferidos entre as bactérias quando esses elementos genéticos se associam a plasmídeos ou transposons (QUEENAN; BUSH, 2007).

Apesar de não ser considerada uma carbapenemase, a enzima AmpC é uma cefalosporinase que pode apresentar resistência aos carbapenêmicos quando associada com sistema de efluxo ou alteração na permeabilidade da membrana externa (LIVERMORE; WOODFORD, 2006). As enzimas AmpC podem ser codificadas por genes cromossômicos e plasmidiais e as principais enzimas com resistência aos carbapenêmicos são as das famílias CMY e FOX (JACOBY, 2009).

A maioria das bactérias produtoras de carbapenemase têm sido isoladas de amostras clínicas e são raros os estudos que isolam enterobactérias produtoras de carbapenemase a partir de alimentos. No entanto, Singh et al. (2016) isolaram uma cepa de *E. coli* produtora de carbapenemase (NDM), pois detectou o gene *bla*<sub>NDM-5</sub> em amostras de frutos do mar frescos vendidos em Mumbai na Índia. Zurfluh et al. (2015) analisaram diversas amostras de vegetais importados da Ásia para a Suíça e identificaram uma cepa de enterobactéria produtora de carbapenemase, na qual o gene *bla*OXA-181 foi detectado. Em contrapartida, Randall et al. (2017) investigaram a presença de *E. coli* em amostras de diferentes tipos de carnes, frutas e vegetais comercializados no Reino Unido e nenhuma cepa produtora de carbapenemase foi isolada. Adicionalmente, Wang et al. (2018) analisaram amostras de animais de produção, bem como do ambiente do matadouro e detectou cepas de *E. coli* portadoras de genes *bla*<sub>NDM+</sub>. Webb et al. (2016) isolaram enterobactérias de fezes de vacas leiteiras e detectou o gene *bla*OXA-497 em um isolado, sugerindo que enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos presentes em animais de produção podem ser disseminadas por meio da contaminação de alimentos.

Em estudo realizado com alimentos (carne de frango cru, leite cru e queijos), Tekiner e Ozpinar (2016) detectaram que entre os isolados produtores de ESBL, 9,1% também eram positivos para AmpC, sendo *E. coli* o principal micro-organismo com esse perfil. Dados similares foram demonstrados por Mo et al. (2016) e Ribeiro et al. (2016), que encontraram cepas de *E. coli* produtoras de AmpC pela detecção do gene *bla*<sub>CMY-2</sub> em mais de 13% isolados de frango de corte e queijos produzidos a partir de leite cru, respectivamente.

### 2.2.8 Biofilmes

Biofilmes são agregados de micro-organismos aderidos e crescendo em uma superfície, nos quais as células são incorporadas em uma matriz autoproduzida formada por substâncias poliméricas extracelulares (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; VERT et al.,



2012). Diversos fatores influenciam a formação e desenvolvimento dos biofilmes, tais como as especificidades das espécies bacterianas, as propriedades da superfície do material e os parâmetros físico-químicos: níveis de nutrientes, temperatura e pH (DONLAN, 2002).

A formação do biofilme é um processo complexo, gradual e dinâmico que consiste na *fixação inicial* ainda fraca e reversível onde as bactérias podem se desprender, seguida pela *fixação irreversível*, ou seja, forma-se uma ligação forte entre as bactérias e a superfície por meio da produção de matriz exopolissacarídica e conseqüentemente ocorre o *desenvolvimento da arquitetura do biofilme* ou formação de microcolônia, *maturação* e *dispersão*, na qual células conseguem se desprender e voltar a vida planctônica (MONROE, 2007; SREY; JAHID; HA, 2013).

Por se tratarem de complexas comunidades bacterianas envoltas por uma matriz extracelular constituída principalmente por polissacarídeos e proteínas, os biofilmes funcionam como barreiras que protegem as bactérias contra os efeitos de desinfetantes e antimicrobianos. Essa proteção pode ser justificada pela difusão dificultada dessas substâncias na matriz polissacarídica e pelo fato que algumas células do biofilme são expostas a concentrações limitadas de nutrientes e, devido a isso, apresentam crescimento lento, o que as tornam menos suscetíveis a determinados agentes antimicrobianos (COSTERTON et al., 1987; COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999; HOBLEY et al., 2015). Além disso, as bactérias podem adquirir novas características genéticas por meio de transferência horizontal de genes (MADSEN et al., 2012).

Os biofilmes são um dos grandes problemas da indústria de alimentos, pois podem ser formados em diferentes tipos de superfícies e se tornam fontes de disseminação de bactérias patogênicas, como *E. coli*, para os alimentos, as quais podem causar doenças nos consumidores (GIAOURIS et al., 2015). O leite e os produtos lácteos são muito suscetíveis a contaminação por biofilmes devido a diversos fatores encontrados na indústria de laticínios, sendo que as principais fontes para essa contaminação são os equipamentos mal higienizados (SREY; JAHID; HA, 2013).

Diversos estudos têm determinado a capacidade de *E. coli* em formar biofilmes. Rodrigues et al. (2010) evidenciaram que *E. coli* isolados de superfícies de contato com alimentos em matadouro de aves eram capazes de produzir biofilmes e, devido a isso, podem persistir nesses ambientes durante o processamento dos alimentos. Dorou et al. (2011) detectaram que *E. coli* O157:H7 são capazes de aderir, sobreviver e crescer em superfícies de contato com alimentos (aço inoxidável e polietileno de alta densidade) sob condições simuladas de processamento de carne bovina. Wang et al. (2016) avaliaram cepas de *E. coli* STEC isoladas

de humanos, ovinos e bovinos e determinaram que todos os isolados eram capazes de formar biofilmes em superfície abiótica, sendo que alguns isolados apresentaram resistência antimicrobiana. Pavlickova et al. (2017) detectaram que 70% de *E. coli* de carnes de frango e animais silvestres resistentes a antimicrobianos eram capazes de formar biofilme, evidenciando uma correlação significativa entre a resistência antimicrobiana e produção de biofilme.

Não existe um consenso entre os cientistas frente a diversidade de técnicas utilizadas para estudos de biofilmes. Vários métodos microbiológicos, químicos, microscópicos, moleculares, entre outros, são utilizados a fim de mensurar a capacidade ou quantificar a produção de biofilmes pelas diferentes espécies bacterianas (AZEREDO et al., 2016). No entanto, o método por placas de microtitulação tem sido um dos mais empregados para determinar a capacidade de formação de biofilmes (AZEREDO et al., 2016; GOMES et al., 2014; MOREIRA et al., 2013).

Ponussamy, Natarajan e Sevanan (2012) compararam os resultados de três metodologias (Ágar vermelho Congo - CRA, Cultura de tecido em placa - TCP e Método do tubo - TM) empregadas para determinar a capacidade de cepas de *E. coli* em produzir biofilmes e os resultados obtidos pelas três técnicas foram similares e correlacionaram a potencial capacidade de formação de biofilme com resistência antimicrobiana dos isolados. Chagas et al. (2017) isolaram *E. coli* de leite oriundo de vacas com mastite e equipamentos de ordenha e determinaram, pelos testes de adesão em microplaca e cultivo em ágar vermelho Congo, que 50% dos isolados foram produtores de biofilme, em ambos, evidenciando que são técnicas rápidas que podem ser utilizadas para mensurar a potencial capacidade de *E. coli* produzir biofilmes. De et al. (2012) verificaram a capacidade de formação de biofilmes de isolados clínicos, incluindo *E. coli*, pelo cultivo em ágar vermelho Congo e afirma que mesmo tendo a desvantagem de ser um método de avaliação subjetiva, é um método simples e economicamente viável e efetivo para a triagem de formação de biofilmes. Dadawala et al. (2010) avaliaram a capacidade de formação de biofilme de *E. coli* pelos métodos de placa de microtitulação e ágar vermelho Congo e evidenciaram variações nos resultados de dois isolados (14,2%) que foram positivos no ágar vermelho congo e negativos no teste em microplaca.

Em contrapartida, Hassan et al. (2011) analisaram a capacidade de formação de biofilme de vários isolados clínicos, dentre eles *E. coli*, por diferentes técnicas e concluíram que o método ágar vermelho Congo apresenta a mesma especificidade (92%) que as outras técnicas (TCP e TM), porém sensibilidade (11%) e acurácia (41%) reduzidas. Yilmaz e Günvensen (2016) compararam a capacidade de produção de biofilmes de quatro cepas de *E. coli* por meio de técnicas qualitativas (Ágar vermelho Congo e Método do tubo) e quantitativas

(Placa de microtitulação e microscopia eletrônica) e os resultados foram discrepantes, pois todos isolados foram positivos para formar biofilmes pelas três técnicas, exceto pelo Ágar vermelho Congo.

### 2.3 *LISTERIA MONOCYTOGENES*

O gênero *Listeria* compreende bacilos Gram-positivos pequenos (1-2µm de comprimento por 0,5 µm de diâmetro), não formadores de esporos, catalase-positivos e oxidase-negativos. As bactérias representantes do gênero apresentam crescimento em condições aeróbias, microaerófilas ou anaeróbias facultativas. Seis espécies fazem parte desse gênero, sendo *L. monocytogenes* considerada potencialmente patogênica para humanos (JAY, 2005; ROCOURT; BUCHRIESER, 2007).

Embora *L. monocytogenes* tenha sido conhecida desde o início do século XX, sua identificação definitiva como espécie bacteriana foi realizada somente em 1940. Essa bactéria apresenta crescimento na faixa de 2,5°C a 44°C, porém existem relatos sobre o crescimento a 0°C. Embora o pH ótimo para o crescimento de *L. monocytogenes* esteja entre 6 e 8, ela pode crescer em uma faixa mais ampla de pH (entre 4,5 e 9,5), além de poder sobreviver em 10,5% e 13% de NaCl quando incubada a 37°C por 15 dias e 10 dias, respectivamente. Porém, em temperatura reduzida (4°C), a bactéria pode sobreviver por mais de 100 dias em concentrações entre 10,5% e 30,5% de NaCl. A atividade de água ótima para seu crescimento é próxima de 0,97, no entanto, é capaz de se multiplicar em atividade de água de 0,92 (considerada baixa para a multiplicação de patógenos) (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Existem treze sorotipos de *L. monocytogenes* conhecidos de acordo com a variação dos antígenos somáticos (O) e flagelares (H), os quais são distribuídos em linhagens genéticas distintas (DOUMITH et al. 2004; SEELEGER; HÖHNE, 1979). No entanto, diferentes designações têm sido utilizadas por diversos autores a fim de agrupar os sorotipos em específicas linhagens de *L. monocytogenes*, utilizando características obtidas por ribotipagem e polimorfismo por RFLP - *Restriction Fragment Length Polymorfism* (ORSI; DEN BAKKER; WIEDMANN, 2011) e uma das designações é mostrada na tabela 3. Mais de 95% dos casos de listeriose humana relatados são causados por isolados dos sorotipos 4b, 1/2a e 1/2b (DOUMITH et al., 2004; KASPER et al., 2009).

**Tabela 3 – Linhagens de *Listeria monocytogenes*.**

<b>Linhagens</b>	<b>Sorotipos</b>	<b>Características genéticas</b>	<b>Distribuição</b>
I	1/2b, 3b, 3c, 4b	Menor diversidade entre as linhagens; Menores níveis de recombinação.	Comumente isolado de várias fontes; Representativo entre os isolados humanos.
II	1/2a, 1/2c, 3a	Maior diversidade; Maiores níveis de recombinação.	Comumente isolado de várias fontes, principalmente em alimentos, ambientes relacionados a alimentos, bem como nos ambientes naturais.
III	4a, 4b, 4c	Muito diverso; Níveis de recombinação intermediários (entre os das linhagens I e II).	A maioria dos isolados são obtidos de ruminantes.
IV	4a, 4b, 4c	Poucos isolados analisados até o momento.	A maioria dos isolados são obtidos de ruminantes.

Fonte: Adaptado de Orsi, den Bakker e Wiedmann (2011).

*Listeria monocytogenes* é amplamente distribuída na natureza, tendo o homem, os animais e o ambiente como possíveis reservatórios (FRANCO; LANDGRAF, 2008; JAY, 2005). Esse micro-organismo é considerado um patógeno intracelular facultativo, pois é capaz de entrar e se multiplicar dentro de macrófagos e outros fagócitos “não profissionais”, como as células epiteliais e hepatócitos (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001a). *L. monocytogenes* é considerado um patógeno oportunista, uma vez que causa uma doença de origem alimentar em humanos, denominada listeriose, que está associada principalmente a pessoas em estágios vulneráveis, tais como idosos, gestantes e demais pessoas imunocomprometidas. Embora rara, essa doença pode ser grave e resultar em aborto, septicemia, meningite, encefalite ou até mesmo ser fatal, pois a taxa de mortalidade da listeriose é estimada entre 20 e 30% (DREVETS; BRONZE, 2008; LECUIT, 2007; VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001a).

Silk et al. (2012) relataram a epidemiologia e incidência de listeriose durante o período de 2004 a 2009 no Estados Unidos e demonstraram que dos 762 casos registrados nesse período, 17% eram associados a gestantes e 53% a pacientes acima de 65 anos, resultando na morte de 140 pacientes. Os produtos cárneos (peito de peru e frango), cachorro quente e produtos lácteos (leite, queijo e iogurte) foram os alimentos consumidos mais relatados pelos pacientes.

### 2.3.1 Fatores de virulência de *Listeria monocytogenes*

A patogenicidade de *L. monocytogenes* é determinada por vários fatores de virulência, tais como: Listeriolisina O (LLO), Internalinas, Fosfolipases, Proteína polimerizadora de actina (ActA), Proteína associada a invasão (p60) e Sistema de regulação da expressão de genes de virulência (PrfA) (LIU, 2006). Os principais fatores de virulência de *L. monocytogenes* até o momento identificados são codificados pelo cromossomo bacteriano e a maioria dos genes de virulência (*hly*, *plcA*, *plcB*, *actA*, *prfA* e *mpl*) estão em uma ilha de patogenicidade denominada LIPI-1 (*Listeria pathogenicity island 1*) (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001b). Já os genes da família das internalinas são codificados na ilha de patogenicidade LIPI-2 (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001a).

LLO, pertencente à família das citolisinas dependentes de colesterol (CDCs), é uma hemolisina, codificada pelo gene *hly*, fundamental para a sobrevivência e multiplicação intracelular de *L. monocytogenes*, pois atua nas membranas dos vacúolos fagocíticos, permitindo a fuga e disseminação da bactéria para as células adjacentes (HAMON et al., 2012; RUAN et al., 2016). Cepas mutantes que não expressam a LLO são consideradas avirulentas em modelos animais de listeriose (GEOFFROY et al., 1987).

A família das internalinas é formada por uma diversidade de proteínas, dentre as quais destacam-se as internalinas A e B (InIA e InIB) que estão envolvidas na internalização de *L. monocytogenes* nas células não fagocíticas. Os processos de invasão induzidos por InIA e InIB são similares, no entanto as duas proteínas seguem diferentes vias de sinalização celular para induzir a internalização bacteriana. A proteína InIA apresenta interação específica com o receptor celular E-caderina, uma glicoproteína encontrada em células epiteliais humanas, tais como as intestinais, os hepatócitos e as presentes na placenta. InIB interage principalmente com o receptor de fator de crescimento de hepatócitos (Met), expresso em uma variedade de tipos celulares (BONAZZI; LECUIT; COSSART, 2009; HAMON; BIERNE; COSSART, 2006). Embora outras proteínas da família das internalinas, tais como InIC e InIJ, estejam envolvidas na virulência de *L. monocytogenes*, suas funções, assim como a das outras proteínas dessa família, ainda não são muito bem esclarecidas. No entanto InIC pode desempenhar um papel em um estágio tardio da infecção (ENGELBRECHT et al., 1996) e parece estar envolvida no processo de disseminação de *L. monocytogenes* entre as células hospedeiras (RAJABIAN et al., 2009).

A proteína ActA secretada por *L. monocytogenes* tem papel essencial na sua movimentação intracelular e disseminação célula-a-célula, pela formação de uma cauda de

actina polimerizada, pois a proteína induz a polimerização de actina na célula hospedeira (CAMERON et al., 1999; KOCKS et al., 1995). *L. monocytogenes* também produz duas fosfolipases C, PlcA e PlcB, que promovem a degradação dos fosfolipídios presentes nas membranas dos fagossomos. Assim, atuam em sinergia com a LLO na lise dos vacúolos fagocitários. PlcB é capaz de degradar a maioria dos fosfolipídios, enquanto que PlcA é específica para fosfatidilinositol (CAMILLI; TILNEY; PORTNOY, 1993; GEDDE et al., 2000).

Um outro fator de virulência de *L. monocytogenes* é uma proteína extracelular, denominada p60, associada a invasão das células hospedeiras (CAMEJO et al., 2011). Essa proteína é codificada pelo gene *iap* (*invasor-associated protein*) e cepas *iap* mutantes apresentam diminuída capacidade de invasão das células epiteliais (KUHN; GOEBEL, 1989; PILGRIM et al., 2003). A proteína PrfA (*positive regulatory factor A*), codificada pelo gene *prfA*, tem função de regulação global dos genes de virulência, pois atua no controle da expressão dos genes de LIPI-1, bem como de vários genes da família das internalinas (VÁZQUEZ-BOLAND et al., 2001a).

### **2.3.2 *Listeria monocytogenes* em alimentos**

*Listeria monocytogenes* tem sido um grande problema na indústria, pois já foi isolado de diferentes alimentos tais como leite cru e/ou pasteurizado (KONGO et al., 2006; MOOSAVY et al., 2014; TELLI et al., 2016), diversos tipos de queijos (FEITOSA et al., 2003; KAHRAMAN et al., 2010; MELO et al., 2013; MENÉNDEZ et al., 2001; PONTAROLO et al., 2017), carnes bovinas, suínas e de aves (IGLESIAS et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2018; WANG et al., 2015), peixes e frutos do mar (FALLAH; SAEI-DEHKORDI; MAHZOUNIEH, 2013) embutidos, produtos cárneos crus e processados (ALMEIDA et al., 2017; DU et al., 2017), vegetais (BYRNE et al., 2016), bem como em ambientes de processamento de alimentos (BARANCELLI et al., 2011; FALLAH; SAEI-DEHKORDI; MAHZOUNIEH, 2013; TAHOUN et al., 2017; TELLI et al., 2016), em porcentagens variando entre 1,9 e 50%.

Vários estudos atuais têm procurado caracterizar o perfil de virulência de *L. monocytogenes* isolados de alimentos por meio de técnicas moleculares com a finalidade de mensurar a potencial capacidade desses isolados em causar listeriose nos consumidores desses alimentos. Coroneo et al. (2016) avaliaram amostras de queijo italiano produzido a partir de leite de ovelha, pois esse produto havia sido retirado de comercialização devido a associação com casos de listeriose nos Estados Unidos, e neste estudo foi detectada contaminação por *L.*

*monocytogenes* em 17,2% das amostras de queijo analisadas, bem como a presença dos genes de virulência *actA* e *prfA* (100%), *hly* (83%), *inlA* (60%), *inlB* e *iap* (47%), *plcB* (40%) e *plcA* (20%) nesses isolados. Khedr, Elmonir e Sobeih (2016) isolaram *L. monocytogenes* em 2% das amostras de leite (de vaca, cabra, ovelha e camelo) analisadas no Egito e detectaram a presença dos genes de virulência *inlA*, *inlB* e *hly* em 100%, 75% e 75% dos isolados, respectivamente. Du et al. (2017) analisaram comida chinesa congelada e pronta para consumo na China e observaram a presença de *L. monocytogenes* em 2,3% das amostras, sendo que todos os isolados foram positivos para os genes de virulência *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *prfA*, *plcB* e *hly*, enquanto que os demais genes foram detectados em diferentes porcentagens (*actA* – 90,5%; *plcA* e *iap* – 76,2%).

