



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA-UNIPAMPA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS EM  
BACTÉRIAS ISOLADAS DA CARNE BOVINA**

URUGUAIANA/RS

2019

TICIANE DA ROSA PINHEIRO

**AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS EM  
BACTÉRIAS ISOLADAS DA CARNE BOVINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Fundação Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Cheila D. O. Stopiglia

URUGUAIANA

2019

TICIANE DA ROSA PINHEIRO

**AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS EM  
BACTÉRIAS ISOLADAS DA CARNE BOVINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas da Fundação Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cheila Denise Ottonelli Stopiglia

Área de concentração: Farmácia

Dissertação defendida e aprovada em: 04 de abril de 2019.

Banca examinadora:



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cheila Denise Ottonelli Stopiglia  
Orientadora

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - UNIPAMPA



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vanessa Bley Ribeiro  
Universidade Federal do Pampa



---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane Casagrande Denardin  
Universidade Federal do Pampa

*“Toda vitória oculta uma abdicação”.*  
(Simone de Beauvoir)

## AGRADECIMENTO

Em primeiro lugar à minha mãe, por ser base e suporte de tudo, fiel incentivadora das minhas vontades e amiga. Mulher íntegra, trabalhadora e altruísta. Meu exemplo de vida.

À minha filha, que há 16 anos trouxe a definição de amor sincero e verdadeiro para minha vida, melhor amiga e companheira, dedicada, estudiosa, amorosa e dona de um coração gigante. Por ela e para ela, toda minha dedicação, esforço e vontade de ir além;

À minha orientadora Cheila, pela dedicação, boa vontade, pelas oportunidades que sempre me ofertou, pelas palavras de incentivo e apoio, pela paciência, por não me deixar desistir e principalmente por acreditar na minha capacidade de chegar até aqui. Obrigada por ter sido calma diante da minha ansiedade! Desejo que tua vontade de fazer ciência e transmitir conhecimento só aumente, e que, se possível, eu possa estar sob tuas orientações!

Às queridas professoras Cris e Vanessa pela disponibilidade de comporem a banca avaliadora que com certeza contribuirão valorosamente para o enriquecimento desse estudo;

À Tati, técnica do laboratório de microbiologia, pessoa que tive o prazer de conviver e aprender ao longo desses dois anos, responsável e dedicada. Minha companheira de mate e por muitas vezes conselheira;

À minha amigona e futura colega de profissão Mariana Freitas, por dividir parte dessa pesquisa comigo, além de dividir a bancada, insônia e conselhos é claro!

Aos colegas de laboratório que sempre me estenderam a mão quando precisei, aos que me acompanharam em dias de experimentos, aos que por muitas vezes, gentilmente, prepararam e/ou lavaram materiais, meu reconhecimento;

Ao meu padrasto Murilo pela colaboração;

Ao professor Elton Denardin e sua equipe de laboratório;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas;

À CAPES e UNIPAMPA pelo apoio financeiro.

**OBRIGADA!**

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
Fundação Universidade Federal do Pampa

### AValiação DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS EM BACTÉRIAS ISOLADAS DA CARNE BOVINA

Autora: Ticiane da Rosa Pinheiro

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cheila Denise Ottonelli Stopiglia

Local e Data da Defesa: Uruguaiiana, 04 de abril de 2019.

O Brasil lidera o ranking de exportação e é o segundo maior consumidor de carne bovina do mundo. O Rio Grande do Sul é responsável por, aproximadamente, 6,5% da produção nacional de carne bovina, sendo que a maior parte da produção da bovinocultura de corte gaúcha é destinada ao consumo do próprio estado, tendo em vista que o churrasco é considerado o prato típico do gaúcho. Os antimicrobianos são amplamente utilizados em animais produtores de alimentos para profilaxia, tratamento e, principalmente, como indutores de crescimento. O uso inadequado dos antimicrobianos na produção animal pode deixar resíduos nos tecidos animais. Uma fração significativa desses antimicrobianos aplicados na prática veterinária equivale aos medicamentos classificados pela Organização Mundial de Saúde como “criticamente importantes” na terapia humana para tratamento de infecções. Assim, o objetivo desse estudo foi determinar o perfil de resistência aos antibióticos, detectar a presença de beta-lactamases e resíduos de antimicrobianos e avaliar a viabilidade de bactérias sob ação da temperatura na carne bovina. No período entre junho de 2017 e agosto de 2018 foram adquiridas 45 amostras de carne bovina de diferentes supermercados e açougues do município de Uruguaiiana, Rio Grande do Sul, Brasil. Uma porção de 25g foi retirada assepticamente da parte interna de cada amostra e adicionada em 225 mL de água peptonada. Diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) foram inoculadas em placas de ágar sangue de carneiro e de ágar MacConkey, incubadas a 35°C por 24h. Colônias com diferentes características morfológicas foram selecionadas e submetidas à técnica de coloração de Gram e identificadas por provas bioquímicas. O teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizado pelo método de disco difusão. A confirmação da produção de beta-lactamases de amplo espectro (ESBL) foi realizada pelo método de sinergia de discos e a produção de carbapenemase pelo método de discos combinados. A análise de resíduos antimicrobianos foi executada por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas *em tandem*. Foram isolados um total de 161 enterobactérias, dentre elas 50 produtoras de ESBL e oito produtoras de carbapenemase, 15 cocos Gram-positivo e três bacilos Gram-positivo. De modo geral, um importante perfil de resistência foi detectado, principalmente para os antibióticos beta-lactâmicos. Três amostras de carne bovina foram avaliadas sob diferentes temperaturas e, um total de 34 micro-organismos foram isolados, sendo na carne crua (n=16), na carne mal passada (n=12) e na carne assada (n=06). Foi observado que mesmo sob ação da temperatura muitos micro-organismos permaneceram viáveis nas amostras de carne mal passada e assada. Ainda, os isolados apresentaram resistência a diferentes antibióticos testados. Não foram detectados resíduos de antimicrobianos nas amostras avaliadas. Foi possível observar a ocorrência de contaminação microbiana resistente nas amostras de carne bovina analisadas, inclusive nas amostras de carne prontas para o consumo, sugerindo que possa existir uma correlação entre a presença desses micro-organismos na carne bovina e a transferência de resistência aos seres humanos via alimentar.

**Palavras-chave:** resistência microbiana; ESBL; carbapenemase; carne bovina.

## ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree  
Program of Post-graduation in Pharmaceutical Sciences  
Federal University of Pampa

### EVALUATION OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE IN ISOLATED BACTERIAS OF BOVINE MEAT

Author: Ticiane da Rosa Pinheiro

Advisor: Dr. Cheila Denise Ottonelli Stopiglia

Date and place of defense: Uruguaiiana, April, 04, 2019.

Brazil leads the export ranking and is the second largest consumer of bovine meat in the world. Rio Grande do Sul is responsible for approximately 6.5% of the national production, and the majority of production of bovine meat from the state is destined for consumption by state itself, considering that the barbecue is considered the typical dish of the region. Antimicrobials are widely used in food-producing animals for prophylaxis, treatment and, mainly, as growth inducers. Inappropriate use of antimicrobials in animal production may leave residues in animal tissues. A significant fraction of these antimicrobials applied in veterinary practice is equivalent to the drugs classified by the World Health Organization as "critically important" in human therapy for the treatment of infections. Thus, the objective this study was determine the antibiotic resistance profile, detect presence of beta-lactamases and antimicrobial residues, and evaluate the viability bacteria under the action of temperature in bovine meat. In the period between June 2017 and August 2018, 45 bovine meat samples were purchased from different supermarkets and butchers in the city of Uruguaiiana, Rio Grande do Sul, Brazil. A 25 g portion was aseptically removed from the inside each sample and added in 225 mL of peptone water. Serial dilutions (10<sup>-1</sup> to 10<sup>-5</sup>) were inoculated on sheep blood agar and MacConkey agar plates incubated at 35 ° C for 24 h. Colonies with different morphological characteristics were selected and submitted to the Gram staining technique and identified by biochemical tests. Antimicrobial susceptibility testing was performed using the disk diffusion method. Confirmation of the production of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) was performed by the disk synergy method and the production of carbapenemase by the combined disk method. Antimicrobial residue analysis was performed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS / MS). A total of 161 enterobacteria, including 50 ESBL-producing and 8 carbapenemase producers, 15 Gram-positive cocci and 3 Gram-positive bacilli were isolated. Overall, important resistance profile was detected, especially for beta-lactam antibiotics. Three bovine meat samples were tested at different temperatures and a total of 34 microorganisms were isolated, with raw meat (n = 16), medium-rare (n = 12) and well done (n = 06). It was observed that even under the action of temperature many microorganisms remained viable in the samples of barely cooked and roasted meat. Moreover, the isolates showed resistance to different antibiotics tested. No antimicrobial residues were detected in the samples evaluated. It was possible to observe the occurrence of resistant microbial contamination in bovine meat samples analyzed, including ready-to-eat meat samples, suggesting that there may be a correlation between the presence of these microorganisms in bovine meat and the transfer of resistance to dietary intake.

**Keywords:** microbial resistance; ESBL; carbapenemase; bovine meat.

## SUMÁRIO

<b>PARTE I</b> .....	<b>11</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
2.1 Objetivo Geral .....	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>15</b>
3.1 Caracterização da carne .....	15
3.2 Comercialização da carne bovina .....	15
3.3 Fatores que influenciam a contaminação da carne .....	16
3.4 Micro-organismos indicadores de qualidade microbiológica na carne bovina .....	17
3.5 Influência da temperatura no desenvolvimento microbiano.....	18
3.6 Uso de antimicrobianos na pecuária.....	19
3.7 Resistência microbiana .....	20
3.8 Desenvolvimento da resistência microbiana associada aos alimentos .....	22
3.9 Beta-lactamases .....	23
3.9.1 Beta-lactamases de amplo espectro (ESBL).....	24
3.9.2 Metallo-beta-lactamases (MBL).....	25
3.9.3 <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemases (KPC) .....	26
<b>PARTE II</b> .....	<b>27</b>
<b>4. MANUSCRITO I</b> .....	<b>27</b>
Abstract.....	29
Introduction.....	31
Material and methods.....	32
Results and Discussion.....	34
References .....	37
<b>5. MANUSCRITO II</b> .....	<b>44</b>
Resumo .....	46