Almeida et al. (2017) analisaram *L. monocytogenes* isolados de diferentes tipos de alimentos (produtos lácteos, salsichas, carnes, saladas e outros alimentos prontos para o consumo) no Brasil durante o período de 1975 a 2013, e os genes de virulência (*hly*, *inlA*, *inlB*, *inlC*, *inlJ*, *actA*, *plcA* e *prfA*) foram identificados em todos os isolados. Resultados similares, em que os genes de virulência analisados estavam presentes em todos os isolados analisados, foram detectados por Iglesias et al. (2017) em *L. monocytogenes* isolados de carcaças bovinas no Brasil, bem como por Jamali, Radmehr e Thong (2013) em *L. monocytogenes* isolados de leite cru de vaca, ovelha e cabra no Irã.

A presença de *L. monocytogenes* em leite e derivados ocorre, provavelmente, pela falta ou falha no processo de pasteurização, bem como por posterior contaminação com cepas do ambiente de produção, pois os protocolos padrões de pasteurização são adequados para a destruição de *L. monocytogenes* em níveis de  $10^5$  a  $10^6$ /mL, tanto em estado livre quanto no estado intracelular (CAGRI-MEHMETOGLU et al., 2011; JAY, 2005). Esse micro-organismo encontra nos queijos um ambiente apropriado para sua sobrevivência, o que faz com que persistam tanto no produto, como no ambiente de processamento. Assim, devido as habilidades específicas desse patógenos de superar os obstáculos do processamento, seu controle continua sendo um desafio (MELO; ANDREW; FALEIRO, 2015), pois linhagens de *L. monocytogenes* tem persistido por anos ou décadas em ambientes de processamento de alimentos (FERREIRA et al., 2014), e essa persistência pode ser tanto por sobrevivência e crescimento desse micro-organismo em superfícies de difícil higienização ou por repetida reintrodução desse micro-organismo do ambiente externo para esses locais, por meio de matéria-prima, equipamentos ou pelas pessoas (BUCHANAN et al., 2017).

### 2.3.3 Resistência antimicrobiana

*Listeria monocytogenes* é normalmente suscetível à inúmeros antibióticos, no entanto, vem ocorrendo um aumento de cepas, isoladas de alimentos, resistentes aos antimicrobianos utilizados no tratamento da listeriose humana, uma vez que as bactérias podem desenvolver mecanismos de resistência ou adquirir resistência através da transmissão de material genético de outros gêneros bacterianos (GÓMEZ et al., 2014).

Nesse sentido, Toomey et al. (2009) demonstraram que genes de resistência antimicrobiana podem ser transferidos de bactérias ácido-láticas para patógenos em matriz de leite integral fermentado, pois a resistência à eritromicina foi transferida dessas para *L. monocytogenes*, mas não para outras bactérias como *E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella spp.* Bertsch et al. (2013) mostraram a transferência conjugativa de um transposon Tn6198, codificando resistência a trimetoprim entre *Enterococcus faecalis* e *L. monocytogenes*. O que demonstra a susceptibilidade de *L. monocytogenes* na aquisição de resistência antimicrobiana por meio da transmissão de material genético de outros gêneros.

Embora os mecanismos de seleção e manutenção dos fenótipos de resistência sejam menos conhecidos em *L. monocytogenes* do que em outros patógenos notáveis, é provável que ocorra a disseminação de elementos genéticos móveis que codifiquem genes de resistência aos antimicrobianos de outros micro-organismos no ambiente de processamento de alimentos, pois esses ambientes, quando contaminados, podem criar condições nas quais diversos gêneros bacterianos entram em contato e têm tempo suficiente para que ocorra a troca de material genético, particularmente em produtos com tempo de prateleira prolongado (ALLEN et al., 2016).

Diversos estudos recentes têm demonstrado a presença de *L. monocytogenes* multirresistentes aos antimicrobianos. Taxa de até 10% de *L. monocytogenes* multirresistentes, isolados de alimentos, foram encontrados por Gómez et al. (2014), Doménech et al. (2015), ambos na Espanha e Iglesias et al. (2017), no Brasil. Já Fallah, Saei-Dehkordi e Mahzounieh (2013) no Irã, Kevenk e Gulel (2016) na Turquia, bem como Noll, Kleta e Al Dakouk (2017) na Alemanha, registraram índices de *L. monocytogenes* multirresistentes isolados de alimentos variando entre 20 e 40%, enquanto que Jamali, Radmehr e Thong (2013) no Irã, e Wang et al. (2015) na China, encontraram multirresistência entre 50 e 75% dos isolados. Adicionalmente, Khedr, Elmonir e Sobeih (2016) e Tahoun et al. (2017) detectaram índices de multirresistência antimicrobiana superiores a 85% em *L. monocytogenes* isolados de alimentos no Egito.



*L. monocytogenes* isolados de alimentos têm sido relatados com altas taxas de resistência aos antimicrobianos de várias classes, tais como beta-lactâmicos, tetraciclina, sulfonamidas, quinolonas, aminoglicosídeos, macrolídeos e lincosaminas e os dados de alguns estudos atuais que demonstram isso são relatados na tabela 4.

**Tabela 4 – Taxa de resistência antimicrobiana de *L. monocytogenes* isolados de alimentos relatados em estudos recentes.**

Descrito por:	<i>Listeria monocytogenes</i> isolados de:	Índices de Resistência antimicrobiana (Considerando resistência intermediária)			
		1 – 20%	21 – 50%	51 – 70%	71 – 100%
Harakeh et al. (2009)	Produtos lácteos.	GEN, SUT, TET.	CLI, ERI, VAN.	AMP, CLO.	PEN, OXA.
Fallah, Saei-Dehkordi e Mahzounieh (2013)	Produtos com frutos do mar e ambiente de processamento.	CIP, CLI, CLO, EN, ERI, SUT, TET	AMP, PEN, VAN.	–	–
Jamali, Radmehr e Thong (2013)	Leite cru de vaca, ovelha e cabra.	CLI, ERI.	AMC, CLO.	PEN.	TET.
Gómez et al. (2014)	Produtos prontos para consumo e ambiente de processamento.	PEN.	CLI.	–	OXA.
Doménech et al. (2015)	Queijo, linguiça de porco, sorvete e salmão.	AMC, AMP, ERI, SUT.	AMI, CEF, CIP, TET, VAN.	–	–
Wang et al. (2015)	Carne de porco.	AMP, CIP, CTX, ERI, EST, GEN, RIF, SUT, TOB.	AMI, CLO, TET.	–	–
Byrne et al. (2016)	Vegetais.	–	PEN, TET.	–	–
Du et al. (2016)	Comida chinesa (carnes e vegetais)	CIP, DOX.	NIT, SUT, TET.	–	AMP, CLI, CLO, CFR, CFX, CTX.

**Tabela 4 – Taxa de resistência antimicrobiana de *L. monocytogenes* isolados de alimentos relatados em estudos recentes (Continuação).**

El Banna et al. (2016)	Queijos, vegetais, sorvete, hambúrguer.	AMC, CLO.	AMI, ERI, GEN, TET, VAN.	AMP, CIP.	AMO, CAZ, CEP, CRO, CTX, EST, NOR.
Kevenk e Gulel (2016)	Leite cru e produtos lácteos	AMC	AMP, CLO, ERI, PEN, TET, VAN.	–	–
Khedr, Elmonir e sobeih (2016)	Leite cru de vaca, ovelha, cabra e camelo.	–	RIF.	–	AMP, CEF, ERI, SUT, TET.
Telli et al. (2016)	Leite cru e pasteurizado.	–	CLO.	EST, ERI.	–
Iglesias et al. (2017)	Carcaça bovina	CAN, ERI, GEN.	–	CLI.	SUT.
Noll, Kleta e Al Dakouk (2017)	Alimentos, ambientes de processamento e humanos.	CIP, CRO, ERI, GEN, MER, PEN, RIF, SUT.	TET, TIG.	–	DAP.
Tahoun et al. (2017)	Leite cru, equipamentos e manipuladores.	ERI, SUT.	–	CIP.	CLI, DAP, DOX, GEN, RIF, TET.
Oliveira et al. (2018)	Carcaças de frango	–	CLI.	–	–

AMC – Amoxicilina com Clavulanato, AMI – amicacina, AMO – Amoxicilina, AMP – Ampicilina, CAN – Canamicina, CAZ – Ceftazidima, CEF – Cefalotina, CEP – Cefepima, CFR – Cefuroxima, CFX – Cefoxitina, CIP – Ciprofloxacina, CLI – Clindamicina, CLO – Cloranfenicol, CRO – Ceftriaxona, CTX – Cefotaxima, DAP – Daptomicina, DOX – Doxaciiclina, EN – Enrofloxacina, ERI – Eritromicina, EST – Estreptomina, GEN – Gentamicina, MER – Meropenem, NIT – Nitrofurantoína, NOR – Norfloxacina, OXA – Oxacilina, PEN – Penicilina, RIF – Rifampicina, SUT – Sulfametoxazol-Trimetoprim, TET – Tetraciclina, TIG – Tigeciclina, TOB – Tobramicina, VAN – Vancomicina. Fonte: Elaborado pelo autor, 2018.

### 3 ARTIGO 1

(*Submetido ao periódico International Journal of Food Microbiology*)

#### **Detection of virulence genes and antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* isolates from raw milk and artisanal cheese in Southern Brazil**

##### 3.1 ABSTRACT

The serrano artisanal cheese is a typical product from South region of Brazil, which is produced by skilled cheesemakers using raw milk. The contamination of this food by *E. coli* has a great impact on public health, since it could threaten the consumers' health. This study examined *E. coli* isolates, obtained from raw milk and serrano artisanal cheese produced in the South region of Brazil, through analyses of their phenotype, antimicrobial profile and virulence genes. A total of 117 isolates of *E. coli* were characterized by multiplex PCR to detect the following virulence genes: *eae* for EPEC, *lt* and *st* for ETEC, *stx* for EHEC, *ipaH* for EIEC, and *aggR* for EAEC. In addition, antimicrobial susceptibility profile to 23 antimicrobial agents was also performed by disk diffusion method, and we searched for ESBL and/or carbapenemase-producing isolates. Isolates that were positive for ESBL and carbapenemase were further investigated for the presence of the genes: *Bla<sub>TEM</sub>*, *Bla<sub>SHV</sub>*, *Bla<sub>OXA</sub>*, *Bla<sub>CTX-M</sub>*, and *Bla<sub>OXA-48</sub>*. Further, isolates had their ability to form biofilms investigated by the red Congo agar method. Virulence genes of *E. coli* were identified in 21.36% of the tested isolates, which were classified as EPEC (the most prevalent pathotype) and ETEC or EAEC. Ten (8.55%) of the total studied *E. coli* isolates revealed a multidrug-resistant profile, since they were resistant to three or more antimicrobial classes; whereas four isolates (3.41%) were classified as ESBL-producers and showed the presence of *Bla<sub>TEM</sub>* gene. None of the isolates exhibited carbapenemase activity nor did they carry carbapenemase genes, but 67.52% of them were considered potential biofilm producers. These results address a serious public health issue, since artisanal cheeses pose a risk to consumers' health, and also emphasize the need to improve adaptations/adjustments in the manufacturing processes of these products.

**Keywords:** Diarrheagenic *E. coli*; multi-drug resistance; ESBL; biofilm.

##### 3.2 INTRODUCTION

The serrano artisanal cheese is a traditional product from the highland fields in the South region of Brazil. The production is characterized by the use of raw milk from dairy cattle that grazed on natural pastures of its own rural property (Pereira et al., 2014). Besides the possibility of raw milk to contain potentially harmful microorganisms to human health (Nobili et al., 2016; Ntuli et al., 2016), serrano artisanal cheese is often produced under poorly hygienic conditions, posing at risk the health of consumers (Melo et al., 2013; Pontarolo et al., 2017; Souza et al., 2003; Zaffari et al., 2007).

Previous studies showed *Escherichia coli* as one of the major contaminant found in serrano

artisanal cheese, produced in the Serrana region of Santa Catarina state, where the contamination rates found were above 45% (Melo et al., 2013; Pontarolo et al., 2017). Although several strains of *E. coli* are considered commensal, there are pathogenic strains that cause serious gastrointestinal infections in humans and are called diarrheagenic *E. coli* (Yang and Wang, 2014).

The diarrheagenic strains of *E. coli* produce specific virulence factors that ease their interaction with the host. For that reason, it is important to distinguish pathogenic *E. coli* types, such as: enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC) and enteroaggregative *E. coli* (EAEC), from those nonpathogenic (Gyles and Fairbrother, 2010; Yang and Wang, 2014). This distinction has epidemiological and clinical implications for the control of diarrhoeal diseases (Girão et al., 2006), and it can be done through the detection of virulence factors, which are exclusive to each pathotype.

EPEC causes *attaching-effacing* (A/E) lesions on host cells by the action of the intimin, an adhesion protein expressed on the bacterial cell surface codified by the gene *eae* (*E. coli attaching-effacing*), located on bacterial chromosomal pathogenicity island, the locus of enterocyte effacement (LEE) (Kaper et al., 2004; Mainil, 2013). EHEC is characterized by the production of at least one member of a class of potent Shiga toxin (*stx1* or *stx2*). The *stx* genes are located on the chromosome within the sequence for an inducible, lysogenic lambda-like bacteriophage, suggesting their ability to transfer genes from cell to cell via transduction (Gyles, 2007; Yang and Wang, 2014). ETEC produce heat-stable (*st*) and/or heat labile (*lt*) enterotoxins. The genes responsible for encoding the production of the afore mentioned toxins are located in a plasmid (pEnt), which could be transferred to nonpathogenic (Gyles and Fairbrother, 2010; Kaper et al., 2004). EIEC have protein effects known as *IPAs* (invasion plasmid antigen), which are encoded by genes located in the plasmid INV and are related to adhesion and invasion of intestinal epithelial cells (Sasakawa, 2010; Small and Falkow, 1988). EAEC exhibit the presence of genes that codify aggregative adherence, leading to the expression of *aggR* gene. This transcriptional activator is responsible for the expression of plasmid-borne and chromosomal virulence factors. For this reason, detection of *aggR* gene can be used to characterize EAEC strains (Brüssow, 2014; Harrington et al., 2006).

Not only the identification of virulence factors in *E. coli*, but also the investigation of antimicrobial susceptibility profile, are of utmost importance, since these microorganisms are often involved in serious human infections (Slama et al., 2010) and, bacterial dissemination is considered highly associated with processing production, transformation, manufacturing and

trade of food (Kirbis and Krizman, 2015). Studies worldwide have demonstrated serious concern about the alarming antimicrobial resistance index, and the number of multi-drug resistant *E. coli* strains isolated from raw and pasteurized milk (Ntuli et al., 2016), dairy products (Guillén et al., 2014; Nobili et al., 2016) and other types of food (Gómez-Aldapa et al., 2016; Wang et al., 2017).

One of the major resistance mechanisms developed by *E. coli* to adapt to antibiotic is the hydrolysis of the  $\beta$ -lactam ring through enzymes, defined as extended-spectrum beta-lactamases (ESBL), that confer resistance to antimicrobials from  $\beta$ -lactam class, including penicillins, cephalosporins and monobactams (ECDC, 2013; Pfeifer et al., 2010). However, these enzymes are not able to hydrolyse cephamycins and carbapenems, and could be inactivated by the action of beta-lactamase inhibitors (clavulanic acid, sulbactam and tazobactam) (Lee et al., 2012; Paterson and Bonomo, 2005).

The ESBLs are classified into three major distinct structural and evolutionary families such as TEM, SHV and CTX-M (Bush and Jacoby, 2010). The genes, encoding this type of antimicrobial resistance, are located in conjugative plasmids or integron systems, and could be exchanged readily between enterobacteria species, facilitating their dissemination (Carattoli, 2013; Woodford et al., 2011). Current studies have reported the presence of ESBL producing *E. coli* in food, such as meat, milk and different types of cheese (Gundogan and Avci, 2013; Su et al., 2014; Tekiner and Ozpinar, 2016; Vrabec et al., 2015).

Once beta-lactam resistant *E. coli* strains have become a global emerging problem in the last few years, carbapenems remain the last therapy option against human infections, including those caused by ESBL-producing bacteria (Genc et al., 2016; Spellberg et al., 2011). However, there are already reports of carbapenem resistance due to occurrence of enzymes named as carbapenemases (Thomson, 2010). Several types of carbapenemases were already described among *Enterobacteriaceae*, such as *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC); zinc cofactor dependent carbapenemases known as metallo-beta-lactamases (MBL); oxacilinases (OXAs) (Nordmann et al., 2011; Tzouvelekis et al., 2012); and cephalosporinases (AmpC) associated with the loss of porin (Nordmann et al., 2012).

Another factor that can contribute to antimicrobial resistance is the ability of different microorganisms to form biofilms (Kragh et al., 2016). Several studies have recognized the potential of *E. coli* to form biofilms, which represents an important issue not only for the treatment of infections caused by this pathogen but also for food processing environments (Culler et al., 2014; Ponnusamy et al., 2012; Silagyi et al., 2009).

The purpose of this study was to evaluate *E. coli* isolates, obtained from raw milk and serrano artisanal cheese produced in the South region of Brazil (Santa Catarina State), through analyses of their phenotype, antimicrobial profile and presence of virulence genes.

### 3.3 MATERIAL AND METHODS

#### 3.3.1 *Bacterial isolates*

A total of 117 samples of *Escherichia coli* isolated from raw milk (n=8) and serrano artisanal cheese (n=109) were evaluated. These isolates were obtained from previous studies carried out by Melo et al. (2013), Pontarolo et al. (2017) and Dalmina et al. (2017 – unpublished data) at Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA) at Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), in cooperation with serrano artisanal cheese producers from Santa Catarina, South region of Brazil.

#### 3.3.2 *Bacterial DNA extraction*

DNA extraction of isolates and reference strains (to assure quality control) was performed according to protocol described by Doyle and Doyle (1987) with some modifications. Bacterial isolates were cultivated in Brain Heart Infusion (BHI) broth at 37°C for 24h, and consequently stored at -20°C. An aliquot of 200 µL of each bacterial inoculum was transferred to a sterile microtube, and 500µl of chloroform: isoamyl alcohol (24:1) were added. The microtubes were placed in a water-bath at 56°C for 30 min. After incubation period, microtubes were centrifuged for 10 min at 12,000 rpm. The supernatant of each sample was transferred to another sterile microtube, and supplemented with 600µL of 70% alcohol. The samples were further centrifuged for 20 min at 13,500 rpm. Then, supernatant was discarded by inversion and the pellet was dried off at room temperature. Finally, DNA samples were resuspended in 200µL of sterile Milli-Q water.