<b>Abstract.....</b>	<b>47</b>
<b>Introdução.....</b>	<b>49</b>
<b>Materiais e métodos .....</b>	<b>50</b>
<b>Resultados e discussão .....</b>	<b>51</b>
<b>Conclusão.....</b>	<b>54</b>
<b>Referências.....</b>	<b>54</b>
<b>6. MANUSCRITO III .....</b>	<b>58</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>60</b>
<b>Resumo .....</b>	<b>60</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>61</b>
<b>Material and methods.....</b>	<b>61</b>
<b>Results and Discussion.....</b>	<b>62</b>
<b>Conclusion.....</b>	<b>64</b>
<b>References .....</b>	<b>64</b>
<b>PARTE III.....</b>	<b>66</b>
<b>7. DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>66</b>
<b>8. CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>70</b>
<b>9. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>71</b>
<b>10. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>72</b>
<b>11. ANEXOS .....</b>	<b>80</b>

## APRESENTAÇÃO

A presente dissertação foi dividida em três partes principais: Na **Parte I** encontram-se a **INTRODUÇÃO**, a **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** e os **OBJETIVOS**. Na **Parte II**, item **MANUSCRITO**, encontram-se os resultados, metodologia aplicada, discussão e as referências, na forma de três manuscritos. Na **Parte III**, item **DISCUSSÃO GERAL** e **CONCLUSÃO GERAL**, estão apresentadas a discussão e conclusão de forma geral desta dissertação. No item **PERSPECTIVAS** encontram-se possíveis ações a serem realizadas para continuação aprofundada dessa pesquisa e por fim, item **REFERÊNCIAS**, refere-se às citações apresentadas no decorrer do referencial teórico desta dissertação.

## PARTE I

### 1. INTRODUÇÃO

A carne bovina é um alimento de alto valor nutricional devido a sua composição química basicamente de água e proteínas (PARDI *et al.*, 2001; SARCINELLI *et al.*, 2007). O Brasil lidera o ranking de exportação e é o segundo maior consumidor de carne bovina do mundo (BRASIL, 2017; IBGE, 2017). O Rio Grande do Sul é responsável por aproximadamente 6,5% da produção nacional de carne bovina, sendo que a maior parte da produção da bovinocultura de corte gaúcha é destinada ao consumo do próprio estado (IBGE, 2017; RIO GRANDE DO SUL, 2011).

Devido as suas características intrínsecas como, por exemplo, elevada atividade de água e pH aproximadamente neutro, a carne bovina torna-se um ambiente favorável à proliferação microbiana, porém, os fatores extrínsecos caracterizam a principal fonte de contaminação de carnes frescas (FONTOURA, 2006; JAY 2005). Durante o processo de abate, as diferentes etapas realizadas aumentam a probabilidade de contaminação, como por exemplo, na sangria e esfolagem, a faca utilizada, se não esterilizada, é capaz de carrear micro-organismos da superfície para porções musculares recém cortadas (PIGARRO; SANTOS, 2008). Uma das mais importantes rotas de contaminação dá-se no processo de evisceração através de perfurações no trato gastrointestinal, acarretando extravasamento do conteúdo fecal, podendo se depositar na carcaça diretamente ou contaminar outras carcaças por contato indireto (BRANDÃO, 2011). As mãos dos manipuladores, recipientes de acondicionamento não estéreis e desossa mecânica em equipamentos mal higienizados, também representam fontes de contaminação e multiplicação microbiana (COUTINHO, 2004; JAY, 2005).

Os diferentes micro-organismos que contaminam a carne estão amplamente distribuídos na natureza, ar, água, pele do animal, utensílios utilizados para o abate, mãos do manipulador e trato gastrointestinal de homens e animais (FORSYTHE, 2002). A pesquisa de micro-organismos indicadores é utilizada para avaliar a qualidade microbiológica da carne, analisando a ocorrência de contaminação fecal, presença de possíveis patógenos ou micro-organismos deteriorantes (FRANCO, 2010; JAY, 2005). A temperatura tem uma influência importante sobre o crescimento de micro-organismos, pois o desenvolvimento bacteriano depende de reações químicas que estão ligadas à temperatura. Os micro-organismos se desenvolvem em diversas faixas de temperatura que compreendem a temperatura mínima para

crescimento, ideal e máxima, variando entre espécies devido as suas características próprias. Esses micro-organismos são classificados em: psicrófilos (crescimento em baixas temperaturas), mesófilos (crescimento em temperatura ambiente) e termófilos (crescimento em temperaturas elevadas) (FORSYTHE, 2002; JAY, 2005). Carnes de pescados como o salmão, utilizado na produção de sushis e consumidos crus, já mostraram contaminações relevantes com presença de coliformes fecais e *Staphylococcus aureus* (SANTOS *et al.*, 2012). Estudos descreveram a presença de isolados de *S. aureus* resistentes a diversos antimicrobianos em espetinho de carne bovina e carne de frango, enfatizando a presença desse micro-organismo listado como um dos cinco agentes etiológicos mais frequentes em doenças transmitidas por alimentos em carnes bem passadas (assadas) (BRASIL, 2010; DIAS *et al.*, 2016). Ainda, *Listeria monocytogenes* foi isolada em amostras de peixes fritos e carnes submetidas a tratamento térmico, prontas para o consumo, na Suécia, após um grande surto de listeriose descrito no país (LAMBERTZ *et al.*, 2012).