#### 3.3.3 *Detection of virulence genes*

Detection of *E. coli* virulence genes was performed through an adapted Multiplex PCR based on protocols described by Toma et al. (2003) and López-Saucedo et al. (2003), using the primers listed in Table 1. PCR amplifications were conducted in a 25µL final volume containing PCR

buffer (Tris-HCl - 20mM, KCl - 50mM), MgCl<sub>2</sub> (2mM), dNTP (200mM of each), *Taq* DNA polymerase (0.5U), primers (4 pmol of each) and 2µl bacterial DNA. All reagents were purchased from Invitrogen® (Carlsbad, USA) and reactions were carried out in Thermal Cycler Applied Biosystem (model MJ96, Thermo Fisher, USA). The PCR program was carried as follows: initial denaturation at 95 °C for 5 min, 40 cycles of denaturation at 95 °C for 45s, annealing at 50 °C for 45s, extension at 72 °C for 45s, and final extension at 72 °C for 10 min. Amplification products were analyzed by electrophoresis (100V, 300mA) for 1h using 2% agarose gel. PCR products were stained with GelRed™ and visualized on transilluminator (Kasvi, model K33-312, Brazil). The reference strains *Escherichia coli* INCQS 00170 (ATCC 43893) – EIEC; *Escherichia coli* INCQS 00171 (ATCC 43895) – EHEC; *Escherichia coli* INCQS 00180 (CDC O111ab) – EPEC (*Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz*); *Escherichia coli* ATCC 35401 – ETEC; *Escherichia coli* 3929 – L0815 – EAEC (*Instituto Adolfo Lutz*) were used as positive controls to assure quality control of the assays. *Escherichia coli* ATCC 25922 reference strain was used as a negative control.

**Table 1.** List of primers used in Multiplex PCR for detection of virulence genes in *E. coli* isolates.

<i>E. coli</i> (pathotype)	Gene	Primer	Sequence of oligonucleotides (5'- 3')	Size of amplicon (bp)	Described by:
EPEC	<i>eae</i>	<i>SK1</i>	CCCGAATTTCGGCACAAGCATAAGC	881	Oswald et al. (2000)
		<i>SK2</i>	CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTCG		
EHEC	<i>stx</i>	<i>Vtcom-u</i>	GAGCGAAATAATTTATATGTG	518	Yamasaki et al. (1996)
		<i>Vtcom-d</i>	TGATGATGGCAATTCAGTAT		
ETEC	<i>st</i>	<i>st-F</i>	ATTTTTCTTTCTGTATTGTCTT	190	López-Saucedo et al. (2003)
		<i>st-R</i>	CACCCGGTACARGCAGGATT		
	<i>lt</i>	<i>lt-F</i>	GGCGACAGATTATACCGTGC	450	
		<i>lt-R</i>	CGGTCTCTATATTCCCTGTT		
EIEC	<i>ipaH</i>	<i>ipaIII</i>	GTTCCCTTGACCGCCTTCCGATACCGTC	619	Sethabutr et al. (1993)
		<i>ipaIV</i>	GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC		
EAEC	<i>aggR</i>	<i>aggRks1</i>	GTATACACAAAAGAAGGAAGC	254	Ratchtrachenchai et al. (1997)
		<i>aggRks2</i>	ACAGAATCGTCAGCATCAGC		

### 3.3.4 Determination of antimicrobial susceptibility

Susceptibility of isolates to antimicrobial agents was determined by disk diffusion method, following the guidelines of Clinical and Standards Institute (CLSI), which recommend the use of plates containing Muller-Hinton (CLSI, 2015). The plates were incubated for approximately 16-18h at  $35 \pm 2^\circ\text{C}$ . All isolates were examined for susceptibility to the following antimicrobial agents: amoxicillin-clavulanate – AMC (20/10 $\mu\text{g}$ ), aztreonam – ATM (30 $\mu\text{g}$ ), cefepime – CPM (30 $\mu\text{g}$ ), ceftazidime – CAZ (30 $\mu\text{g}$ ); ceftriaxone - CRO (30 $\mu\text{g}$ ), cefotaxime – CTX (30 $\mu\text{g}$ ), meropenem – MER (10 $\mu\text{g}$ ), imipenem – IPM (10 $\mu\text{g}$ ), ceftiofur – CFO (30 $\mu\text{g}$ ), ampicillin – AMP (10 $\mu\text{g}$ ), tetracycline – TET (30 $\mu\text{g}$ ), doxycycline – DOX (10 $\mu\text{g}$ ), ciprofloxacin – CIP (5 $\mu\text{g}$ ), norfloxacin – NOR (10 $\mu\text{g}$ ), levofloxacin – LVX (5 $\mu\text{g}$ ), tobramycin – TOB (10 $\mu\text{g}$ ), gentamicin – GEN (10 $\mu\text{g}$ ), neomycin – NEO (30 $\mu\text{g}$ ), amikacin – AMI (30 $\mu\text{g}$ ), streptomycin – EST (10 $\mu\text{g}$ ), chloramphenicol – CLO (30 $\mu\text{g}$ ), trimethoprim/sulfamethoxazole – SUT (1.25/23.75 $\mu\text{g}$ ) and nitrofurantoin – NIT (300 $\mu\text{g}$ ). Inhibition zone diameters of microbial growth were measured and interpreted according to the breakpoints recommended by CLSI (2018). Isolates reported with an intermediate resistance for certain antimicrobial agents were considered resistant for statistical purposes, since the use of such antibiotics are not advisable for clinical treatment. *Escherichia coli* ATCC 25922 strain was used as quality control to determine susceptibility to antimicrobial agents.

### 3.3.5 Phenotypic and genotypic characterization of isolates producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)

Screening for ESBL-producing *E. coli* isolates was carried out by the disk diffusion test as recommended by CLSI (2018). To perform this test, one amoxicillin-clavulanate disk was placed in the center of a Mueller-Hinton agar plate, and at a distance of 30 mm other disks of beta-lactam were added: ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone, cefepime and aztreonam. The plate was incubated for 24h at  $37^\circ\text{C}$ . After incubation, it was considered an indicative that a sample was ESBL-producer if there was an increase of the inhibition zone or the formation of a ghost zone, followed by distortion of the inhibition zone around the  $\beta$ -lactam disk. The isolates that showed a phenotypic ESBL-producing profile were further investigated by multiplex PCR as described by Dallenne et al. (2010) with some modifications. One PCR approach was to detect the presence of the genes *Bla*<sub>TEM</sub>, *Bla*<sub>SHV</sub>, *Bla*<sub>OXA-1</sub>, whereas the other focused on the genes *Bla*<sub>CTX-M-1</sub>, *Bla*<sub>CTX-M-2</sub> e *Bla*<sub>CTX-M-9</sub>, using the primers listed in Table 2.



**Table 2.** List of primers used in PCR for detection of ESBL-producing *E. coli* isolates.

<i>β</i> -lactamase	Primer	Sequence of oligonucleotides (5'-3')	Size of amplicon (bp)	Described by:
<i>Bla</i> <sub>TEM</sub> ( <i>Bla</i> <sub>TEM-1</sub> and <i>Bla</i> <sub>TEM-2</sub> )	MultiTSO-T_for MultiTSO-T_rev	CATTTCGGTGTGCGCCCTTATTC CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	800	
<i>Bla</i> <sub>SHV</sub> ( <i>Bla</i> <sub>SHV-1</sub> )	MultiTSO-S_for MultiTSO-S_rev	AGCCGCTTGAGCAAATTA AAC TCCCCGAGATAAATCACCAC	713	
<i>Bla</i> <sub>OXA</sub> ( <i>Bla</i> <sub>OXA-1</sub> , <i>Bla</i> <sub>OXA-2</sub> and <i>Bla</i> <sub>OXA-30</sub> )	MultiTSO-S_for MultiTSO-S_rev	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG GACCCCAAGTTTCCTGTAAAGTG	564	Dallenne et al. (2010)
<i>Bla</i> <sub>CTX-M</sub> group 1 ( <i>Bla</i> <sub>CTX-M-1</sub> , <i>Bla</i> <sub>CTX-M-3</sub> and <i>Bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> )	MultiCTXMGp1_f MultiCTXMGp1-2r	TAGGAARTGTGCCGCTGYA CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	688	
<i>Bla</i> <sub>CTX-M</sub> group 2 ( <i>Bla</i> <sub>CTX-M-2</sub> )	MultiCTXMGp2_f MultiCTXMGp1-2r	CGTTAACGGCACGATGAC CGATATCGTTGGTGGTRCCAT	404	
<i>Bla</i> <sub>CTX-M</sub> group 9 ( <i>Bla</i> <sub>CTX-M-9</sub> and <i>Bla</i> <sub>CTX-M-14</sub> )	MultiCTXMGp9_f MultiCTXMGp9_r	TCAAGCCTGCCGATCTGGT TGATTCTCGCCGCTGAAG	561	

To detect these genes, PCR mix contained PCR buffer (Tris-HCl - 20mM, KCl - 50mM), MgCl<sub>2</sub> (1.5mM), dNTP (200mM of each), primers (4 pmol of each) and bacterial DNA (2µl) to result in a final volume of 25 µL. Thermal cycling parameters for the genes *Bla*<sub>TEM</sub> and *Bla*<sub>SHV</sub>, as well as for *Bla*<sub>CTX-M1</sub>, *Bla*<sub>CTX-M2</sub> and *Bla*<sub>CTX-M9</sub> were as follows: initial denaturation step at 94°C for 10 min, followed by 40 cycles of 94°C for 40s, 56°C for 40s and 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 7 min. Amplified fragments were separated electrophoretically (100V,

300mA) for 1h using 2% agarose gel. Amplicons were stained with GelRed™ and visualized on transilluminator. *Klebsiella pneumoniae* CCBH5991 and *Klebsiella pneumoniae* CCBH15948 (both kindly donated by the *Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz*) were used as positive quality control to detect the genes *Blat<sub>TEM+</sub>*, *Blas<sub>HV+</sub>*, *Blact<sub>CTX-M+</sub>* and *Bla<sub>OXA+</sub>*. *Escherichia coli* ATCC 25922 reference strain was used as a negative control.

### 3.3.6 Phenotypic and genotypic characterization of carbapenemase-producing isolates

The isolates that exhibited resistance or intermediate resistance to carbapenems were further investigated. We placed meropenem and imipenem disks non-supplemented and supplemented with EDTA, cloxacillin (CLOX) and phenylboronic acid (PhBA) on Mueller Hinton agar petri dishes. The interpretation consisted on checking if: a) isolates with an inhibition zone difference  $\geq 5$ mm for imipenem or meropenem supplemented with EDTA (compared to non-supplemented) were considered potential metallo-beta-lactamase (MBL); b) isolates with an inhibition zone difference  $\geq 5$ mm for carbapenem supplemented with phenylboronic acid in comparison to any substrate (imipenem or meropenem) were considered potential *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) producers; c) Inhibition zone difference  $\geq 5$ mm for antimicrobial disks supplemented with CLOXA and AFB (compared to non-supplemented substrate) were classified as plasmid-mediated AmpC; d) If zone difference ( $< 5$ mm) for non-supplemented and supplemented antimicrobial disks was observed, isolates were possibly considered producers of other  $\beta$ -lactamase (ex. OXA-48) or exhibited porin loss (Anvisa, 2013). After phenotypic screening, PCR was carried out to detect the presence of the gene *Bla<sub>OXA-48-LIKE</sub>* using the following pair of primers: forward (5' GCTTGATCGCCCTCGATT 3') and reverse (5' GATTTGCTCCGTGGCCGAAA 3') (Dallenne et al., 2010). *Klebsiella pneumoniae* CCBH23559 (*Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz*) and *Escherichia coli* ATCC 25922 reference strains was used as positive and negative quality control, respectively.

### 3.3.7 Evaluation of biofilm-production ability by Congo red agar

Biofilm formation of *E. coli* isolates was performed by the inoculation method in Congo red agar as described by Freeman et al. (1989). The isolates were cultivated into plates containing Congo red agar and incubated for 24h at 37°C under aerobic conditions. Isolates considered biofilm producer formed black colonies with a dry crystalline consistency, while the non-

biofilm producer ones formed red colonies with a smooth and darkened appearance in the center.

### 3.4 RESULTS AND DISCUSSION

The virulence genes were identified in 25 out of the 117 studied isolates (21.36%) and three pathotypes of *E. coli* were found. EPEC was the most prevalent pathotype, since 15 isolates (12.82%) exhibited the presence of gene *eae*. ETEC was detected in 8 isolates (6.83%) by the presence of of gene *st* and/or *lt*, while EAEC was identified in 2 isolates (1.71%) that were positive for gene *aggR* (table 3). These results were similar to several previous studies, like the one conducted by Holko et al. (2006). They found virulence gene in 9.47% of the *E. coli* isolates obtained from cheese produced by raw milk in Slovakia, being EPEC the most prevalent pathotype. Altalhi and Hassan (2009) detected the presence of gene *eae*, typically found in EPEC strains, in 9.1% of samples of raw milk and raw dairy products analyzed in Saudi Arabia. Further, Canizalez-Roman et al. (2013) investigated the frequency of diarrheagenic *E. coli* strains isolated in different types of food in Mexico, and among the analyzed dairy products, EPEC was the most prevalent (9.1%) pathogenic type, whereas EAEC and ETEC were detected in 1.4% and 0.7% of strains, respectively. On the other hand, Campos et al. (2018) detected only the presence of a single diarrheagenic *E. coli* isolate (2.56%), characterized as EPEC, in different types of cheese produced with raw milk in Brazil. Ombarak et al. (2016) observed a high bacterial contamination rate of raw milk and raw cheese by potentially pathogenic *E. coli* isolates in Egypt due to the presence of virulence genes, being EPEC detected in only one sample (0.90%).

The presence of EPEC, ETEC and EAEC in samples of raw milk and artisanal cheese points major flaws in hygienic and sanitary measures adopted by the producers, not only at the milk collection but also during the processing (manufacture) of cheese, since the isolation of these microorganisms is reported in a wide range of animals used for food production (Hernandes et al., 2009), such as dairy cattle (Tóth et al., 2009; Monaghan et al., 2013), and humans are considered the main hosts/reservoirs for these pathotypes (Hu and Torres, 2015; Yang and Wang, 2014). Such types of food could be directly or indirectly contaminated by faeces of humans and/or infected animals, which become carriers and promote transmission of diarrheagenic *E. coli* isolates to consumers. Consequently, the consumption of such products might result in foodborne illness, an important public health issues, since subclinical, severe or

fatal infections could be caused/developed in children and adults (Dubreuil, 2014; Yang and Wang, 2014).

**Table 3.** Profile of *E. coli* isolates from raw milk and serrano artisanal cheese that exhibited virulence genes.

<i>Isolate *</i>	<i>E. coli</i> ( <i>pathotype</i> )	<i>Virulence</i> <i>gene</i>	<i>Antimicrobial resistance</i>	<i>ESBL</i> ( <i>gene</i> )	<i>Biofilm**</i>
1M	EPEC	<i>eae</i>	-	-	-
2M	EPEC	<i>eae</i>	AMC, CFO, AMP	-	+
3M	EPEC	<i>eae</i>	EST	-	+
4C	EPEC	<i>eae</i>	AMP, TET, DOX, EST	-	-
5C	EPEC	<i>eae</i>	AMC, CFO, TET, DOX, EST	-	+
6C	EPEC	<i>eae</i>	TET, DOX, EST	-	+
7C	EPEC	<i>eae</i>	TET, DOX, EST	-	-
8C	EPEC	<i>eae</i>	GEN	-	+
9C	EPEC	<i>eae</i>	EST, NIT	-	+
10C	ETEC	<i>st; lt</i>	AMC, IPM, CFO, TET	-	+
11C	EPEC	<i>eae</i>	-	-	-
12C	ETEC	<i>st</i>	NIT	-	-
13C	EPEC	<i>eae</i>	-	-	+
14C	EPEC	<i>eae</i>	-	-	+
15C	ETEC	<i>st</i>	EST	-	+
16C	EAEC	<i>aggR</i>	CFO, EST	-	+
17C	ETEC	<i>st; lt</i>	-	-	+
18C	ETEC	<i>st; lt</i>	-	-	-
19C	EPEC	<i>eae</i>	-	-	+
20C	EAEC	<i>aggR</i>	AMP, TET, DOX, CIP, SUT	-	+
21C	ETEC	<i>st</i>	DOX, EST	-	-
22C	EPEC	<i>eae</i>	AMC, ATM, CPM, CAZ, CRO, CTX, CFO, AMP	<i>Bla</i> <sub>TEM</sub>	+
23C	ETEC	<i>st</i>	-	-	-
24C	ETEC	<i>st</i>	-	-	+
25C	EPEC	<i>eae</i>	-	-	-

\* *M* – Milk; *C*– Cheese; \*\* Congo red test: (-) negative; (+) positive.

The antimicrobial susceptibility profile of 117 *E. coli* isolates, using 23 antibiotics, was phenotypically defined by disk diffusion method. In general, 62 isolates (52.99%) were considered susceptible to the tested antimicrobial agents. The results indicated that all isolates

were susceptible to meropenem, norfloxacin, levofloxacin, tobramycin, neomycin, amikacin and chloramphenicol (Table 4). A total of 10 isolates (8.55%), all originally from cheese samples, exhibited a multi-drug resistance profile, which means they were resistant to three or more antimicrobial classes. On the other hand, 21 isolates (17.95%), two obtained from milk samples and the others from cheese, were resistant to two antimicrobial classes. These results were similar to the findings described by Guillén et al. (2014), which detected multiresistance in 11.1% of *E. coli* isolates obtained from artisanal dairy products manufactured in Venezuela. Ribeiro et al. (2016) reported multiresistance rates lower than 20% in *E. coli* isolates collected from cheese samples, which were produced with raw milk in Brazil. However, Campos et al. (2018) found only one (2.56%) *E. coli* multidrug-resistant strain isolated from raw milk cheese produced in Brazil.

On the subject of susceptibility profile of 25 *E. coli* isolates potentially pathogenic (EPEC, ETEC and EAEC) found in this study, we observed: 12 (48%) were resistant to two or more tested antimicrobial agents, six (24%) were resistant to two antimicrobial classes (6C, 7C, 9C, 10C, 16C, 21C), and three isolates (12%) were multi-drug resistant (4C, 5C and 20C) (table 3). Our results showed consistency with those presented by Canizalez-Roman et al. (2013), which demonstrated that 39.2% of diarrheagenic *E. coli* strains isolated in food items manufactured in Mexico, among them dairy products, were resistant to two or more antibiotics. In addition, Wang et al. (2017) verified that 61% of diarrheagenic *E. coli* isolates, recovered from different types of food commercialized in local Japanese retail markets, were resistant to at least one of the tested antimicrobial agents, and 70% of them were resistant to two or more antibiotics. Moreover, Gómez-Aldapa et al. (2016) recently detected multiresistance in all diarrheagenic isolates recovered from coriander samples in Mexico.

Transmission of virulence genes and resistance by *E. coli* to other intestinal pathogenic bacteria is often plasmid-associated. Therefore, industrialized food and animal source food are potential reservoirs for antimicrobial resistant and virulent bacteria (Kirbis and Krizman, 2015). Since we recovered pathogenic antibiotic-resistant *E. coli* isolates from raw milk and serrano artisanal cheese, it is of utmost importance to point out questions related to food safety regulations, regarding aspects of quality raw material, primary production, processing, retailing and consumer-handling, as well as education in hygienic handling of food for individuals involved in the manufacturing process.

**Tabela 4.** Antimicrobial susceptibility profile of *E. coli* isolates recovered from raw milk and serrano artisanal cheese.