Em 1940, quando as penicilinas marcaram o início do uso clínico dos antimicrobianos, foi levantada a hipótese de que as infecções seriam um problema passado. Porém, em 1946 foram isoladas bactérias insensíveis às penicilinas. Deu-se então, o início de uma corrida contra a resistência bacteriana (FERNANDES, 2000; ROSSI & ANDREAZZI, 2005). As bactérias podem apresentar diferentes tipos de resistência e, os principais mecanismos de resistência foram descritos e divididos conforme o modo em que inativam os antibióticos (LEVINSON, 2010). Algumas bactérias são capazes de produzir enzimas que inativam antibióticos através da hidrólise do anel beta-lactâmico, e são classificadas de acordo com o potencial/espectro de ação, sendo representadas principalmente pelas penicilinases, cefalosporinases, cefamicinases, beta-lactamases de amplo espectro (ESBL) e carbapenemases (GOERING, 2014). As beta-lactamases constituem o principal grupo de enzimas que tem a capacidade de degradar exclusivamente antibióticos beta-lactâmicos através da hidrólise do anel beta-lactâmico, resultando na inativação do antimicrobiano (ANDRADE; DARINI, 2014). As ESBL e as carbapenemases destacam-se como as beta-lactamases mais importantes devido ao seu extenso espectro de ação frente aos antimicrobianos mais utilizados na clínica (BUSH; JACOBY & MEDEIROS, 1995; BUSH & JACOB, 2010; GOERING, 2014).

Os antimicrobianos são amplamente utilizados em animais produtores de alimentos para profilaxia, tratamento e, principalmente, como indutores de crescimento. Uma fração significativa desses antimicrobianos aplicados na prática veterinária equivalem aos

medicamentos classificados pela OMS como “criticamente importantes” na terapia humana para tratamento de infecções comuns, cirurgias entre outros (LAXMINARAYAN *et al.*, 2013; WEGENER, 2003; WHO, 2017). Diversos estudos sugerem uma correlação entre o consumo de antimicrobianos por animais produtores de alimentos, mesmo que em baixas doses, e a disseminação de micro-organismos resistentes (CHANTZIARAS *et al.*, 2014; YOU, 2014). No Brasil, bactérias como *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria* spp., são comumente relatadas em estudos apresentando resistência importante aos antimicrobianos isoladas de carnes bovinas, suínas, de frango, entre outras (MONTEIRO *et al.*, 2018; MONTEZANI *et al.*, 2017; IGLESIAS, 2014). Em bovinos de corte, foi observada a ocorrência de *E.coli* e *Salmonella* spp. com resistência a antibióticos nos Estados Unidos (SCHMIDT *et al.*, 2015). No sudeste do Brasil, um estudo em bovinos, aves e suínos avaliou a presença de enterobactérias produtoras de ESBL, e os gêneros mais isolados nas amostras de carne bovina foram *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp., apresentando resistência a cefalosporinas de terceira geração (TAKAHASHI *et al.*, 2015).

Embora a resistência antimicrobiana seja onipresente, ainda é complexo associar o uso de antimicrobianos na produção de carne bovina com infecções humanas causadas por micro-organismos resistentes. Existe uma concordância em pesquisas científicas onde a transferência da resistência pode ocorrer entre bactérias de animais produtores de alimentos para humanos ou vice-versa, sendo a troca de material genético, através dos elementos genéticos móveis, a rota mais comum (LAZARUS *et al.*, 2015). Embora o Brasil seja o maior exportador de carne bovina e esse alimento tão valorizado na região sul do país, relatos sobre a ocorrência de bactérias resistentes nesse tipo de carne ainda é reduzido, portanto, justifica-se a necessidade da realização de mais estudos que possam correlacionar a ocorrência de micro-organismos resistentes, o mecanismo que confere tal resistência com a real exposição ao ser humano.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Determinar o perfil de resistência aos antibióticos, detectar a presença de beta-lactamases e resíduos de antimicrobianos e avaliar a viabilidade de bactérias sob ação da temperatura em carnes bovinas comercializadas em supermercados e açougues da cidade de Uruguaiana- RS.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Isolar bactérias da carne bovina comercializada em supermercados e açougues da cidade de Uruguaiana;
- Avaliar o perfil de resistência aos antimicrobianos das bactérias isoladas;
- Identificar os isolados resistentes;
- Realizar triagem de produção enzimática através de testes fenotípicos;
- Determinar a presença de resíduos antimicrobianos;
- Avaliar a viabilidade e suscetibilidade aos antibióticos de isolados provenientes da carne bovina após ser submetida a processo de cocção, sendo analisadas porções cruas, mal passada e assada.

### **3. REFERENCIAL TEÓRICO**

#### **3.1 Caracterização da carne**

De acordo com o Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), entendem-se como carne as massas musculares maturadas e demais tecidos que as acompanham, incluindo ou não a base óssea correspondente, procedentes de animais abatidos sob inspeção veterinária (BRASIL, 1997).

A carne bovina caracteriza-se pela natureza das proteínas que a compõem, não somente do ponto de vista quantitativo como qualitativo. Além de sua riqueza em aminoácidos essenciais, ela dispõe de um elevado teor de umidade, gordura, vitaminas do complexo B, glicídios e sais minerais, como zinco e ferro (PARDI *et al.*, 2001; SARCINELLI *et al.*, 2007). Contêm, em média, 75% de água, 19% de proteínas, 2,5% de gordura, 1,2% de carboidratos, 1,65% de nitrogênio residual e 0,65% de cinzas. Sua composição varia também em função da idade, sexo, raça, manejo e espécie (PRANDI *et al.*, 1994).

#### **3.2 Comercialização da carne bovina**

De acordo com os dados do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), o Brasil lidera o ranking mundial de exportações de carne bovina (1,9 milhões de toneladas) e estima-se que, até o ano de 2020, a produção brasileira de carnes supra até 44,5% do mercado mundial (BRASIL, 2017).