<i>Antimicrobial agent</i>	<i>Susceptibility profile n(%)</i>			
	<b>R</b>	<b>I</b>	<b>SDD</b>	<b>S</b>
Amoxicillin - clavulanate (AMC)	16 (13.68)	-	-	101 (86.32)
Aztreonam (ATM)	3 (2.56)	-	-	114 (97.44)
Cefepime (CPM)	1 (0.85)	-	1 (0.85)	115 (98.3)
Ceftazidime (CAZ)	2 (1.71)	1 (0.85)	-	114 (97.44)
Ceftriaxone (CRO)	3 (2.56)	2 (1.71)	-	112 (95.73)
Cefotaxime (CTX)	3 (2.56)	-	-	114 (97.44)
Meropenem (MER)	-	-	-	117 (100.00)
Imipenem (IPM)	-	3 (2.56)	-	114 (97.44)
Cefoxitin (CFO)	16 (13.68)	-	-	101 (86.32)
Ampicillin (AMP)	20 (17.10)	9 (7.69)	-	88 (75.21)
Tetracycline (TET)	18 (15.38)	2 (1.71)	-	97 (82.91)
Doxycycline (DOX)	17 (14.53)	1 (0.85)	-	99 (84.62)
Ciprofloxacin (CIP)	-	1 (0.85)	-	116 (99.15)
Norfloxacin (NOR)	-	-	-	117 (100.00)
Levofloxacin (LVX)	-	-	-	117 (100.00)
Tobramycin (TOB)	-	-	-	117 (100.00)
Gentamicin (GEN)	-	2 (1.71)	-	115 (98.29)
Neomycin (NEO)	-	-	-	117 (100.00)
Amikacin (AMI)	-	-	-	117 (100.00)
Streptomycin (EST)	10 (8.55)	14 (11.96)	-	93 (79.49)
Chloramphenicol (CLO)	-	-	-	117 (100.00)
Nitrofurantoin (NIT)	2 (1.71)	1 (0.85)	-	114 (97.44)
Trimethoprim-sulfamethoxazole (SUT)	8 (6.84)	1 (0.85)	-	108 (92.31)

*R* – Resistant; *I* – Intermediate resistant; *SDD* – Susceptible dose-dependent; *S* – Susceptible.

An investigation of ESBL-producing isolates was also carried out, and we found out that four (3.41%) samples, one from milk and the others from cheese, were positive for ESBL phenotype and harbored the *Blat<sub>TEM</sub>* gene. One isolate showed multiresistance profile (C); whereas another one (D), characterized as EPEC, exhibited resistance to 80% of the tested  $\beta$ -lactams (table 5). Likewise, studies worldwide also reported the presence of ESBL-producing *E. coli* isolates in raw milk and/or cheese manufactured in Turkey (Tekiner and Ozpinar, 2016; Tepeli and Zorba, 2018), Czech Republic (Skočková et al., 2015), Brazil (Ribeiro et al., 2016) and Slovakia

(Vrabec et al., 2015), being the *Bla<sub>TEM</sub>* gene the most prevalent among the recovered samples. ESBL-producing microorganisms represent a serious global health concern because they are frequently isolated (Bouchillon et al., 2004), and the group of  $\beta$ -lactams is still the most commonly worldwide used antimicrobial agent against Gram-negative bacterial infections (de Oca et al., 2015), which lately leads to complicated treatment strategies.

Since three isolates showed intermediate resistance to imipenem, a phenotypic screening of carbapenemase-producing *E. coli* was performed. However, all isolates were negative for this resistance profile. Based on this result, we carried out PCRs to detect the presence of OXA-48 gene, but none of the mentioned isolates were positive for it. In this case, intermediate resistance might be due to apparent loss or reduction in the expression level of porins present in these isolates (Anvisa, 2013).

**Table 5.** Profile of ESBL-producing *E. coli* isolated from raw milk and serrano artisanal cheese.

<i>Isolate</i> *	<i>ESBL (gene)</i>	<i>Antimicrobial resistance</i>	<i>E. coli (Pathotype)</i>
A (M)	<i>Bla<sub>TEM</sub></i>	ATM, CAZ, CRO, CTX, EST	-
B (C)	<i>Bla<sub>TEM</sub></i>	CRO, AMP	-
C (C)	<i>Bla<sub>TEM</sub></i>	CAZ, CTX, TET, DOX, EST	-
D (C)	<i>Bla<sub>TEM</sub></i>	AMC, ATM, CPM, CAZ, CRO, CTX, CFO, AMP	EPEC

\* (M) – Milk; (C) – Cheese.

Additionally, we verified the ability of *E. coli* isolates to potential form biofilm by the Congo red method. More than half of *E. coli* isolates (67.52% out of 117 isolates) were considered potential biofilm producers. It is important to mention that there are other well-established methods to define and quantify biofilm-producer strains (Azeredo et al., 2016). However, previous studies have demonstrated that Congo red agar method results well-correlated with the ones obtained by tissue culture plate and tube methods (Ponnusamy et al., 2012) and by microtiter plate method (Chagas et al., 2017). For this reason, this method could be further performed in order to investigate the potential ability of *E. coli* isolates to form biofilm.

Out of the 79 isolates positive for Congo red agar test, 42 (53.16%) were resistant to at least one of the tested antimicrobial agents. The biofilm formation profile of diarrheagenic *E. coli* isolates is shown in table 3 and revealed that 75% of them were considered potential biofilm-producers and resistant to at least one antibiotic. Analyses of the ten multi-drug resistant isolates found in the current study revealed that eight (80%) were considered potential biofilm-

producers. This finding is in line with the results obtained by Ponnusamy et al. (2012), emphasizing a possible association between these factors.

Biofilm formation in food processing environments depends on several factors, and dairy products are very susceptible to contamination, especially due to unsuitable hygiene of machines and utensils (Srey et al., 2013). Biofilms are microbial communities embedded in an extracellular matrix composed mainly by polysaccharides and proteins adhered to the surface, and they remarkably underpin bacteria against effects of antibacterial treatments (Costerton et al, 1987; Hobley et al., 2015). This fact emphasizes even more the demand for actions to improve serrano artisanal cheese manufacturing processes in order to guarantee the quality of these foodstuffs for consumers.

### 3.5 CONCLUSION

This study reveals the presence of diarrheagenic *E. coli* isolates (EPEC, ETEC and EAEC) recovered from raw milk and artisanal cheese produced in Santa Catarina, South region of Brazil. We identified isolates that exhibited multi-drug resistance and ESBL-producing profiles, and the potential ability to form biofilms. These results warn of a serious public health issue, since these contaminated foods offer risks to consumers' health. For that reason, they underpin the need to intensify hygienic-sanitary controls in all steps of production, and also to implement measures that allow epidemiological control of potential pathogenic bacterial strains in artisanal cheese produced in the serrana region of Santa Catarina, South of Brazil.

### **Acknowledgements**

We thank the Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) and the Instituto Adolfo Lutz for providing the reference strains.

**Funding:** This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina - FAPESC.

### 3.6 REFERENCES

Altalhi, A.D., Hassan, S.A., 2009. Bacterial quality of raw milk investigated by *Escherichia coli* and isolates analysis for specific virulence-gene markers. Food Control 20, 913-917.



Anvisa, 2013. Measures of prevention and control of infections by multiresistant enterobacteria. Technical note n. 01/2013. (<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/271858/Nota+t%C3%A9cnica+n%C2%BA+01+de+2013/5be89853-7eca-4b4b-98e4-5096b9f5a2ec> (Accessed 20 December 17)).

Azeredo, J., Azeredo, N.F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A.R., Desvaux, M., Bonaventura, G., Hébraud, M., Jaglic, Z., Kačániová, M., Knöchel, S., Lourenço, A., Mergulhão, F., Meyer, R.L., Nychas, G., Simões, M., Tresse, O., Sternberg, C., 2016. Critical review on biofilm methods. *Crit. Rev. Microbiol.* 43, 313-351.

Bouchillon, S.K., Johnson, B.M., Hoban, D.J., Johnson, J.L., Dowzicky, M.J., Wu, D.H., Visalli, M.A., Bradford, P.A., 2004. Determining incidence of extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*, vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in 38 centres from 17 countries: the PEARLS study 2001-2002. *Int. J. Antimicrob. Agents* 24, 119-124.

Brüssow, H., 2014. Enteroaggregative *E. coli*. *Enc. Food Microbiol.* 1, 706-712.

Bush, K., Jacoby, G.A., 2010. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 969–976.

Campos, A.C.L.P, Puño-Sarmiento, J.J., Medeiros, L.P., Gazal, L.E.S., Maluta, R.P., Navarro, A., Kobayashi, R.K.T., Fagan, E.P., Nakazato, G., 2018. Virulence Genes and Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* from Cheese Made from Unpasteurized Milk in Brazil. *Foodborne Pathog. Dis.* 15, 94-100.

Canizalez-Roman, A., Gonzalez-Nuñez, E., Vidal, J.E., Flores-Villaseñor, H., León-Sicairos, N., 2013. Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from food items in northwestern Mexico. *Int. J. Food Microbiol.* 164, 36-45.

Carattoli, A., 2013. Plasmids and the spread of resistance. *Int. J. Med. Microbiol.* 303, 298–304.

Chagas, L.G.S., Melo, P.C., Brasão, S.C., Silvestre, G.B.R., Guimarães, E.C., Lima, A.M.C., 2017. Evaluation of biofilm formation by bacterial strains isolated from milking equipment and milk samples from cows with mastitis. *Semina: Ciênc. Agrár.* 38, 1887-1896.

CLSI, 2015. Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard-12th edition. Clinical and Laboratory Standards Institute M02-A12.

CLSI, 2018. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Approved standard-28th edition. Clinical and Laboratory Standards Institute M100-S28.

Costerton, J.W., Cheng, K.J., Geesey, G.G., Ladd, T.I., Nickel, J.C., Dasgupta, M., Marrie, T.J., 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol* 41, 435-464.

Culler, H.F., Mota, C.M., Abe, C.M., Elias, W.P., Sircili, M.P., Franzolin, M.R., 2014. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains form biofilm on abiotic surfaces regardless of their adherence pattern on cultured epithelial cells. *Biomed Res. Int.* 2014, 845147.

Dallenne, C., Da Costa, A., Decré, D., Favier, C., Arlet, G., 2010. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important  $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 65, 490-495.

de Oca, S.A.M., Talavera-Rojas, M., Soriano-Vargas, E., Barba-León, J., Vazquez-Navarrete, J., 2015. Determination of extended spectrum  $\beta$ -lactamases/AmpC  $\beta$ -lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from bovine carcasses in Mexico. *Trop. Anim. Health Prod.* 47, 975-981.

Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull* 19, 11-15.

Dubreuil, J.D., 2014. Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC). *Enc. Food Microbiol.* 2, 728-734.

ECDC., 2013. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2012. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-net). ECDC 2013.

Freeman, D.J., Falkiner, F.R., Keane, C.T., 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J. Clin. Pathol.* 42, 872-874.

Genc, O., Aksu, E., Gulcan, A., 2016. The identification of carbapenemase types in *Enterobacteriaceae* by using molecular assay and phenotyping confirmation tests. *J. Microbiol. Methods* 125, 8-11.

Girão, D.M., Girão, V.B.C., Irino, K., Gomes, T.A.T., 2006. Classifying *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1297-1299.

Gómez-Aldapa, C.A., Segovia-Cruz, J.A., Cerna-Cortes, J.F., Rangel-Vargas, E., Salas-Rangel, L.P., Gutiérrez-Alcántara, E.J., Castro-Rosas, J., 2016. Prevalence and behavior of multidrug-

resistant Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, enteropathogenic *E. coli* and enterotoxigenic *E. coli* on coriander. *Food Microbiol.* 59, 97-113.

Guillén, L., Millán, B., Araque, M., 2014. Caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mérida, Venezuela. *Infectio* 18, 100-108.

Gundogan, N., Avci, E., 2013. Prevalence and antibiotic resistance of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species isolated from foods of animal origin in Turkey. *Afr. J. Microbiol. Res.* 7, 4059-4064.

Gyles, C.L., 2007. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J. Anim. Sci.* 85, 45-62.

Gyles, C.L., Fairbrother, J.M., 2010. *Escherichia coli*. In: Gyles, C.A., Prescott, J.F., Songer, J.G., Thoen, C.O. (Eds), *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Wiley-Blackwell, Iowa, pp. 231-265.

Harrington, S.M., Dudley, E.G., Nataro, J.P., 2006. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiol. Lett.* 245, 12-18.

Hernandes, R.T., Elias, W.P., Vieira, M.A.M., Gomes, T.A.T., 2009. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 297, 137-149.

Hobley, L., Harkins, C., MacPhee, C.E., Stanley-Wall, N.R., 2015. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiol. Rev.* 39, 649-669.

Holko, I., Bisova, T., Holkova, Z., Kmet, V., 2006. Virulence markers of *Escherichia coli* strains isolated from traditional cheeses made from unpasteurized sheep milk in Slovakia. *Food Control*, 17, 393-396.

Hu, J., Torres, A.G., 2015. Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander?. *Clin. Microbiol. Infect.* 21, 729-734.

Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L.T., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Rev. Microbiol.* 2, 123-140.

Kirbis, A., Krizman, M., 2015. Spread of antibiotic resistant bacteria from food of animal origin to humans and vice versa. *Procedia Food Sci.* 5, 148-151.

Kragh, K.N., Hutchison, J.B., Melaugh, G., Rodesney, C., Roberts, A.E.L., Irie, Y., Jensen, P.Ø., Diggle, S.P., Allen, R.J., Gordon, V., Bjarnsholt, T., 2016. Role of multicellular aggregates in biofilm formation. *mBio* 7, e00237-16.

Lee, J.H., Bae, I.K., Lee, S.H., 2012. New definitions of extended-spectrum beta-lactamase conferring worldwide emerging antibiotic resistance. *Med. Res. Rev.* 32, 216-232.

López-Saucedo, C., Cerna, J.F., Villegas-Sepulveda, N., Thompson, R., Velazquez, F.R., Torres, J., Tarr, P.I., Estrada-García, T., 2003. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 127-131.

Mainil, J., 2013. *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary Immunol. Immunopathol.* 152, 2-12.

Melo, F.D., Dalmina, K.A., Pereira, M.N., Ramella, M.V., Neto, A.T., Vaz, E.K., Ferraz, S.M., 2013. Evaluation of the safety and quality of microbiological handmade cheese serrano and its relation to physical and chemical variables the period of maturity. *Acta Sci. Vet.* 41, 1152.

Monaghan, A., Byrne, B., Fanning, S., Sweeney, T., McDowell, D., Bolton, D.J., 2013. Serotypes and virulence profiles of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from bovine farms and abattoirs. *J. Appl. Microbiol.* 114, 595-603.

Nobili, G., Franconieri, I., Basanisi, M.G., La Bella, G., Tozzoli, R., Caprioli, A., La Salandra, G., 2016. Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in raw milk and mozzarella cheese in southern Italy. *J. Dairy Sci.* 99, 7877-7880.

Nordmann, P., Gniadkowski, M., Giske, C.G., Poirel, L., Woodford, N., Miriagou, V., European Network on Carbapenemases, 2012. Identification and screening of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 432-438.

Nordmann, P., Naas, T., Poirel, L., 2011. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 1791-1798.

Ntuli, V., Njage, P.M.K., Buys, E. M., 2016. Characterization of *Escherichia coli* and other *Enterobacteriaceae* in producer-distributor bulk milk. *J. Dairy Sci.* 99, 1-16.

Ombarak, R. A., Hinenoya, A., Awasthi, S.P., Iguchi, A., Shima, A., Elbagory, A.R.M., Yamasaki, S., 2016. Prevalence and pathogenic potential of *Escherichia coli* isolates from raw milk and raw milk cheese in Egypt. *Int. J. Food Microbiol.* 221, 69-76.

Oswald, E., Schmidt, H., Morabito, S., Karch, H., Marchès, O., Caprioli, A., 2000. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect. Immun.* 68, 64-71.

Paterson, D.L., Bonomo, R.A., 2005. Extended-spectrum-lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 657-686.

Pereira, B.P., Vieira, T.R., Valent, J.Z., Bruzza, A., Wagner, S.A., Pinto, A.T., Schmidt, V., 2014. Implications of the quality of the production process artisan cheese serrano. *REGET* 18, 116-126.

Pfeifer, Y., Cullik, A., Witte, W., 2010. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int. J. Med. Microbiol.* 300, 371-379.

Ponnusamy, P., Natarajan, V., Sevanan, M., 2012. In vitro biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli* and their antimicrobial susceptibility pattern. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 5, 210-213.

Pontarolo, G.H., Melo, F.D., Martini, C.L., Wildemann, P., Alessio, D.R.M., Sfaciotte, R.A.P., Neto, A.T., Vaz, E.K., Ferraz, S.M., 2017. Quality and safety of artisan cheese produced in the serrana region of Santa Catarina. *Semina: Ciênc. Agrár.* 38, 739-748.

Ratchtrachenchai, O.A., Subpasu, S., Ito, K., 1997. Investigation on enteroaggregative *Escherichia coli* infection by multiplex PCR. *Bull. Dept. Med. Sci.*, 39, 211-220.

Ribeiro, L.F., Barbosa, M.M., Pinto, F.R., Maluta, R.P., Oliveira, M.C., de Souza, V., de Medeiros, M.I., Borges, L.A., do Amaral, L.A., Faibrother, J.M., 2016. Antimicrobial resistance and virulence factors of *Escherichia coli* in cheese made from unpasteurized milk in three cities in Brazil. *Foodborne Pathog. Dis.* 13, 469-476.

Sasakawa, C.A., 2010. A new paradigm of bacteria-gut interplay brought through the study of *Shigella*. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 86, 229-243.

Sethabutr, O., Venkatesan, M., Murphy, G.S., Eampokalap, B., Hoge, C.W., Echeverria, P., 1993. Detection of *Shigellae* and enteroinvasive *Escherichia coli* by amplification of the

invasion plasmid antigen H DNA sequence in patients with dysentery. *J Infect. Dis.* 167, 458–461.

Silagyi, K., Kim, S.H., Lo, Y.M., Wei, C.I., 2009. Production of biofilm and quorum sensing by *Escherichia coli* O157:H7 and its transfer from contact surfaces to meat, poultry, ready-to-eat deli, and produce products. *Food Microbiol.* 26, 514-519.

Skočková, A., Bogdanovičová, K., Koláčková, I., Karpíšková, R., 2015. Antimicrobial-resistant and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in raw cow's milk. *J. Food Prot.* 78, 72-77.

Slama, K.B., Jouini, A., Sallem, R.B., Somalo, S., Sáenz, Y., Estepa, V., Boudabous, A., Torres, C., 2010. Prevalence of broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolates in food samples in Tunisia, and characterization of integrons and antimicrobial resistance mechanisms implicated. *Int. J. Food Microbiol.* 137, 281-286.

Small, P.L., Falkow, S., 1988. Identification of regions on a 230-kilobase plasmid from enteroinvasive *Escherichia coli* that are required for entry into Hep-2 cells. *Infect. Immun.* 56, 225-229.

Souza, C.F.V., Dalla Rosa, T., Ayub, M.A.Z., 2003. Changes in the microbiological and physicochemical characteristics of Serrano cheese during manufacture and ripening. *Braz. J. Microbiol.* 34, 260-266.

Spellberg, B., Blaser, M., Guidos, R.J., Boucher, H.W., Bradley, J.S., Eisenstein, B.I., Gerding, D., Lynfield, R., Reller, L.B., Rex, J., Schwartz, D., Septimus, E., Tenover, F. C., Gilbert, D.N., 2011. Combating antimicrobial resistance: policy recommendations to save lives. *Clin. Infect. Dis.* 52, S397-S428.

Srey, S., Jahid, I.K., Ha, S., 2013. Biofilm formation in food industries: A food safety concern. *Food Control*, 31, 572-585.

Su, Y., Yu, C.Y., Tsai, Y., Wang, S.H., Lee, C., Chu, C., 2016. Fluoroquinolone-resistant and extended-spectrum b-lactamase-producing *Escherichia coli* from the milk of cows with clinical mastitis in Southern Taiwan. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 49, 892-901.

Tekiner, I.H., Ozpinar, H., 2016. Occurrence and characteristics of extended spectrum beta-lactamases-producing *Enterobacteriaceae* from foods of animal origin. *Braz. J. Microbiol.* 47, 444-451.

Tepeli, S.O., Zorba, N.N.D., 2018. Frequency of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)– and AmpC  $\beta$ -lactamase–producing Enterobacteriaceae in a cheese production process. *J. Dairy Sci.* 101, 1-9.

Thomson, K.S., 2010. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. *J. Clin. Microbiol.* 48, 1019-1025.

Toma, C., Lu, Y., Higa, N., Nakasone, N., Chinen, I., Baschkier, A., Rivas, M., Iwanaga, M., 2003. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 41, 2669-2671.

Tóth, I., Schmidt, H., Kardos, G., Lancz, Z., Creuzburg, K., Damjanova, I., Pászti, J., Beutin, L., Nagy, B., 2009. Virulence genes and molecular typing of different groups of *Escherichia coli* O157 strains in cattle. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6282-6291.

Tzouvelekis, L.S., Markogiannakis, A., Psychogiou, M., Tassios, P.T., Daikos, G.L., 2012. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clin. Microbiol. Rev.* 25, 682-707.

Vrabec, M., Lovayová, V., Dudriková, K., Gallo, J., Dudriková, E., 2015. Antibiotic resistance and prevalence of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* isolated from Bryndza cheese. *Ital. J. Anim. Sci.* 14, 3968.

Wang, L., Nakamura, H., Kage-Nakadai, E., Hara-Kudo, Y., Nishikawa, Y., 2017. Prevalence, antimicrobial resistance and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from different retail foods. *Int. J. Food Microbiol.* 249, 44-52.

Woodford, N., Turton, J.F., Livermore, D.M., 2011. Multiresistant gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 736-755.

Yamasaki, S., Lin, Z., Shirai, H., Terai, A., Oku, Y., Ito, H., Ohmura, M., Karasawa, T., Tsukamoto, T., Kurazono, H., Takeda, Y., 1996. Typing of verotoxins by DNA colony hybridization with poly- and oligonucleotide probes, a bead-enzyme-linked immunosorbent assay, and polymerase chain reaction. *Microbiol. Immunol.* 40, 345–352.

Yang, X., Wang, H., 2014. *Escherichia coli*: Pathogenic *E. coli* (Introduction). *Enc. Food Microbiol.* 2, 695-701.

Zaffari, C.B., Mello, J.F., Costa, M., 2007. Bacteriological quality of homemade cheeses commercialized in roads of the northern coast of Rio Grande do Sul, Brazil. *Cienc. Rural* 37, 862-867.



## 4 ARTIGO 2

(Submetido ao periódico *International Journal of Food Microbiology*)

### **Determination of virulence genes and antimicrobial susceptibility profile of *Listeria monocytogenes* isolates recovered from artisanal cheese produced in the Southern region of Brazil**

#### 4.1 ABSTRACT

*Listeria monocytogenes* is an opportunistic pathogen that causes listeriosis, a foodborne disease with low incidence but with high mortality rate in humans. This microorganism has been recovered in several dairy products, especially those produced with raw milk. The objective of this work was to investigate the presence of virulence genes, and also to define the antimicrobial susceptibility profile of *L. monocytogenes* isolates recovered from serrano artisanal cheese produced in Southern region of Brazil. Nine isolates of *L. monocytogenes* (serotypes 1/2b and 4b) were evaluated through PCRs to detect the presence of the virulence genes *hly*, *inlA*, *inlC*, *inlJ*, *actA*, *plcB* and *iap*, while antimicrobial susceptibility profile was ascertained via disk diffusion method. All isolates exhibited the presence of the genes *hly* and *plcB*, whereas the other genes (*iap*, *actA*, *inlA*, *inlC* and *inlJ*) were only detected in eight isolates (88.9%). We verified that all isolates were resistant to at least one antimicrobial agent and 33.3% of them showed multidrug resistance. These findings demonstrated the serrano artisanal cheese offers risks to consumers' health and point to a need of adaptations and monitoring of manufacturing process of this food, in order to prevent the dissemination of *L. monocytogenes*.

**Keywords:** Dairy products, raw milk, virulence genes, multidrug resistance.

#### 4.2 INTRODUCTION

*Listeria monocytogenes* is a pathogen that causes listeriosis, a serious foodborne disease that can be fatal. The overall mortality rate is estimated in 30%, especially in those with underlying diseases and/or immunosuppressed status, elderly and fetus or neonate (Drevets and Bronze, 2008; Lecuit, 2007). *L. monocytogenes* is a concern in food industry, since it is found in various environments, and it grows under different conditions, such as low temperatures, high salt concentrations and wide pH range (from 4.5 to 9.0) (Guenther et al., 2009; Walker et al., 1990). This microorganism has been recovered from several types of food, among which serrano artisanal cheese (Melo et al., 2013; Pontarolo et al., 2017), a product typically manufactured in the highland fields of South of Brazil with raw milk obtained from dairy cattle subjected to natural grazing-pasture management (Pereira et al., 2014). The raw milk contaminated by *L. monocytogenes* introduced into the food processing environment and used to manufacture

unpasteurized cheese is a serious threat to human health, due to the specific abilities of this pathogen to resist numerous stresses (Kousta et al., 2010). For that reason, its control continues a challenge for food processing (Melo et al., 2015).

There are thirteen recognized serotypes of *L. monocytogenes*, which are distributed into four genetic lineages (Orsi et al., 2011), being more than 95% of human listeriosis commonly associated with isolates that belong to serotypes 4b, 1/2a and 1/2b (Doumith et al., 2004; Kasper et al., 2009). The pathogenicity of *L. monocytogenes* is defined by several virulence factors, in particular the family of internalins, bacterial surface proteins responsible for internalization (entry) of *L. monocytogenes* into cells (InlA, InlB) (Bonazzi et al., 2009; Hamon et al., 2006); and dissemination between cells (InlC) (Rajabian et al., 2009). Another crucial role is played by listeriolysin O (LLO), a protein responsible for survival and intracellular multiplication of this pathogen, since it allows bacterial phagosomal escape to the cytoplasm of infected host cells (Hamon et al., 2012; Ruan et al., 2016). Once that happens, *L. monocytogenes* replicates, but intracellular movement and cell-to-cell dissemination will only occur with help of ActA protein, which will induce polymerization of actin and, consequently, actin-filament formation inside of the host cells (Cameron et al., 1999; Kocks et al., 1995). In addition to these virulence factors, we should also mention the phospholipases C, such as PC-PLC (PlcB), that acts in synergy with LLO to amplify phagocytic vacuole's lysis (Camilli et al., 1993; Gedde et al., 2000); and the protein (p60) encoded by the gene *iap*, which is necessary for a successful invasion (Camejo et al., 2011).

*L. monocytogenes* is usually susceptible to several antimicrobial agents. However, recent studies have shown an emergence of isolates recovered from food samples, which are resistant to antibiotics commonly used for human listeriosis therapy (Fallah et al., 2013; Kevenk and Gulel, 2016; Noll et al., 2017; Tahoun et al., 2017). This fact is of great concern, since *L. monocytogenes* is able to develop resistance mechanisms or to acquire resistance through transmission of genetic material of other bacterial species at the food-processing environment (Allen et al., 2016; Bertsch et al., 2013; Toomey et al., 2009).

Therefore, the objective of the present study was to investigate the presence of virulence genes and to define the antimicrobial susceptibility profile of *L. monocytogenes* isolates obtained from serrano artisanal cheese samples manufactured in the South region of Brazil, Santa Catarina State.

## 4.3 MATERIAL AND METHODS

### 4.3.1. *Bacterial isolates*

A total of nine samples of *Listeria monocytogenes*, serotypes 1/2b (n=2) and 4b (n=7), recovered from serrano artisanal cheese were used in this study. The collection of these occurred during previous investigations performed by Melo et al. (2013) and Pontarolo et al. (2017) at Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA) of Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), in partnership with serrano artisanal cheese producers from Santa Catarina, south Region of Brazil.

### 4.3.2 *Bacterial DNA extraction*

Isolation of genomic DNA from recovered samples and quality control strains (*L. monocytogenes* ATCC EGD-e and *E. coli* ATCC 25922) was done following an adapted protocol described by Doyle and Doyle (1987). Bacterial isolates and strains were cultivated in Brain Heart Infusion (BHI) broth for 24 h at 37°C. Then, samples were retained as stock culture at -20°C. A total of 200µL of each inoculum was transferred to a sterile microtube, 500µL of chloroform: isoamyl alcohol (24:1) were added and this mixture was incubated in a water-bath for 30 min at 56°C. Microtubes were centrifuged for 10 min at 12,000 rpm, the supernatant was recovered and 600µL of 70% alcohol were added. This mixture was centrifuged for 20 min at 13,500 rpm. The supernatant was discarded by inversion and pellet was allowed to air-dry. The dried pellet was resuspended with 200µL of sterile Milli-Q water.

### 4.3.3 *Virulence genes detection*

The presence of seven genes encoding virulence factors of *L. monocytogenes* were investigated in this study: internalin A (*inlA*), internalin C (*inlC*), internalin J (*inlJ*), actin assembly-inducing protein (*actA*), phospholipase C - PC-PLC (*plcB*), listeriolysin O, invasion-associated protein - p60 (*iap*). Multiplex PCR described by Liu et al. (2007) was used to investigate the presence of virulence genes *inlA*, *inlC* and *inlJ*, whereas an adaptation of Cao et al. (2018)'s protocol was carried out for the detection of the others (*actA*, *plcB*, *hly* and *iap*).

PCR reactions were carried out in 25 µL final volume, the mixture contained PCR buffer (Tris-HCl - 20mM, KCl - 50mM), MgCl<sub>2</sub> (2mM), dNTP (200mM of each), *Taq* DNA polymerase

(0.5U), primers (4 pmol of each) and bacterial DNA (2µl). Amplification was performed using a denaturation step of 94°C for 4 min, followed by 32 cycles of 94°C for 30 s, 54°C for 30 s, and 72°C for 60 s. A final extension step at 72°C for 10 min was applied. The PCR products were subject of eletrophoresis (100V, 300mA) on 2% agarose gel for 1h. After that, we stained the agarose gel with GelRed<sup>TM</sup> and amplified fragments were visualized on transilluminator (Kasvi, model K33-312, Brazil). The used primers are listed on table 1. All reagents were purchased from Invitrogen® (Carlsbad, USA) and reactions were carried out in Thermal Cycler Applied Biosystem (model MJ96, Thermo Fisher, USA). Quality control strains *Listeria monocytogenes* EGD-e and *Escherichia coli* ATCC 25922 were used as positive and negative as controls, respectively.

**Table 1.** List of primers used to detect virulence genes in *Listeria monocytogenes* isolates.

<i>Gene</i>	<i>Oligonucleotide sequence (5'-3')</i>	<i>Size of amplicon (bp)</i>	<i>Virulence factor</i>	<i>Described by:</i>
<i>inlA</i>	F: ACGAGTAACGGGACAAATGC R: CCCGACAGTGGTGCTAGATT	800	Internalin A	Liu et al. (2007)
<i>inlC</i>	F: AATCCCCACAGGACACAACC R: CGGGAATGCAATTTTTCACTA	517	Internalin C	
<i>inlJ</i>	F: TGTAACCCCGCTTACACAGTT R: AGCGGCTTGGCAGTCTAATA	238	Internalin J	
<i>actA</i>	F: TGCATTACGATTAACCCCGACA R: AGGCTTTCAAGCTCACTATCCG	431	Actin assembly-inducing protein	Cao et al. (2018)
<i>plcB</i>	F: AGTGTTCTAGTCTTTCCGG R: ACCTGCCAAAGTTTGCTGT	792	Phospholipase C (PC-PLC)	
<i>hly</i>	F: ACGCAGTAAATACATTAGTG R: AATAAACTTGACGGCCATAC	372	Listeriolysin O	
<i>iap</i>	F: TTTGCTAAAGCGGGTATCTC R: AGCCGTGGATGTTATCGTAT	205	Invasion-associated protein (p60)	

#### 4.3.4 Determination of antimicrobial susceptibility profile

The antimicrobial susceptibility test of the isolates was carried out according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) using disk diffusion method in

Mueller-Hinton agar supplemented with 5% defibrinated horse blood (EUCAST, 2018). The isolates were tested for their susceptibility to the following antimicrobial agents: benzylpenicillin (PEN, 1unit), ampicillin (AMP, 2µg), meropenem (MER, 10µg), erythromycin (ERI, 15µg) and trimethoprim/sulfamethoxazole (TMP/SMX 1.25 / 23.75 µg). Results of growth inhibition zone were interpreted according to current EUCAST (2018) guidelines established for *L. monocytogenes*. Besides that, ciprofloxacin (CIP, 5µg), levofloxacin (LVX, 5µg), gentamicin (GEN, 10µg), clindamycin (CLI, 2µg), tetracycline (TET, 30µg), chloramphenicol (CLO, 30µg) and rifampicin (RIF, 5µg) were also tested. However, interpretation of these results were performed based on the critical points recommended by EUCAST (2018) for *Staphylococcus* spp., since there are not established breakpoints of these antibiotics for *L. monocytogenes*. We used *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619 and *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 as quality control strains to define antimicrobial susceptibility profile.

#### 4.4 RESULTS AND DISCUSSION

A total of nine samples of *L. monocytogenes* recovered from artisanal cheese, classified as 1/2b (n=2) and 4b (n=7) serotypes, were analyzed for the presence of seven virulence genes. The genes *hly* and *plcB* were detected in all isolates, whereas the others (*iap*, *actA*, *inlA*, *inlC* e *inlJ*) were found in eight isolates (88.9%) (Table 2). Coroneo et al. (2016) reported similar results in *L. monocytogenes* isolates from cheese in Italy, with variable rates of virulence gene detection. In addition, other studies also demonstrated similar finding in samples obtained from different types of food, raw milk, milking machine, worker's hands and clinical specimens (Du et al. 2017; Su et al. 2016; Tahoun et al. 2017). However, studies based on several types of food have documented the presence of virulence genes in all examined *L. monocytogenes* isolates (Almeida et al., 2017; Iglesias et al., 2017; Jamali et al., 2013; Mammina et al., 2009; Oliveira et al., 2018).

It is known that some polymorphisms and punctual mutations, present in certain virulence genes, could contribute for attenuated-virulence in *L. monocytogenes* strains (Orsi et al., 2011; Van Stelten et al., 2010). Based on that, absence or presence of virulence factors could be a tool to assess not only the risks related with food product consumption, but also those associated with strain-specific virulence parameters of *L. monocytogenes* (Jacquet et al., 2004). In adopting this strategy, we will propose a more rational risk assessment, and consequently, provide a more efficient and effective control measure against this foodborne.

We observed that eight isolates (88.9%) were positive for all virulence factors investigated (Table 2). This finding provides evidence of a serious health public issue, since these isolates represent a potential threat (listeriosis) to serrano artisanal cheese consumers, especially those from the risk groups (pregnant women, elderly and immunocompromised individuals).

**Table 2.** Profile of virulence and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolates recovered from serrano artisanal cheese.

Isolates	Serotype	Virulence genes							Antimicrobial resistance
		<i>hly</i>	<i>inlA</i>	<i>inlC</i>	<i>inlJ</i>	<i>actA</i>	<i>plcB</i>	<i>iap</i>	
Lm1	1/2b	+	-	-	-	-	+	-	TMP/SMX, CLI, RIF
Lm2	4b	+	+	+	+	+	+	+	TMP/SMX, CIP, CLI, RIF
Lm3	4b	+	+	+	+	+	+	+	TMP/SMX, CLI
Lm4	1/2b	+	+	+	+	+	+	+	CLI, LVX
Lm5	4b	+	+	+	+	+	+	+	TMP/SMX, RIF
Lm6	4b	+	+	+	+	+	+	+	TMP/SMX, CLI
Lm7	4b	+	+	+	+	+	+	+	CLI
Lm8	4b	+	+	+	+	+	+	+	CIP, CLI
Lm9	4b	+	+	+	+	+	+	+	ERI, TMP/SMX, CIP, CLI, LVX, TET, RIF

(+) = presence; (-) = absence.

Regarding antimicrobial susceptibility, *L. monocytogenes* isolates had their sensitivity to a panel of 12 antibiotics investigated. All isolates were resistant to at least one antimicrobial agent, while three of them (33.3%) exhibited a multidrug resistance profile (resistance to three or more antimicrobial agent classes) (Table 2). Our results are in line with previous studies that demonstrated isolation rates from 21% to 88% of multidrug resistant *L. monocytogenes* recovered from different types of food, among them raw milk and raw dairy products (Fallah et al., 2013; Harakeh et al., 2009; Kevenk and Gulel, 2016; Noll et al., 2017; Tahoun et al., 2017). *L. monocytogenes* isolates were frequently more resistant to clindamycin (88.9%), trimethoprim/sulfamethoxazole (66.7%), rifampicin (44.5%) and ciprofloxacin (33.3%). On the other hand, all isolates were susceptible to ampicillin, benzylpenicillin, meropenem, gentamicin

and chloramphenicol (Table 3). Similarly, Tahoun et al. (2017) evaluated patterns of antimicrobial resistance of *L. monocytogenes* isolates, recovered from raw milk, milking equipment, and hand swabs collected in Egyptian dairy farms. The authors observed a high resistance rate of these isolates to clindamycin (81%) and rifampicin (71.4%). Furthermore, recent studies carried out worldwide (Brazil, China and Spain) detected high prevalence (ranging from 35 to 81%) of resistant *L. monocytogenes* isolates to clindamycin, which were recovered from different types of food (Du et al., 2016; Gómez et al., 2014; Oliveira et al., 2018). In relation to other agents, there are reports about high prevalence of *L. monocytogenes* isolates, recovered from varied sources of food, to sulfonamide (83.3%) in Brazil (Iglesias et al., 2018), and to ciprofloxacin (60%) in Egypt (El Banna et al., 2016) and China (16.6%) as well (Wang et al., 2013).

**Table 3.** Antimicrobial susceptibility profile of *L. monocytogenes* isolates from serrano artisanal cheese.

<i>Antimicrobial agents</i>	<i>No. of isolates (%)</i>	
	<i>Resistant (R)</i>	<i>Susceptible (S)</i>
Ampicillin (2µg)	-	9 (100)
Benzylpenicillin (1unit)	-	9 (100)
Meropenem (10µg)	-	9 (100)
Erythromycin (15µg)	1 (11.1)	8 (88.9)
Trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25/23.75µg)	6 (66.7)	3 (33.3)
Ciprofloxacin (5µg)	3 (33.3)	6 (66.7)
Levofloxacin (5µg)	1 (11.1)	8 (88.9)
Gentamicin (10µg)	-	9 (100)
Clindamycin (2µg)	8 (88.9)	1 (11.1)
Tetracycline (30µg)	1 (11.1)	8 (88.9)
Chloramphenicol (30µg)	-	9 (100)
Rifampicin (5µg)	4 (44.5)	5 (55.5)

Studies reported the ability of antibiotic resistance determinants between *L. monocytogenes* and other microorganisms in food matrices such as milk and cheese (Bertsch et al., 2013; Toomey et al., 2009). This fact emphasizes a critical problem of food industry, since *L. monocytogenes* strains endure in food processing plants persistently for years or even decades (Ferreira et al., 2014). Survival or growth of this microorganism on surfaces of difficult hygienization could be related to this endurance, or also the repeatedly reintroduction of this pathogen from external

to processing environment through raw material, equipment or producer workers (Buchanan et al., 2017). Therefore, serrano artisanal cheese-processing plants require especial attention, since this cheese is a raw milk product and its production and storage (depends on maturation period) are commonly precarious, which means they do not follow the established hygienic-sanitary guidelines.