Dentre os resultados preliminares do último Censo Agropecuário do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) disponibilizado em 2017, foram produzidas cerca de 9,5 milhões de toneladas de carne bovina no país, sendo o Brasil, o segundo maior consumidor de carne bovina do mundo (38,6 Kg/habitantes) (IBGE, 2017; FAO, 2011). O Rio Grande do Sul (RS) é responsável por aproximadamente 6,5% da produção nacional de carne bovina com cerca de 11,4 milhões de cabeças de gado (IBGE, 2017). Os campos abertos e limpos que caracterizam a região do Pampa Gaúcho fazem do Oeste e do Sul do RS os responsáveis pela maior parte do rebanho do estado. Uruguaiana é o terceiro município do estado com maior rebanho de bovinos, sendo que, a maior parte da produção da bovinocultura

de corte gaúcha é destinada ao consumo do próprio estado (IBGE, 2017; RIO GRANDE DO SUL, 2011).

### **3.3 Fatores que influenciam a contaminação da carne**

Antes de serem sacrificados, os tecidos dos animais sadios podem ser considerados estéreis, pois estão protegidos da contaminação pela pele, que funciona como uma barreira bloqueando a entrada de micro-organismos. Sendo exceções de tal esterilidade, o trato gastrointestinal, a cavidade naso-faríngea e a porção final do trato urogenital (PRICE & SCHWEIGERT, 1994).

A multiplicação de micro-organismos em carnes pode estar associada a diversos fatores como, por exemplo, suas características intrínsecas de elevada atividade de água, composição química e pH aproximadamente neutro. Porém, são as características extrínsecas que caracterizam a principal fonte de contaminação de carnes frescas (FONTOURA, 2006; JAY 2005). Em fase antecedente ao abate, o animal já se encontra exposto em condições que são propícias à contaminação, como nas pastagens e durante pesagens em currais até o deslocamento do animal para o local do abate (PARDI *et al.*, 2001). No processo de abate, diferentes etapas são realizadas, aumentando assim, a possibilidade de contaminação por micro-organismos (BORGES *et al.*, 2002). Durante a sangria do animal, a faca utilizada, se não esterilizada, pode carrear micro-organismos ao longo da carcaça. No processo de esfolagem, caracterizada pela remoção da pele do animal, micro-organismos presentes na superfície externa da carcaça podem se depositar em porções musculares recém cortadas (PIGARRO; SANTOS, 2008). Uma das mais importantes rotas de contaminação dá-se no processo de evisceração através de perfurações no trato gastrointestinal, acarretando extravasamento do conteúdo fecal, podendo se depositar na carcaça diretamente ou contaminar outras carcaças por contato indireto (BRANDÃO, 2011). A água utilizada para banho de aspersão, as mãos dos manipuladores, recipientes de acondicionamento não estéreis e a desossa mecânica em equipamentos mal higienizados, também representam fontes de contaminação e multiplicação microbiana (COUTINHO, 2004; JAY, 2005).

### 3.4 Micro-organismos indicadores de qualidade microbiológica na carne bovina

Devido a sua composição química e às diferentes fontes de contaminação, uma grande diversidade de micro-organismos pode ser encontrada na carne bovina (ALCANTARA *et al.*, 2012). Os diferentes micro-organismos que contaminam a carne estão amplamente distribuídos na natureza, ar, água, pele do animal, utensílios utilizados para o abate, mãos do manipulador e trato gastrointestinal de homens e animais (FORSYTHE, 2002). A pesquisa de micro-organismos indicadores é utilizada para avaliar a qualidade microbiológica da carne, analisando a ocorrência de contaminação fecal, presença de possíveis patógenos ou micro-organismos deteriorantes (FRANCO, 2005; JAY, 2005).

Segundo Forsythe (2002), o termo micro-organismo indicador pode ser aplicado a qualquer grupo taxonômico, fisiológico ou ecológico de micro-organismos, cuja presença ou ausência proporciona uma evidência indireta referente a uma característica particular do histórico da amostra (FORSYTHE, 2002).

Os gêneros *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., *Enterobacter* spp. e *Moraxella* spp., são alguns exemplos de micro-organismos indicadores, capazes de se desenvolverem rapidamente, provocando alterações organolépticas, químicas e físicas indesejadas, resultantes de suas atividades metabólicas, causando deterioração do produto cárneo (FORSYTHE, 2002; JAY, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Os gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* e *Klebsiella* são bacilos gram-negativos pertencentes ao grupo coliformes fecais em alimentos, sendo o gênero *Escherichia* exclusivamente de origem fecal e os gêneros *Citrobacter*, *Enterobacter* e *Klebsiella* de origem não fecal (JAY, 2005). A ocorrência dessas bactérias é interpretada como indicação de contaminação fecal, mostrando condições sanitárias e/ou higiênicas insatisfatórias (FRANCO & LANDGRAF, 2002).

Com relação aos micro-organismos patogênicos de origem alimentar, os mais importantes associados à carne são: *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Shigella*, *Staphylococcus aureus* e *Yersinia enterocolitica* (PARDI *et al.*, 2001). Alimentos contaminados por esses micro-organismos podem causar diversas doenças como toxinfecções, distúrbios intestinais, gastroenterites, entre outras (FORSYTHE, 2002).