Contaminated environments can create optimal conditions for different types of bacteria to promote genetic material exchange, particularly for those products that require extended period of preparation and storage. Although resistance mechanisms for *L. monocytogenes* are still not well established, it is plausible that this microorganism acquires and disseminates mobile genetic elements that codify antimicrobial resistance genes derived from other pathogens in the food processing environment (Allen et al., 2016; Bertsch et al., 2013; Toomey et al., 2009).

#### 4.5 CONCLUSIONS

In conclusion, our study clearly showed that *L. monocytogenes* isolates from serrano artisanal cheese revealed the presence of the major virulence factors involved in its pathogenicity. Besides that, antimicrobial susceptibility investigation exhibited a high index of resistance to multiple agents used for human listeriosis treatment. Consequently, it is important to develop strategies to face efficiently microbial safety challenges and to monitor strictly the raw milk cheese processing. By that, we will not only prevent dissemination of this microorganism, but we will also reassure that this product does not offer risks to consumers' health.

#### **Acknowledgements**

We thank the Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) to provide the reference strains.

**Funding:** This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina - FAPESC.

#### 4.6 REFERENCES

Allen, K.J., Wallecka-Zacharska, E., Chen, J.C., Katarzyna, K., Devlieghere, F., Meervenne, E.V., Osek, J., Wiczorek, K., Bania, J., 2016. *Listeria monocytogenes* – An examination of food chain factors potentially contributing to antimicrobial resistance. Food Microbiol. 54, 178-189.



Almeida, R.M., Barbosa, A.V., Lisbôa, R.C., Santos, A.F.M., Hofer, E., Vallim, D.C., Hofer, C.B., 2017. Virulence genes and genetic relationship of *L. monocytogenes* isolated from human and food sources in Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* 21, 282-289.

Bertsch, D., Uruty, U.M., Anderegg, J., Lacroix, C., Meile, L., 2013. Tn6198, a novel transposon containing the trimethoprim resistance gene *dfpG* embedded into a Tn916 element in *Listeria monocytogenes*. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 986-991.

Bonazzi, M., Lecuit, M., Cossart, P., 2009. *Listeria monocytogenes* internalin and e-cadherin: from bench to bedside. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a003087.

Buchanan, R.L., Gorris, L.G.M., Hayman, M.M., Jackson, T.C., Whiting, R.C., 2017. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. *Food Control* 75, 1-13.

Camejo, A., Carvalho, F., Reia, O., Leitão, E., Sousa, S., Cabanes, D., 2011. The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. *Virulence* 2, 379-394.

Cameron, L.A., Footer, M.J., van Oudenaarden, A., Theriot, J.A., 1999. Motility of ActA protein-coated microspheres driven by actin polymerization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 4908-4913.

Camilli, A., Tilney, L.G., Portnoy, D.A., 1993. Dual roles of *plcA* in *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 8, 143-157.

Cao, X., Wang, Y., Wang, Y., Changyun, Y., 2018. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* from the black-headed gull feces in Kunming, China. *J. Infect. Public Health* 11, 59-63.

Coroneo, V., Carraro, V., Aissani, N., Sanna, A., Ruggeri, A., Succa, S., Meloni, B., Pinna, A., Sanna, C., 2016. Detection of virulence genes and growth potential in *Listeria monocytogenes* strains isolated from Ricotta Salata cheese. *J. Food Sci.* 81, 2016.

Doumith, M., Cazalet, C., Simoes, N., Frangeul, L., Jacquet, C., Kunst, F., Martin, P., Cossart, P., Glaser, P., Buchrieser, C., 2004. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Infect. Immun.* 72, 1072-1083.

Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19, 11-15.

Drevets, D., Bronze, M.S., 2008. *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 53, 151-165.

Du, X., Zhang, X., Wang, X., Su, Y., Li, P., Wang, S., 2017. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* in chinese food obtained from the central area of China. *Food Control* 74, 9-16.

El Banna, T.E., Sonbol, F.I., Zaki, M.E., El-Sayyad, H.H.I., 2016. Clinical and environmental prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* in Dakahlea Governorate, Egypt. *Clin. Microbiol.* 5, 249.

EUCAST, 2018. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.0, 2018. (<http://www.eucast.org> (Accessed 15 February 18)).

Fallah, A.A., Saei-Dehkordi, S.S., Mahzounieh, M., 2013. Occurrence and antibiotic resistance profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from seafood products and market and processing environments in Iran. *Food Control* 34, 630-636.

Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., Stasiewicz, M.J., 2014. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *J. Food Prot.* 77, 150-170.

Gedde, M.M., Higgins, D.E., Tilney, L.G., Portnoy, D.A., 2000. Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 68, 999-1003.

Gómez, D., Azón, E., Marco, N., Carramiñana, J.J., Rota, C., Ariño, A., Yangüela, J., 2014. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment. *Food Microbiol.* 42, 51-65.

Guenther, S., Huwyler, D., Richard, S., Loessner, M.J., 2009. Virulent bacteriophage for efficient biocontrol of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 93-100.

Hamon, M.A., Ribet, D., Stavru, F., Cossart, P., 2012. Listeriolysin O: the swiss army knife of *Listeria*. *Trends Microbiol.* 20, 360-368.

Hamon, M., Bierne, H., Cossart, P., 2006. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Nat. Rev. Microbiol.* 4, 423-434.

- Harakeh, S., Saleh, I., Zouhairi, O., Baydoun, E., Barbour, E., Alwan, N., 2009. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy-based food products. *Sci. Total Environ.* 407, 4022-4027.
- Iglesias, M.A., Kroning, I.S., Decol, L.T., Franco, B.D.G.M., Silva, W.P., 2017. Occurrence and phenotypic and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in slaughterhouses in southern Brazil. *Food Res. Int.* 100, 96-101.
- Jacquet, C., Doumith, M., Gordon, J.I., Martin, P.M.V., Cossart, P., Lecuit, M., 2004. A Molecular marker for evaluating the pathogenic potential of foodborne *Listeria monocytogenes*. *J. Infect. Dis.* 189, 2094-2100.
- Jamali, H., Radmehr, B., Thong, K.L., 2013. Prevalence, characterization, and antimicrobial resistance of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* isolates from raw milk in farm bulk tanks. *Food Control* 34, 121-125.
- Kasper, S., Huhulescu, S., Auer, B., Heller, I., Karner, F., Würzner, R., Wagner, M., Allerberger, F., 2009. Epidemiology of listeriosis in Austria. *Wien. Klin. Wochenschr.* 121, 113-119.
- Kevenk, T.O., Gulel, G.T., 2016. Prevalence, antimicrobial resistance and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* isolated from raw milk and dairy products. *J. Food Saf.* 36, 11-18.
- Kocks, C., Marchand, J.B., Gouin, E., d'Hauteville, H., Sansonetti, P.J., Carlier, M.F., Cossart, P., 1995. The unrelated surface proteins ActA of *Listeria monocytogenes* and IcsA of *Shigella flexneri* are sufficient to confer actin-based motility on *Listeria innocua* and *Escherichia coli* respectively. *Mol. Microbiol.* 18, 413-423.
- Kousta, M., Mataragas, M., Skandamis, P., Drosinos, D.H., 2010. Prevalence and sources of cheese contamination with pathogens at farm and processing levels. *Food Control* 21, 805-815.
- Lecuit, M., 2007. Human listeriosis and animal models. *Microbes Infect.* 9, 1216-1225.
- Liu, D., Lawrence, M.L., Austin, F.W., Ainsworth, A.J., 2007. A multiplex PCR for species- and virulence-specific determination of *Listeria monocytogenes*. *J. Microbiol. Methods* 71, 133-140.
- Mammaia, C., Aleo, A., Romani, C., Pellissier, N., Nicoletti, P., Pelcile, P., Natasi, A., Pontello, M.M., 2009. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolates from human listeriosis cases in Italy. *J. Clin. Microbiol.* 47, 2925-2930.

Melo, F.D., Dalmina, K.A., Pereira, M.N., Ramella, M.V., Neto, A.T., Vaz, E.K., Ferraz, S.M., 2013. Evaluation of the safety and quality of microbiological handmade cheese serrano and its relation to physical and chemical variables the period of maturity. *Acta Sci. Vet.* 41, 1152.

Melo, J., Andrew, P.W., Faleiro, M.L., 2015. *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: The role of stress responses. *Food Res. Int.* 67, 75-90.

Noll, M., Kleta, S., Dahouk, S.A., 2017. Antibiotic susceptibility of 259 *Listeria monocytogenes* strains isolated from food, food-processing plants and human samples in Germany. *J. Infect. Public Health*, in press.

Oliveira, T.S., Varjão, L.M., Silva, L.N.N., Pereira, R.C.B., Hofer, E., Vallim, D.C., Almeida, R.C.C., 2018. *Listeria monocytogenes* at chicken slaughterhouse: occurrence, genetic relationship among isolates and evaluation of antimicrobial susceptibility. *Food Control* 88, 131-138.

Orsi, R.H., den Bakker, H.C., Wiedmann, M., 2011. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *Int. J. Med. Microbiol.* 301, 79-96.

Pereira, B.P., Vieira, T.R., Valent, J.Z., Bruzza, A., Wagner, S.A., Pinto, A.T., Schmidt, V., 2014. Implications of the quality of the production process artisan cheese serrano. *REGET* 18, 116-126.

Pontarolo, G.H., Melo, F.D., Martini, C.L., Wildemann, P., Alessio, D.R.M., Sfaciotte, R.A.P., Neto, A.T., Vaz, E.K., Ferraz, S.M., 2017. Quality and safety of artisan cheese produced in the Serrana region of Santa Catarina. *Semina: Ciênc. Agrár.* 38, 739-748.

Rajabian, T., Gavicherla, B., Heisig, M., Müller-Altrock, S., Goebel, W., Gray-Owen, S.D., Ireton, K., 2009. The bacterial virulence factor InlC perturbs apical cell junctions and promotes cell-to-cell spread of *Listeria*. *Nat. Cell Biol.* 11, 1212-1218.

Ruan, Y., Reselj, S., Zavec, A.B., Anderluh, G., Scheuring, S., 2016. Listeriolysin O membrane damaging activity involves arc formation and lineaction - Implication for *Listeria monocytogenes* escape from phagocytic vacuole. *PLoS Pathog.* 12, e1005597.

Su, X., Zhang, J., Shi, W., Yang, X., Li, Y., Pan, H., Kuang, D., Xu, X., Shi, X., Meng, J., 2016. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolated from foods and humans. *Food Control* 70, 96-102.

Tahoun, A.B.M.B., Abou Elez, R.M.M., Abdelfatah, E.N., Elsohaby, I., El-Gedawy, A.A., Elmoslemany, A.M., 2017. *Listeria monocytogenes* in raw milk, milking equipment and dairy workers: Molecular characterization and antimicrobial resistance patterns. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 10, 264-270.

Toomey, N., Monaghan, A., Fanning, S., Bolton, D.J., 2009. Assessment of antimicrobial resistance transfer between lactic acid bacteria and potential foodborne pathogens using in vitro methods and mating in a food matrix. *Foodborne Pathog. Dis.* 6, 925-933.

Van Stelten, A., Simpson J.M., Ward, T.J., Nightingale, K.K., 2010. Revelation by single-nucleotide polymorphism genotyping that mutations leading to a premature stop codon in *inlA* are common among *Listeria monocytogenes* isolates from ready-to-eat foods but not human listeriosis cases. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2783-2790.

Walker, S.J., Archer, P., Banks, J.G., 1990. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *J. Appl. Bacteriol.* 68, 157-162.

Wang, X., Lü, X., Yin, L., Liu, H., Zhang, W., Si, W., Yu, S., Shao, M., Liu, S., 2013. Occurrence and antimicrobial susceptibility of *Listeria monocytogenes* isolates from retail raw foods. *Food Control* 32, 153-158.



## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo revelou a presença de *E. coli* potencialmente diarreio gênicas (EPEC, ETEC e EAEC), com perfil de multirresistência aos antimicrobianos, produtoras de ESBL e com potencial capacidade de produzir biofilmes, isoladas a partir de leite cru e queijo artesanal serrano produzido em Santa Catarina. Além disso, ficou evidenciado a presença dos principais fatores de virulência envolvidos na patogenicidade de *L. monocytogenes*, além do alto índice de resistência a múltiplos antimicrobianos utilizados no tratamento da listeriose humana.

Tais dados sugerem um problema de saúde pública, uma vez que o queijo artesanal serrano oferece riscos à saúde dos consumidores, bem como apontam para a necessidade de intensificação dos controles higiênico-sanitários em todas as etapas de produção, bem como para a implementação de medidas que permitam a vigilância epidemiológica das cepas bacterianas potencialmente patogênicas nos queijos artesanais produzidos na região serrana de Santa Catarina, sul do Brasil.





## REFERÊNCIAS

- ALLEN, K. J. et al. *Listeria monocytogenes* – An examination of food chain factors potentially contributing to antimicrobial resistance. **Food Microbiology**, London, v. 54, p. 178-189, apr. 2016. Doi: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.006>>.
- ALMEIDA, R. M. et al. Virulence genes and genetic relationship of *L. monocytogenes* isolated from human and food sources in Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 21, n. 3, p. 282-289, maio/jun. 2017. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2017.01.004>>.
- ALTALHI, A. D.; HASSAN, S. A. Bacterial quality of raw milk investigated by *Escherichia coli* and isolates analysis for specific virulence-gene markers. **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 10, p. 913-917, oct. 2009. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.01.005>>.
- ÁLVAREZ-SUÁREZ, M. E.; OTERO, A.; GARCÍA-LÓPEZ, N. L.; SANTOS, J. A. Microbiological examination of bulk tank goat's milk in the Castilla y León region in northern Spain. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 78, n. 12, p. 2227-2232, dec. 2015. Doi: <<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-133>>.
- ALVES, V.O. **Avaliação higiênico-sanitária de amostras de queijos minas frescal artesanais comercializados em feiras livres da cidade de Volta Redonda – RJ e susceptibilidade antimicrobiana das estirpes patogênicas isoladas**. 2013. 132f. Dissertação (Mestrado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal). Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro-RJ, 2013.
- ASSIS, F. E. et al. M. Impact of *Aeromonas* and diarrheagenic *Escherichia coli* screening in patients with diarrhea in Paraná, Southern Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, London, v. 8, n. 12, p. 1609-1614, dec. 2014. Doi: <<https://doi.org/10.3855/jidc.4434>>.
- AZEREDO, J. et al. Critical review on biofilm methods. **Critical Reviews in Microbiology**, Cleveland, 43(3), 313-351, nov. 2016. Doi: <<http://dx.doi.org/10.1080/1040841X.2016.1208146>>.
- BADRI, S. et al. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from food in Casablanca (Morocco). **Food Control**, Guildford, v. 20, n. 6, p. 560-564, june 2009. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2008.08.015>>.
- BANDYOPADHYAY, S. et al. Characterization of shiga toxin producing (STEC) and enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in raw yak (*Poephagus grunniens*) milk and milk

products. **Research in Veterinary Science**, London, v. 93, n. 2, p. 604-610, oct. 2012. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.12.011>>.

BERTSCH, D. et al. Tn6198, a novel transposon containing the trimethoprim resistance gene *dfpG* embedded into a Tn916 element in *Listeria monocytogenes*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 68, p. 986-991, may. 2013. Doi: <<https://doi.org/10.1093/jac/dks531>>.

BONAZZI, M.; LECUIT, M.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes* internalin and e-cadherin: from bench to bedside. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, New York, v. 1, n. 4, a003087, jan. 2009. Doi: <<http://doi.org/10.1101/cshperspect.a003087>>.

BARANCELLI, G. V. et al. Incidence of *Listeria monocytogenes* in cheese manufacturing plants from the northeast region of São Paulo, Brazil. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 74, n. 5, p. 816-819, may. 2011. Doi: <<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-10-489>>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamentos técnicos de identidade e qualidade dos produtos lácteos. Portaria n. 146 de 07/03/1996. **Diário Oficial da União**. Brasília. Seção 1, p. 3977.

BRÜSSOW, H. Enteroaggregative *E. coli*. **Encyclopedia of Food Microbiology**, Oxford, v. 1, p. 706-712, aug. 2014. Doi: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00387-6>>.

BUCHANAN, R. L. et al. A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. **Food Control**, Guildford, v. 75, p. 1-13, may. 2017. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.016>>.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v.54, n.3, p.969–976, mar. 2010. Doi: <<https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>>.

BYRNE, V. V. et al. Occurrence and antimicrobial resistance patterns of *Listeria monocytogenes* isolated from vegetables. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 47, p. 438-443, apr/june 2016. Doi: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.033>>.

CAGRI-MEHMETOGLU, A. et al. Incidence of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in two Kasar Cheese processing environments. **Food Control**, Guildford, v. 22, n. 5, p. 762-766, may. 2011. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.11.011>>.

CAMEJO, A. et al. The arsenal of virulence factors deployed by *Listeria monocytogenes* to promote its cell infection cycle. **Virulence**, London, v. 2, n. 5, p. 379-394, sept. 2011. Doi: <<http://doi.org/10.4161/viru.2.5.17703>>.

CAMERON, L. A. et al. Motility of ActA protein-coated microspheres driven by actin polymerization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, p. 4908-4913, apr. 1999. Doi: <<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.9.4908>>.

CAMILI, A.; TILNEY, L. G.; PORTNOY, D. A. Dual roles of plcA in *Listeria monocytogenes* pathogenesis. **Molecular Microbiology**, Massachusetts, v. 8, n. 1, p. 143-157, apr. 1993. Doi: <<http://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01211.x>>.

CAMPOS, A. C. L. P. et al. Virulence genes and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* from cheese made from unpasteurized milk in Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, New York, v. 15, n. 2, p. 94-100, feb. 2018. Doi: <<https://doi.org/10.1089/fpd.2017.2345>>.

CANIZALEZ-ROMAN, A. et al. Prevalence and antibiotic resistance profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from food items in northwestern Mexico. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 164, n. 1, p. 36-45, june 2013. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.03.020>>.

CARATTOLI, A. Plasmids and the spread of resistance. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 303, n. 6, p.298-304, aug. 2013. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.001>>.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Multistate outbreak of Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7 infections linked to ground beef (final update)**. 2014. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/ecoli/2014/O157H7-05-14/index.html>>. Acesso em 29 de março de 2018.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Multistate outbreak of Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7 infections linked to Costco Rotisserie chicken Salad (final update)**. 2015. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/ecoli/2015/o157h7-11-15/index.html>>. Acesso em 29 de março de 2018.

CHAGAS, L. G. S. et al. Evaluation of biofilm formation by bacterial strains isolated from milking equipment and milk samples from cows with mastitis. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 38, n. 4, p. 1887-1896, july/ago. 2017. Doi: <<https://doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n4p1887>>.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. Approved standard-28th edition. M100-S28. Wayne, PA, 2018.

CÓRDOVA, U. A. et al. **Queijo artesanal serrano: séculos de travessia de mares, serras e vales – A história nos campos da Serra Catarinense**. Florianópolis: Epagri. 2010, 43p. (EPAGRI. Documentos, 234).

CORONEO, V. et al. Detection of virulence genes and growth potential in *Listeria monocytogenes* strains isolated from Ricotta Salata cheese. **Journal of Food Science**, Champaign, v. 81, n. 1, M114-20, jan. 2016. Doi: <<https://doi.org/10.1111/1750-3841.13173>>.

COSTERTON, J. W. et al. Bacterial biofilms in nature and disease. **Annual Review of Microbiology**, California, v. 41, p. 435-464, oct. 1987. Doi: <<https://doi.org/10.1146/annurev.mi.41.100187.002251>>.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial Biofilms: A common cause of persistent infections. **Science**, Washington, v. 284, n. 5418, p. 1318-1322, may. 1999.

CROXEN, M. A.; FINLAY, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 8, n. 1, p. 26-38, jan. 2010. Doi: <<https://doi.org/10.1038/nrmicro2265>>.

CRUZ, F., T. et al. Queijo Artesanal Serrano dos Campos de Cima da Serra: o saber-fazer tradicional desafiando a qualidade. In: IV Congresso Internacional de la Red SIAL, 2008, Mar del Plata. **Anais...** Mar del Plata: Argentina, 2008.

CULLER, H. F. et al. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains form biofilm on abiotic surfaces regardless of their adherence pattern on cultured epithelial cells. **BioMed Research International**, London, v. 2014, n. 845147, may. 2014. Doi: <<https://dx.doi.org/10.1155%2F2014%2F845147>>.

DADAWALA, A. I. et al. Assessment of *Escherichia coli* isolates for *in vitro* biofilm production. **Veterinary World**, Wankaner, v. 3, n. 8, p. 364-366, aug. 2010.

DAHIYA, S. et al. Carbapenemases: A review. **International Journal of Advanced Health Sciences**, Latur, v. 2, n. 4, p. 11-17, aug. 2015.

DALLENNE, C. et al. Development of a set of multiplex PRC assays for the detection of genes encoding important  $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 65, p. 490-495, jan. 2010. Doi: <<https://doi.org/10.1093/jac/dkp498>>.

DALLMAN, T. J. et al. An investigation of the diversity of strains of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from cases associated with a large multi-pathogen foodborne outbreak in the UK. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 5, e98103, may. 2014. Doi: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098103>>.

DE, A.; et al. Detection of biofilm formation in bacteria from cases of urinary tract infections, septicemia, skin and soft tissue infections and post-operative infections by Congo Red Agar method. **Journal of Academy of Medical Sciences**, Mumbai, v. 2, n. 1, p. 46-47, jan/mar. 2012. Doi: <<https://doi.org/10.4103/2249-4855.104017>>.

DOMÉNECH, E.; JIMENEZ-BELENGUER, A.; AMOROS, J. A.; FERRUS, M. A.; ESCRICHE, I. Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains isolated in ready-to-eat foods in Eastern Spain. **Food Control**, Guildford, v. 47, p. 120-125, jan. 2015. Doi: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.06.043>>.

DONLAN, M. D. Biofilms: Microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 8, n. 9, p. 881-890, sept. 2002.

DOUMITH, M. et al. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. **Infection and Immunity**, Washington, v. 72, n. 2, p. 1072-1083, feb. 2004. Doi: <<http://doi.org/10.1128/IAI.72.2.1072-1083.2004>>.

DOUROU, D. et al. Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 at different temperatures, on various food-contact surfaces encountered in beef processing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 149, n. 3, p. 262-268, oct. 2011. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.004>>.

DREVETS, D.; BRONZE, M. S. *Listeria monocytogenes*: epidemiology, human disease, and mechanisms of brain invasion. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 53, p. 151-165, july 2008. Doi: <<https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2008.00404.x>>.

DUBREUIL, J. D. Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC). **Encyclopedia of Food Microbiology**, Oxford, v. 2, p. 728-734, aug. 2014. Doi: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00385-2>>.

DUFFY, G. Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), Including Non-O157. **Encyclopedia of Food Microbiology**, Oxford, v. 1, p. 713-717, aug. 2014. Doi: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00384-0>>.

DUPONT, H. L. et al. Pathogenesis of *Escherichia coli* diarrhea. **The New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 285, n. 1, p. 1-9, july 1971. Doi: <<https://doi.org/10.1056/NEJM197107012850101>>.

DU, X. et al. Isolation and characterization of *Listeria monocytogenes* in chinese food obtained from the central area of China. **Food Control**, Guildford, v. 74, p. 9-16, apr. 2017. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.11.024>>.

ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control. **Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe 2012**. Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-net) (Stockholm, ECDC). 2013.

EL BANNA, T. E. et al. Clinical and environmental prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria monocytogenes* in Dakahlea Governorate, Egypt. **Clinical Microbiology**, New York, v. 5, n. 249, june 2016. Doi: <<http://dx.doi.org/10.4172/2327-5073.1000249>>.

ENGELBRECHT, F. et al. A new PrfA-regulated gene of *Listeria monocytogenes* encoding a small, secreted protein which belongs to the family of internalins. **Molecular Microbiology**, Massachusetts, v. 21, n. 4, p. 823-837, aug. 1996.

ESCHER, M. et al. A severe foodborne outbreak of diarrhoea linked to a canteen in Italy caused by enteroinvasive *Escherichia coli*, an uncommon agent. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 142, n. 12, p. 2559-2566, dec. 2014. Doi: <<https://doi.org/10.1017/S0950268814000181>>.

FALLAH, A. A.; SAEI-DEHKORDI, S. S.; MAHZOUNIEH, M. Occurrence and antibiotic resistance profiles of *Listeria monocytogenes* isolated from seafood products and market and processing environments in Iran. **Food Control**, Guildford, v. 34, p. 630-636, dec. 2013. Doi: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.015>>.

FEITOSA, T. et al. Pesquisa de *Salmonella* sp., *Listeria* sp. e microrganismos indicadores higiênico-sanitários em queijos produzidos no estado do Rio Grande do Norte. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, n. supl, p. 162-165, dez. 2003.

FERREIRA, V. et al. *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. **Journal of Food**

**Protection**, Ames, v. 77, n. 1, p. 150-170, jan. 2014. Doi: <<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-13-150>>.

FRANCO, B.D.G.M; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182p.

FDA. Food and Drug Administration. **Enteroinvasive Escherichia coli**. 2012. Disponível em:<<https://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/UCM297627.pdf>> . Acesso em 28 de março de 2018.

FOSTER, M. A. et al. Enteropathogenic and enteroaggregative *E. coli* in stools of children with acute gastroenteritis in Davidson county, Tennessee. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 83, n. 3, p. 319-324, nov. 2015. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.07.016>>.

GAASTRA, W.; SVENNERHOLM, A. M. Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 4, n. 11, p. 444-452, nov. 1996.

GEDDE, M. M. et al. Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 68, n. 2, p. 999-1003, feb. 2000. Doi: <<http://doi.org/10.1128/IAI.68.2.999-1003.2000>>.

GENC, O.; AKSU, E.; GULCAN, A. The identification of carbapenemase types in *Enterobacteriaceae* by using molecular assay and phenotyping confirmation tests. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 125, p. 8-11, june 2016. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.03.010>>.

GEOFFROY, C. et al. Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 55, n. 7, p. 1641-1646, july 1987.

GIAOURIS, E. et al. Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 6, n. 841, p. 1-26, aug. 2015. Doi: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00841>>.

GOMES, L. C. et al. 96-well microtiter plates for biofouling simulation in biomedical settings. **Biofouling**, Chur, v. 30, n. 5, p. 535-546, apr. 2014. Doi: <<https://doi.org/10.1080/08927014.2014.890713>>.

GOMES, T. A. T. et al. Emerging Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains?. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 10, n. 10, p. 1851-1855, oct. 2004. Doi: <<https://dx.doi.org/10.3201%2Fcid1010.031093>>.

GOMES, T. A. T. et al. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 47S, p. 3-30, dec. 2016. Doi: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>>.

GÓMEZ-ALDAPA, C. A. et al. Prevalence and behavior of multidrug-resistant shiga toxin-producing *Escherichia coli*, enteropathogenic *E. coli* and enterotoxigenic *E. coli* on coriander. **Food Microbiology**, v. 59, p. 97-103, oct. 2016. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.05.014>>.

GÓMEZ, D. et al. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* from meat products and meat-processing environment. **Food Microbiology**, London, v. 42, p. 51-65, sept. 2014. Doi: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2014.02.017>>.

GUILLÉN, L.; MILLÁN, B. ARAQUE, M. Caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* alisadas de productos lácteos artesanales elaborados em Mérida, Venezuela. **Infectio**, Bogotá, v. 18, n. 3, p. 100-108, july/sept. 2014. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.infect.2014.04.004>>.

GUNDOGAN, N.; AVCI, E. Prevalence and antibiotic resistance of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species isolated from foods of animal origin in Turkey. **African Journal of Microbiology Research**, Ibadan, v. 7, n. 31, p. 4059-4064, aug. 2013. Doi: <<https://doi.org/10.5897/AJMR12.943>>.

GYLES, C. L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 85, p. 45-62, mar. 2007. Doi: <<https://doi.org/10.2527/jas.2006-508>>.

GYLES, C. L.; FAIRBROTHER, J. M. *Escherichia coli*. In: GYLES, C. A.; PRESCOTT, J. F.; SONGER, J. G.; THOEN, C. O. (Eds). **Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals**. 4. ed.: Wiley-Blackwell, Iowa, p. 231-265, 2010. Doi: <<https://doi.org/10.1002/9780470958209.fmatter>>.

HAMON, M.; BIERNE, H.; COSSART, P. *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 4, p. 423-434, june 2006. Doi: <<http://doi.org/10.1038/nrmicro1413>>.

HAMON, M. A. et al. Listeriolysin O: the swiss army knife of *Listeria*. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 20, n. 8, p. 360-368, aug. 2012. Doi: <<http://doi.org/10.1016/j.tim.2012.04.006>>.



HARADA, T. et al. A foodborne outbreak of gastrointestinal illness caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* serotype O169:H41 in Osaka, Japan. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, Tokyo, v. 66, n. 6, p. 530-533, nov. 2013.

HARAKEH, S. et al. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from dairy-based food products. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 407, n. 13, p. 4022-4027, june 2009. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.04.010>>.

HARRIGTON, S. M.; DUDLEY, E. G.; NATARO J. P. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 245, p. 12-18, jan. 2006. Doi: <<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00005.x>>.

HASSAN, A. et al. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. **The Brazilian Journal of infectious Diseases**, Salvador, v. 15, n. 4, p. 305-311, jul/aug. 2011.

HERNANDES, R. T. et al. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 297, n. 2, p. 137-149, aug. 2009. Doi: <<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01664.x>>.

HOBLEY, L. et al. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 39, n. 5, p. 649-669, sept. 2015. Doi: <<https://dx.doi.org/10.1093%2Ffemsre%2Ffuv015>>.

HOLKO, I. et al. Virulence markers of *Escherichia coli* strains isolated from traditional cheeses made from unpasteurised sheep milk in Slovakia. **Food Control**, Guildford, v. 17, n. 5, p. 393-396, may. 2006. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.01.007>>.

HUANG, D. B. et al. Enteroaggregative *Escherichia coli* is a cause of acute diarrheal illness: a meta-analysis. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 43, n. 5, p. 556-563, sept. 2006. Doi: <<https://doi.org/10.1086/505869>>.

HU, J.; TORRES, A. G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander?. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 21, p. 729-734, aug. 2015. Doi: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cmi.2015.01.015>>.

IDE, L. P. A.; BENEDET, H. D. Contribuição ao conhecimento do queijo colonial produzido na região serrana do Estado de Santa Catarina. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 6, p. 1352-1358, nov/dez. 2001.

IGLESIAS, M. A. et al. Occurrence and phenotypic and molecular characterization of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in slaughterhouses in southern Brazil. **Food Research International**, Barking, v. 100, n. 1, p. 96-101, oct. 2017. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.06.023>>.

JACOBY, G. A. AmpC  $\beta$ -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 22, n. 1. p. 161-182, jan. 2009. Doi: <<https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08>>.

JAMALI, H.; RADMEHR, B.; THONG, K. L. Prevalence, characterization, and antimicrobial resistance of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* isolates from raw milk in farm bulk tanks. **Food Control**, Guildford, v. 34, p. 121-125, nov. 2013. Doi: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.04.023>>.

JAY, J. M. **Microbiologia de Alimentos**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711p.

JENSEN, B. H. et al. Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 27, n. 3, p. 614-630, july 2014. Doi: <<https://doi.org/10.1128/CMR.00112-13>>.

KAHRAMAN, T. et al. Prevalence of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in different cheese types produced in Turkey. **British Food Journal**, Bradford, v. 112, n. 11, p. 1230-1236, nov. 2010. Doi: <<https://doi.org/10.1108/00070701011088214>>.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 2, p. 123-140, feb. 2004. Doi: <<https://doi.org/10.1038/nrmicro818>>.

KARMALI, M. A. et al. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. **The Lancet**, London, v. 1, n. 8325, p. 619-620, mar. 1983.

KASPER, S. et al. Epidemiology of listeriosis in Austria. **Wiener klinische Wochenschrift**, Vienna, v. 121, p. 113-119, feb. 2009. Doi: <<https://doi.org/10.1007/s00508-008-1130-2>>.

KAUR, P.; CHAKRABORTI, A.; ASEA, A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: An emerging enteric food borne pathogen. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, London, v. 2010, id. 254159, p. 1-10, jan. 2010. Doi: <<http://doi.org/10.1155/2010/254159>>.

KEVENK, T. O.; GULEL, G. T. Prevalence, antimicrobial resistance and serotype distribution of *Listeria monocytogenes* isolated from raw milk and dairy products. **Journal of Food Safety**, Westport, v. 36, p. 11-18, feb. 2016. Doi: <<https://doi.org/10.1111/jfs.12208>>.

KHEDR, A.; ELMONIR, W.; SOBEIH, A. Public health risk of *Listeria monocytogenes* in raw milk in Egypt: Virulence genes, antibiotic-resistance and high-risk consumption practices. **International Journal of Applied and Natural Sciences**, Chennai, v. 5, n. 4, p. 57-64, jan. 2016.

KING, L. A. et al. Foodborne transmission of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:[H7] via ground beef: an outbreak in northern France, 2011. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 20, n. 12, O1136-O1144, dec. 2014. Doi: <<https://doi.org/10.1111/1469-0691.12736>>.

KIRBIS, A.; KRIZMAN, M. Spread of antibiotic resistant bacteria from food of animal origin to humans and vice versa. **Procedia Food Science**, Amsterdam, v. 5, p. 148-151, may. 2015. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.profoo.2015.09.043>>.

KOCKS, C. et al. The unrelated surface proteins ActA of *Listeria monocytogenes* and IcsA of *Shigella flexneri* are sufficient to confer actin-based motility on *Listeria innocua* and *Escherichia coli* respectively. **Molecular Microbiology**, Massachusetts, v. 18, n. 3, p. 413-423, nov. 1995. Doi: <[http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi\\_18030413.x](http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_18030413.x)>.

KONGO, J. N. et al. Detection and Characterization of *Listeria monocytogenes* in São Jorge (Portugal) cheese production. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 89, n. 11, p. 4456-4461, nov. 2006. Doi: <[https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72494-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72494-8)>.

KRONE, E. E. **Identidade e cultura nos Campos de Cima da Serra (RS): práticas, saberes e modos de vida de pecuaristas familiares produtores do queijo serrano**. 2009. 146f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Rural). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 2009.

KUHN, M.; GOEBEL, W. Identification of an extracellular protein of *Listeria monocytogenes* possibly involved in intracellular uptake by mammalian cells. **Infection and Immunity**, Washington, v. 57, n. 1, p. 55-61, jan. 1989.

LAMPEL, K. A. Enteroinvasive *Escherichia coli*: Introduction and detection by classical cultural and molecular techniques. **Encyclopedia of Food Microbiology**, Oxford v. 1, p. 718-721, aug. 2014. Doi: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00386-4>>.

LECUIT, M. Human listeriosis and animal models. **Microbes and Infection**, Paris, v. 9, p. 1216-1225, aug. 2007. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.05.009>>.

LEEDOM, J. Milk of nonhuman origin and infectious diseases in humans. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 43, n. 5, p. 610-615, sept. 2006. Doi: <<https://doi.org/10.1086/507035>>.

LEE, J. H.; BAE, I. K.; LEE, S. H. New definitions of extended-spectrum beta-lactamase conferring worldwide emerging antibiotic resistance. **Medicinal Research Reviews**, New York, v. 32, n. 1, p. 216-232, jan. 2012. Doi: <<https://doi.org/10.1002/med.20210>>.

LIU, D. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. **Journal of Medical Microbiology**, Edinburgh, v. 55, p. 645-659, june 2006. Doi: <<https://doi.org/10.1099/jmm.0.46495-0>>.

LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. The  $\beta$ -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **Trends in Microbiology**, Cambridge, v. 14, n. 9, p. 413-420, sept. 2006. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.tim.2006.07.008>>.

LOZER, D. M. et al. Genotypic and phenotypic analysis of diarrheagenic *Escherichia coli* strains isolated from Brazilian children living in low socioeconomic level communities. **BMC Infectious Diseases**, London, v. 13, n. 418, p. 1-6, sept. 2013. Doi: <<https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-418>>.

MACDONALD, E. et al. An outbreak of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) infection in Norway, 2012: a reminder to consider uncommon pathogens in outbreaks involving imported products. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 143, n. 3, p. 486-493, feb. 2015. Doi: <<https://doi.org/10.1017/S0950268814001058>>.

MADSEN, J. S. et al. The interconnection between biofilm formation and horizontal gene transfer. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, Amsterdam, v. 65, n. 2, p. 183-195, july 2012. Doi: <<https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2012.00960.x>>.

MAINIL, J. *Escherichia coli* virulence factors. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 152, n. 1-2, p. 2-12, mar. 2013. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.09.032>>.

MELO, F. D. et al. Avaliação da inocuidade e qualidade microbiológica do queijo artesanal serrano e sua relação com as variáveis físico químicas e o período de maturação. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 41, n. 1152, out. 2013.

MELO, J.; ANDREW, P.W.; FALEIRO, M.L. *Listeria monocytogenes* in cheese and the dairy environment remains a food safety challenge: the role of stress responses. **Food Research International**, Barking, v. 67, p. 75-90, jan. 2015. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.10.031>>.

MELTON-CELSA, A. R. Shiga toxin (Stx) classification, structure, and function. **Microbiology Spectrum**, Bel Air, v. 2, n. 3, p. 1-13, june 2014. Doi: <<https://dx.doi.org/10.1128%2Fmicrobiolspec.EHEC-0024-2013>>.

MENÉNDEZ, S. et al. Microbiological, chemical and biochemical characteristics of 'Tetilla' raw cows-milk cheese. **Food Microbiology**, London, v. 18, p. 151-158, apr. 2001. Doi: <<https://doi.org/10.1006/fmic.2000.0385>>.