### 3.5 Influência da temperatura no desenvolvimento microbiano

A temperatura tem uma influência importante sob o crescimento de micro-organismos, pois o desenvolvimento bacteriano depende de reações químicas que estão ligadas à temperatura. Os micro-organismos se desenvolvem em diversas faixas de temperatura que compreendem a temperatura mínima para crescimento, ideal e máxima, variando entre espécies devido as suas características próprias. Esses micro-organismos são classificados em: psicrófilos (crescimento em baixas temperaturas), mesófilos (crescimento em temperatura ambiente) e termófilos (crescimento em temperaturas elevadas) (FORSYTHE, 2002; JAY, 2005).

Diante da habilidade dos micro-organismos sobreviverem em diferentes temperaturas, é difícil prever as melhores condições de armazenamento dos alimentos, pois espécies como a *Escherichia coli*, tem sua temperatura ótima de crescimento entre 35 e 40°C, porém, essa bactéria consegue se desenvolver em uma faixa de temperatura que vai de 7 a 46°C, e algumas cepas patogênicas se mantêm viáveis em temperaturas de refrigeração (FORSYTHE, 2002; VARMAN & EVANS, 1996). A espécie *Listeria monocytogenes* é uma bactéria que possui temperatura ótima de crescimento que varia entre 20 e 25°C. No entanto, esse micro-organismo tem habilidade de se manter viável até mesmo em ambientes de congelamento (BARANCELLI *et al.*, 2011).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), os agentes etiológicos mais comuns em Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) são de origem bacteriana, como *Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (BRASIL, 2010). Além disso, tempo elevado de exposição em temperatura ambiente, descongelamento ou congelamento inadequado, cozimento insuficiente, tipo de embalagem, entre outros, são fatores que influenciam a multiplicação desses agentes microbianos (SIRTOLI & CAMARELLA, 2018).

Carnes de pescados como o salmão, utilizado na produção de sushis e consumidos crus, já mostraram contaminações relevantes com presença de coliformes fecais e *Staphylococcus aureus* (SANTOS *et al.*, 2012). Estudos descreveram a presença de isolados de *S. aureus* resistentes a diversos antimicrobianos em espetinho de carne bovina e carne de frango, enfatizando a presença desse micro-organismo listado como um dos cinco agentes etiológicos mais frequentes em DTAs em carnes bem passadas (assadas) (DIAS *et al.*, 2016). Ainda, *Listeria monocytogenes* foi isolada em amostras de peixes fritos e carnes

submetidas a tratamento térmico, prontas para o consumo, na Suécia, após um grande surto de listeriose descrito no país (LAMBERTZ *et al.*, 2012).

A fim de prolongar a vida útil e otimizar a segurança dos produtos cárneos, a refrigeração em torno de 4°C e o congelamento de -18°C são os métodos mais utilizados pelos estabelecimentos comerciais para retardar ou inibir o crescimento microbiano (JAY, 2005; AL-JASSER, 2012). Entretanto, mesmo que seja respeitada a temperatura de refrigeração, a vida de prateleira do produto cárneo é restrita ao tempo máximo de duas semanas, desde que considerados os fatores como pH, exposição a gases e embalagem ideais (ODÓÑEZ-PEREDA, 2005).

### **3.6 Uso de antimicrobianos na pecuária**

Os antimicrobianos são amplamente utilizados em animais produtores de alimentos para profilaxia, tratamento e, principalmente, como indutores de crescimento. Uma fração significativa desses antimicrobianos aplicados na prática veterinária equivalem aos medicamentos classificados pela OMS como “criticamente importantes” na terapia humana para tratamento de infecções comuns, cirurgias entre outros (WHO, 2017; LAXMINARAYAN *et al.*, 2013; WEGENER, 2003). O uso exacerbado desses antimicrobianos nos animais contribui para o surgimento da resistência em micro-organismos que podem ser transmitidos ao homem pelo ambiente (solo, ar, água) e produtos alimentares (PRICE *et al.*, 2005). Diversos estudos sugerem uma correlação entre o consumo de antimicrobianos por animais produtores de alimentos, mesmo que em baixas doses, e a disseminação de micro-organismos resistentes (CHANTZIARAS *et al.*, 2014; YOU, 2014).

Mais de 70% dos antimicrobianos produzidos mundialmente são destinados ao uso veterinário (THIELE-BRUHN, 2003; DÍAZ-CRUZ & BARCELÓ, 2007). As concentrações dos antimicrobianos usadas na produção animal encontram-se, geralmente, entre 5 a 20 mg/Kg e, nessas concentrações, podem deixar resíduos nos tecidos animais (CODEX, 2012; DÍAZ-CRUZ & BARCELÓ, 2007). Muitas substâncias, embora sejam utilizadas, não são permitidas para uso na melhora do crescimento e desempenho animal, enquanto outras são completamente proibidas, mesmo para tratamento clínico (BOELTER 1998).

O programa *Codex Alimentarius* desenvolvido de forma conjunta entre a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e OMS, estabelece através de

padrões reconhecidos internacionalmente o nível máximo permitido da concentração ou ausência de determinadas substâncias que podem estar presentes em alimentos para consumo (CODEX, 2012). Da mesma forma, a legislação brasileira proíbe a “fabricação, a importação, a comercialização e o emprego de preparações farmacêuticas de uso veterinário, de rações e de aditivos alimentares contendo cloranfenicol, flurazolidona e nitrofurazona, em animais cujos produtos sejam destinados à alimentação humana” (BRASIL, 1998).