MICHELACCI, V. et al. Characterization of an emergent clone of enteroinvasive *Escherichia coli* circulating in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, Oxford, v. 22, n. 3, p. 287 e11-19, mar. 2016. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.10.025>>.

MO, S. S. et al. Risk factors for occurrence of cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in Norwegian broiler flocks. **Preventive Veterinary Medicine**, Amsterdam, v. 130, p. 112-118, aug. 2016. <<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.06.011>>.

MONROE, D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. **PLoS Biology**, San Francisco, v. 5, n. 11, e307, nov. 2007. Doi: <<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050307>>.

MOREIRA, J. M. R. et al. The effect of glucose concentration and shaking conditions on *Escherichia coli* biofilm formation in microtiter plates. **Chemical Engineering Science**, Oxford, v. 94, p. 192-199, may. 2013. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.ces.2013.02.045>>.

MORIN, N. et al. Characterization of the AggR regulon in enteroaggregative *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, Washington, v. 81, n. 1, p. 122-132, jan. 2013. Doi: <<https://doi.org/10.1128/IAI.00676-12>>.

MOOSAVY, M. H. et al. Isolation of *Listeria monocytogenes* from milks used for Iranian traditional cheese in Lighvan cheese factories. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, Lublin, v. 21, n. 4, p. 728-729, dec. 2014. Doi: <<https://doi.org/10.5604/12321966.1129923>>.

MÜHLEMANN, M. Safety of food and beverages: Dairy products: Cheese. **Encyclopedia of Food Safety**, Massachusetts, v. 3, p. 297-308, feb. 2014. Doi: <<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378612-8.00415-7>>.

NATARO, J. P. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. **Current Opinion in Gastroenterology**, New York, v. 21, n. 1, p. 4–8, jan. 2005.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 11, p. 142-201, jan. 1998.

NATARO, J. P. et al. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, Baltimore, v. 6, n. 9, p. 829-831, sept. 1987.

NEWITT, S. et al. Two linked enteroinvasive *Escherichia coli* outbreaks, Nottingham, UK, june 2014. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 22, n. 7, p. 1178-1184, july 2016. Doi: <<http://dx.doi.org/10.3201/eid2207.152080>>.

NOBILI, G. et al. Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in raw milk and mozzarella cheese in southern Italy. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 99, n. 10, p. 7877-7880, oct. 2016. Doi: <<https://doi.org/10.3168/jds.2016-11613>>.

NOLL, M.; KLETA, S.; AL DAHOUK, S. A. Antibiotic susceptibility of 259 *Listeria monocytogenes* strains isolated from food, food-processing plants and human samples in Germany. **Journal of Infection and Public Health**, Saudi Arabian, In Press, Corrected Proof, 2017. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.jiph.2017.12.007>>.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 17, n. 10, p. 1791-1798, oct. 2011. Doi: <<https://doi.org/10.3201/eid1710.110655>>.

NTULI, V.; NJAGE, P. M. K.; BUYS, E. M. Characterization of *Escherichia coli* and other *Enterobacteriaceae* in producer-distributor bulk milk. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 99, n. 12, p. 9534-9549, dec. 2016. Doi: <<https://doi.org/10.3168/jds.2016-11403>>.

OLIVEIRA, T. S. et al. *Listeria monocytogenes* at chicken slaughterhouse: occurrence, genetic relationship among isolates and evaluation of antimicrobial susceptibility. **Food Control**, Guildford, v. 88, p. 131-138, june 2018. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.01.015>>.

OMBARAK, R. A. et al. Prevalence and pathogenic potential of *Escherichia coli* isolates from raw milk and raw milk cheese in Egypt. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 221, p. 69-76, mar. 2016. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.009>>.

ORSI, R. H.; DEN BAKKER, H. C.; WIEDMANN, M. *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 301, n. 2, p. 79-96, feb. 2011. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.05.002>>.

PAGE, A. V.; LILES, W. C. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections and the Hemolytic-Uremic Syndrome. **Medical Clinics of North America**, Philadelphia, v. 97, n. 4, p. 681-695, july 2013. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.mcna.2013.04.001>>.

PARK, J. H. et al. Diarrheal outbreak caused by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* O157:H45 in south Korea. **Foodborne Pathogens and Disease**, New York, v. 11, n. 10, p. 775-781, sept. 2014. Doi: <<https://doi.org/10.1089/fpd.2014.1754>>.

PATERSON, D.L.; BONOMO, R.A. Extended-spectrum-lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 18, n. 4, p. 657-686, oct. 2005. Doi: <<https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>>.

PAVLICKOVA, S. et al. Antibiotic resistance, virulence factors and biofilm formation ability in *Escherichia coli* strains isolated from chicken meat and wildlife in the Czech Republic. **Journal of Environmental Science and Health**, New York, v. 52, n. 8, p. 570-576, may. 2017. Doi: <<https://doi.org/10.1080/03601234.2017.1318637>>.

PEREIRA, B. P. et al. Implicações do processo produtivo na qualidade do queijo artesanal serrano. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, Santa Maria, v. 18, p. 116-126, abr. 2014. Doi: <<http://dx.doi.org/10.5902/2236117013183>>.

PFEIFER, Y.; CULLIK, A.; WITTE, W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 300, n. 6, p. 371-379, aug. 2010. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.04.005>>.

PILGRIM, S. et al. Deletion of the gene encoding p60 in *Listeria monocytogenes* leads to abnormal cell division and loss of actin-based motility. **Infection and Immunity**, Washington, v. 71, p. 3473- 3484, june 2003. Doi: <<http://dx.doi.org/10.1128/IAI.71.6.3473-84.2003>>.

PONTAROLO, G. H. et al. Quality and safety of artisan cheese produced in the serrana region of Santa Catarina. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 38, n. 2, p. 739-748, mar/abr. 2017. Doi: <<http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2017v38n2p739>>.

PONNUSSAMY, P.; NATARAJAN, V.; SEVANAN, M. In vitro biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli* and their antimicrobial susceptibility pattern. **Asian Pacific**

**Journal of Tropical Medicine**, [S.I.], v. 5, n. 3, p. 210-213, mar. 2012. Doi: <[https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60026-1](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60026-1)>.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 20, n. 3, p. 440-458, july 2007. Doi: <<https://doi.org/10.1128/CMR.00001-07>>.

RAJABIAN, T. et al. The bacterial virulence factor InlC perturbs apical cell junctions and promotes cell-to-cell spread of *Listeria*. **Nature Cell Biology**, London, v. 11, n. 10, p. 1212-1218, sept. 2009. Doi: <<http://doi.org/10.1038/ncb1964>>.

RANDALL, L. P. et al. Evaluation of meat, fruit and vegetables from retail stores in five United Kingdom regions as sources of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing and carbapenem-resistant *Escherichia coli*. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 241, p. 283-290, jan. 2017. Doi: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.036>>.

RASHID, M. et al. Prevalence, genetic profile of virulence determinants and multidrug resistance of *Escherichia coli* isolates from foods of animal origin. **Veterinary World**, Wankaner, v. 6, n. 3, p. 139-142, jan. 2013. Doi: <<http://dx.doi.org/10.5455/vetworld.2013.139-142>>.

RIBEIRO, L. F. et al. Antimicrobial resistance and virulence factors of *Escherichia coli* in cheese made from unpasteurized milk in three cities in Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, New York, v. 13, n. 9, p. 469-476, sept. 2016. Doi: <<https://doi.org/10.1089/fpd.2015.2106>>.

RIES, J. E.; LUZ, J. C. S.; WAGNER, S. A. Projeto de qualificação e certificação do queijo serrano produzido nos Campos de Cima da Serra do Rio Grande do Sul – Relato parcial de experiência. **Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Porto Alegre, v. 5, n. 1, p. 10-19, jan/abr. 2012.

RILEY, L. W. et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. **The New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 308, n. 12, p. 681-685, mar. 1983. Doi: <<https://doi.org/10.1056/NEJM198303243081203>>.

ROCOURT, J.; BUCHRIESER, C. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. In: RYSER, E.T.; MARTH, E.H. **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. 3.ed. Boca Raton: CRC Press, 2007, c. 1, p. 1-20.



RODRIGUES, L. B. et al. Quantification of biofilm production on polystyrene by *Listeria*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from a poultry slaughterhouse. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 4, p. 1082-1085, oct. 2010. Doi: <<https://doi.org/10.1590/S1517-838220100004000029>>.

RUAN, Y. et al. Listeriolysin O membrane damaging activity involves arc formation and lineaction - Implication for *Listeria monocytogenes* escape from phagocytic vacuole. **PLOS Pathogens**, San Francisco, v.12, n. 4, e1005597, apr. 2016. Doi: <<http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005597>>.

SALEH, I. et al. Antimicrobial resistance and pathogenicity of *Escherichia coli* isolated from common dairy products in the Lebanon. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, London, v. 103, n. 1, p. 39-52, july 2013. Doi: <<https://doi.org/10.1179/136485909X384965>>.

SANTA CATARINA. Governo do Estado de Santa Catarina. Dispõe sobre a produção e a comercialização do queijo artesanal serrano, no Estado de Santa Catarina. Lei n. 17.003, de 01/09/2016. **Diário Oficial Eletrônico**. Santa Catarina.

SASAKAWA, C. A. A new paradigm of bacteria-gut interplay brought through the study of *Shigella*. **Proceedings of the Japan Academy**, Tokyo, v. 86, n. 3, p. 229-243, mar. 2010. Doi: <<https://dx.doi.org/10.2183%2Fpjab.86.229>>.

SCHLECK, W. F. et al. Epidemic listeriosis – evidence for transmission by food. **The New England Journal of Medicine**, Massachusetts, v. 308, n. 4, p. 203-206, jan. 1983. Doi: <<https://doi.org/10.1056/NEJM198301273080407>>.

SHAW, R. K. et al. Interaction of enteropathogenic *Escherichia coli* with human intestinal mucosa: role of effector proteins in brush border remodeling and formation of attaching and effacing lesions. **Infection and Immunity**, Washington, v. 73, n. 2, p. 1243-1251, feb. 2005. Doi: <<https://doi.org/10.1128/IAI.73.2.1243-1251.2005>>.

SEELEGER, H. P. R.; HÖHNE, K. Chapter II serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. **Methods in Microbiology**, London, v. 13, p. 31-49, jan. 1979. Doi: <[https://doi.org/10.1016/S0580-9517\(08\)70372-6](https://doi.org/10.1016/S0580-9517(08)70372-6)>.

SILAGYI, K. et al. Production of biofilm and quorum sensing by *Escherichia coli* O157:H7 and its transfer from contact surfaces to meat, poultry, ready-to-eat deli, and produce products. **Food Microbiology**, London, v. 26, n. 5, p. 514-519, aug. 2009. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.03.004>>.

SILK, B. J. et al. Invasive listeriosis in the foodborne diseases active Surveillance Network (FoodNet), 2004–2009: Further targeted prevention needed for higher-risk groups. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 54, n. S5, p. S396-404, june 2012. Doi: <<https://doi.org/10.1093/cid/cis268>>.

SILVA, V. A. M. et al. Avaliação da qualidade físico-química e microbiológica do leite cru, do leite pasteurizado tipo A e de pontos de contaminação de uma granja leiteira no RS. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 38, n. 1, p. 51-57, jan. 2010.

SINGH, A. S. et al. Isolation of *Escherichia coli* harboring *bla*<sub>NDM-5</sub> from fresh fish in India. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, Oxford, v. 49, n. 5, p. 822-823, oct. 2016. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.jmii.2014.11.004>>.

SKOČKOVÁ, A. et al. Antimicrobial-resistant and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in raw cow's milk. **Journal of Food Protection**, Ames, v. 78, n. 1, p. 72-77, jan. 2015. Doi: <<https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-250>>.

SLAMA, K. B. et al. Prevalence of broad-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* isolates in food samples in Tunisia, and characterization of integrons and antimicrobial resistance mechanisms implicated. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 137, n. 2, p. 281-286, feb. 2010. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.12.003>>.

SMALL, P. L.; FALKOW, S. Identification of regions on a 230-kilobase plasmid from enteroinvasive *Escherichia coli* that are required for entry into Hep-2 cells. **Infection and Immunity**, Washington, v. 56, n. 1, p. 225-229, jan. 1988.

SPELLBERG, B. et al. Combating antimicrobial resistance: policy recommendations to save lives. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 52, n. 5, p. 397-428, may. 2011. Doi: <<https://doi.org/10.1093/cid/cir153>>.

SOUZA, C. F. V.; DALLA ROSA, T.; AYUB, M. A. Z. Changes in the microbiological and physicochemical characteristics os Serrano cheeseduring manufacture and ripening. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 34, p. 260-266, july/sept. 2003. Doi: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822003000300016>>.

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

STEVENS, M. P.; FRANKEL, G. M. The locus of enterocyte effacement and associate virulence factors of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Microbiology Spectrum**, Bel Air, v. 2, n. 4, p. 1-25, aug. 2014. Doi: <<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.EHEC-0007-2013>>.

SU, Y. et al. Fluoroquinolone-resistant and extended-spectrum b-lactamase-producing *Escherichia coli* from the milk of cows with clinical mastitis in Southern Taiwan. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, Oxford, v. 49, n. 6, p. 892-901, dec. 2016. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.jmii.2014.10.003>>.

TAHOUN, A. B. M. B. et al. *Listeria monocytogenes* in raw milk, milking equipment and dairy workers: Molecular characterization and antimicrobial resistance patterns. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 10, p. 264-270, sept. 2017. Doi: <<http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.jgar.2017.07.008>>.

TEKINER, I. H.; OZPINAR, H. Occurrence and characteristics of extended spectrum beta-lactamases-producing *Enterobacteriaceae* from foods of animal origin. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 47, n. 2, p. 444-451, apr/june 2016. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.034>>.

TELLI, N. et al. Detection of the contamination sources of *Listeria monocytogenes* in pickled white cheese production process line and genotyping with the pulsed-field gel electrophoresis method. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, Ankara, v. 40, p. 630-636, nov. 2016. Doi: <<https://doi.org/10.3906/vet-1511-59>>.

TEPELI, S. O.; ZORBA, N. N. D. Frequency of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)– and AmpC  $\beta$ -lactamase–producing *Enterobacteriaceae* in a cheese production process. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 101, p. 1-9, apr. 2018. Doi: <<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13878>>.

THOMSON, K.S. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 48, n. 4, p. 1019-1025, apr. 2010. Doi: <<https://doi.org/10.1128/JCM.00219-10>>.

TOMA, C. et al. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 41, p. 2669-2671, june 2003. Doi: <<https://dx.doi.org/10.1128%2FJCM.41.6.2669-2671.2003>>.

TOOMEY, N. et al. Assessment of antimicrobial resistance transfer between lactic acid bacteria and potential foodborne pathogens using in vitro methods and mating in a food matrix. **Foodborne Pathogens and Disease**, New York, v. 6, n. 8, p. 925-933, oct. 2009. Doi: <<https://doi.org/10.1089/fpd.2009.0278>>.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; GOMES, T. A. T. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 8, n. 5, p. 508-513, may. 2002. Doi: <<https://dx.doi.org/10.3201%2Fcid0805.010385>>.

TZOUVELEKIS, L. S. et al. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 25, n. 4, p. 682-707, oct. 2012. Doi: <<https://doi.org/10.1128/CMR.05035-11>>.

VAN DEN BELD, M. J. C.; REUBSAET, F. A. G. Differentiation between Shigella, enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC) and noninvasive *Escherichia coli*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Wiesbaden, v. 31, p. 899-904, june 2012. Doi: <<https://doi.org/10.1007/s10096-011-1395-7>>.

VÁZQUEZ-BOLAND, J.A. et al. Pathogenicity islands and virulence evolution in *Listeria*. **Microbes and Infection**, Paris, v. 3, n. 7, p.571-584, june 2001b. Doi: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01413-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01413-7)>.

VÁZQUEZ-BOLAND, J. A. et al. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 14, n. 3, p. 584-640, july 2001a. Doi: <<https://dx.doi.org/10.1128%2FCMR.14.3.584-640.2001>>.

VERRAES, C. et al. Antimicrobial resistance in the food chain: A review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 10, n. 7, p. 2643-2669, june 2013. Doi: <<https://doi.org/10.3390/ijerph10072643>>.

VERT, M. et al. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). **Pure and Applied Chemistry**, Oxford, v. 84, n. 2, p. 377-410, nov. 2012. Doi: <<http://dx.doi.org/10.1351/PAC-REC-10-12-04>>.

VRABEC, M. et al. Antibiotic resistance and prevalence of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* isolated from Bryndza cheese. **Italian Journal of Animal Science**, Bologna, v. 14, n. 4, 3968, aug. 2015. Doi: <<http://dx.doi.org/10.4081/ijas.2015.3968>>.

WANG, J. et al. Biofilm formation, virulence gene profiles, and antimicrobial resistance of nine serogroups of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. **Foodborne Pathogens and Disease**, New York, v. 13, n. 6, p. 316-324, june 2016. Doi: <<https://doi.org/10.1089/fpd.2015.2099>>.

WANG, K. et al. Prevalence, antimicrobial resistance and genetic diversity of *Listeria monocytogenes* isolated from chilled pork in Nanjing, China. **LWT - Food Science and**

**Technology**, London, v. 64, p. 905-910, dec. 2015. Doi: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.015>>.

WANG, L. et al. Prevalence, antimicrobial resistance and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis profiles of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from different retail foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 249, p. 44-52, may. 2017. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.03.003>>.

WANG, R. et al. The prevalence of colistin resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from food animals in China: coexistence of mcr-1 and bla<sub>NDM</sub> with low fitness cost. **International Journal of Antimicrobial Agents**, London, v. S0924 - 8579, n. 18, 30034-7, may. 2018. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.01.023>>.

WEBB, H. E. et al. Carbapenem-resistant bacteria recovered from faeces of dairy cattle in the High Plains region of the USA. **PLoS One**, San Francisco, v. 11, n. 1, e0147363, jan. 2016. Doi: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147363>>.

WOODFORD, N.; TURTON, J. F.; LIVERMORE, D. M. Multiresistant gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 35, n. 5, p. 736-755, sept. 2011. Doi: <<https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x>>.

YANG, S. C. et al. Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 199, n. 6, p. 811-825, aug. 2017. Doi: <<https://doi.org/10.1007/s00203-017-1393-y>>.

YANG, X.; WANG, H. *Escherichia coli*: Pathogenic *E. coli* (Introduction). **Encyclopedia of Food Microbiology**, Oxford, v. 2, p. 695-701, aug. 2014. Doi: <<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00383-9>>.

YLMAZ, E. S.; GÜVENSEN, N. C. *In vitro* biofilm formation in ESBL producing *Escherichia coli* isolates from cage birds. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, [S.I.], v. 9, n. 11, p. 1069-1074, nov. 2016. Doi: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.10.003>>.

YOON, Y.; LEE, S.; CHOI, K. Microbial benefits and risks of raw milk cheese. **Food Control**, Guildford, v. 63, p. 201-215, may. 2016. Doi: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.11.013>>.

ZAFFARI, C. B., MELLO, J. F., COSTA, M. Qualidade bacteriológica de queijos artesanais comercializados em estradas do litoral norte do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**,

Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 862-867, jun. 2007. Doi: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782007000300040>>.

ZURFLUH, K. et al. First detection of *Klebsiella variicola* producing OXA-181 carbapenemase in fresh vegetable imported from Asia to Switzerland. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, London, v. 4, n. 38, p. 1-3, oct. 2015. Doi: <<https://doi.org/10.1186/s13756-015-0080-5>>.