Em 2017, o *Food and Drug Administration* (FDA) publicou o relatório anual apresentando a lista dos antimicrobianos vendidos e/ou distribuídos para uso em animais produtores de alimentos, as classes mais utilizadas foram: tetraciclina, penicilinas, macrolídeos, sulfonamidas, lincosamidas, cefalosporinas e fluoroquinolonas, igualmente importantes para terapia humana (FDA, 2017).

Devido à influência do uso de antibióticos em animais na saúde humana, órgãos regulamentadores como FDA elaboram anualmente documentos e disponibilizam relatórios sobre a venda e distribuição de antibióticos, encorajando produtores a proibirem e/ou diminuírem o uso desses medicamentos para fins de crescimento animal (FDA, 2016; PRICE *et al.*, 2012).

China, Estados Unidos e Brasil estão entre os cinco países com maiores participações no consumo global de antimicrobianos na produção de alimentos desde 2010, porém não apresentam grande aumento percentual nas projeções realizadas até 2030, o que pode significar positivas mudanças no sistema de produção pecuária, assim como em países europeus em que o uso profilático desses medicamentos já é proibido para animais produtores de alimentos (VAN BOECKEL *et al.*, 2015).

### **3.7 Resistência microbiana**

Em 1940, quando as penicilinas marcaram o início do uso clínico dos antimicrobianos, foi levantada a hipótese de que as infecções seriam um problema passado. Porém, em 1946 foram isoladas bactérias insensíveis às penicilinas. Deu-se então, o início de uma corrida contra a resistência bacteriana (FERNANDES, 2000; ROSSI, ANDREAZZI, 2005).

As bactérias podem apresentar dois tipos de resistência: a intrínseca e a adquirida. A resistência intrínseca, ou seja, um mecanismo de resistência natural de genes cromossômicos característicos de algum gênero ou espécie, como por exemplo, bacilos gram-negativos, que

não possuem receptores para antimicrobianos em seus ribossomos, portanto, não é necessário um estímulo para que o micro-organismo expresse a resistência. Já a resistência adquirida é originada a partir de mutações ou aquisição de genes plasmidiais de resistência de outras bactérias (TORTORA, 2012).

Dessa forma, os principais mecanismos de resistência foram descritos e divididos conforme o modo em que inativam os antibióticos (LEVINSON, 2010). Algumas bactérias são capazes de produzir enzimas que inativam antibióticos através da hidrólise do anel beta-lactâmico, e são classificadas de acordo com o potencial/espectro de ação, sendo representadas principalmente pelas penicilinases, cefalosporinases, cefamicinases, beta-lactamases de amplo espectro (ESBL) e carbapenemases (GOERING, 2014). Outro mecanismo de resistência compreende as alterações na permeabilidade da membrana externa, impedindo a penetração na célula, ou ainda, mecanismos de ação que alteram a permeabilidade da membrana interna, como no caso dos aminoglicosídeos e *Pseudomonas* spp. (TORTORA *et al.*, 2012).

Bactérias gram-negativas por possuírem membrana externa em sua parede celular, são intrinsecamente menos permeáveis a vários antimicrobianos. Assim, a alteração na permeabilidade da membrana externa se torna um mecanismo de resistência exclusivo das bactérias gram-negativas, que tem a capacidade de diminuir a permeabilidade na estrutura das porinas ou, até mesmo, reduzir a quantidade de porinas, resultando na impermeabilidade dos antimicrobianos (LEVINSON, 2010). O sistema de efluxo de antibiótico é outro mecanismo de resistência, no qual o micro-organismo realiza o efluxo ativo de proteínas transmembranares que eliminam o antibiótico, impedindo que alcancem concentração efetiva. É o mecanismo de enterobactérias relacionados às tetraciclinas. Muitos antibióticos se ligam a um ou mais alvos específicos na célula bacteriana. Assim, mais um mecanismo de resistência é descrito, através das alterações na estrutura do alvo do antibiótico que impedem a ligação ou reduzem a afinidade da interação, fazendo com que os antimicrobianos não reconheçam o alvo (AGUIAR, 2008; TORTORA *et al.*, 2012).

### 3.8 Desenvolvimento da resistência microbiana associada aos alimentos

Em 1950, poucos anos após o início da utilização de antibióticos no combate a infecções bacterianas em seres humanos, os agentes antimicrobianos foram introduzidos na alimentação animal com principal objetivo de promover o crescimento (WITTE *et al.*, 2000). Contudo, a produção agropecuária também utiliza os agentes antimicrobianos com finalidade profilática e no tratamento de infecções (PRATA; FUKUDA, 2001).

Atualmente, a resistência microbiana é considerada um problema ecológico com significativa complexidade, englobando diferentes micro-organismos que influenciam no ambiente, nos seres humanos e nos animais (WHO, 2015, SO *et al.*, 2015; ZINSSTAG *et al.*, 2012).

O uso excessivo e indiscriminado de agentes antimicrobianos em animais produtores de alimentos resulta na pressão seletiva de micro-organismos resistentes que podem ser transmitidos para os seres humanos de diferentes formas: as bactérias resistentes presentes no produto de origem animal podem ser transferidas ao homem pelo consumo do alimento contaminado; a resistência antimicrobiana pode desenvolver-se nos micro-organismos presentes no animal, podendo não ser patogênica ao ser humano, porém, transferir a resistência às bactérias humanas e; através de resíduos de antimicrobianos no alimento que acabam oportunizando o desenvolvimento da resistência em bactérias humanas (ANGULO *et al.*, 2004; COLLIGNON *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, pesquisas sugerem que alimentos de origem animal possam ser fonte de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos (KIRBIS & KRIZMAN, 2015). No Brasil, bactérias como *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria* spp., são comumente relatadas em estudos apresentando resistência importante aos antimicrobianos isoladas de carnes bovinas, suínas, de frango, entre outras (MONTEIRO *et al.*, 2018; MONTEZANI *et al.*, 2017; IGLESIAS, 2014). Em 2011 foram isoladas e identificadas *E. coli* produtoras de ESBL em carcaças de frango congeladas produzidas no Rio de Janeiro para distribuição nacional e para exportação (BOTELHO *et al.*, 2015). Em bovinos de corte, foi observada a ocorrência de *E.coli* e *Salmonella* spp. resistentes a antibióticos nos Estados Unidos (SCHMIDT *et al.*, 2015).

No sudeste do Brasil, um estudo em bovinos, aves e suínos avaliou a presença de enterobactérias produtoras de ESBL, e os gêneros mais isolados nas amostras de carne bovina foram *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. apresentando resistência a

cefalosporinas de terceira geração (TAKAHASHI et al., 2015). Isolados de *E. coli* resistentes também foram descritos em amostras de carne bovina no Mato Grosso (CASTRO et al., 2019). Bactérias resistentes a beta-lactâmicos também foram isoladas da superfície de carcaças bovinas em Taiwan (CHEN et al., 2017).

A disseminação de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos e produtoras de enzimas inativadoras de antibióticos provenientes de alimentos está descrita pelo mundo (VAN BOECKEL, 2015). No Paquistão, entre 2015 e 2016, foi publicado o primeiro relato de cepas de *E. coli* isoladas de carnes de frango cruas produtoras de ESBL *Multidrug resistant* (MDR) (AHMAD et al., 2018). Ainda, entre 2015 e 2016, na Turquia, aproximadamente 70% das enterobactérias isoladas de amostras de queijo processado e leite cru, eram produtoras de ESBL. *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Escherichia* e *Shigella* spp. estavam entre os gêneros mais isolados (TEPELI & ZORBA, 2018).

Os agentes antimicrobianos mais utilizados em animais são igualmente de uso comum em seres humanos (tetraciclina, fluoroquinolonas, macrolídeos, cefalosporinas). Poucas classes são exclusivamente de uso humano (carbapenêmicos) e algumas são apenas de uso veterinário (ionofóros), devido alta toxicidade (COLLIGNON & MCEWEN, 2019).

Embora a resistência antimicrobiana seja onipresente, ainda é complexo associar o uso de antimicrobianos na produção de carne bovina com infecções humanas causadas por microorganismos resistentes. Existe uma concordância em pesquisas científicas onde a transferência da resistência pode ocorrer entre bactérias de animais produtores de alimentos para humanos ou vice-versa, sendo a troca de material genético através dos elementos genéticos móveis, a rota mais comum (LAZARUS et al., 2015).

### **3.9 Beta-lactamases**

As beta-lactamases constituem o principal grupo de enzimas que tem a capacidade de degradar exclusivamente antibióticos beta-lactâmicos através da hidrólise do anel beta-lactâmico, resultando na inativação do antimicrobiano (ANDRADE; DARINI, 2014). Historicamente, a primeira beta-lactamase foi identificada nos anos 40, quando o uso da penicilina se generalizava mundialmente (ABRAHAM & CHAIN, 1940). Logo em 1965, foi descrita a primeira beta-lactamase mediada por plasmídeos na Grécia, acarretando na disseminação facilitada dessa enzima (MATTHEW et al., 1979).

As principais classificações desenvolvidas para esse grupo de enzimas estão baseadas nas propostas de Ambler e de Bush, Jacob & Medeiros (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY & MEDEIROS, 1995). A classificação de Ambler dividiu as enzimas de acordo com a estrutura molecular, sendo as classes A, C e D classificadas como serina beta-lactamases, por possuírem um aminoácido serina no sítio ativo da enzima e classe B classificada como metalo beta-lactamases (MBL) que necessitam do cofator zinco para hidrolisar o anel beta-lactâmico (AMBLER, 1980). Já Bush, Jacoby & Medeiros classificaram as enzimas de acordo com o seu substrato e a capacidade de inibição pelos inibidores de beta-lactamases. As classificações foram revisadas por Bush e Jacoby em 2010 e atualizadas, porém a classificação de Ambler é a mais utilizada. As beta-lactamases de amplo espectro (ESBL) e as carbapenemases destacam-se como as beta-lactamases mais importantes devido ao seu extenso espectro de ação frente aos antimicrobianos mais utilizados na clínica (BUSH; JACOBY & MEDEIROS, 1995; BUSH & JACOB, 2010; GOERING, 2014).

### **3.9.1 Beta-lactamases de amplo espectro (ESBL)**

Na década de 80, ocorreu um aumento de infecções graves causadas, em sua maioria, por bacilos gram-negativos produtores de enzimas beta-lactamases de espectro restrito, chamadas cefalosporinas (enzimas que inativam penicilinas e cefalosporinas de 1ª e 2ª geração). Sem muitas opções de tratamento, as cefalosporinas de 3ª geração foram atribuídas como terapia alternativa (PETERSON & BONOMO, 2005).

As ESBL são enzimas plasmidiais com capacidade de hidrolisar os antibióticos beta-lactâmicos, exceto carbapenêmicos e cefamicinas e são inibidas pelos inibidores de beta-lactamases, como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. Em 1983, em decorrência do uso indiscriminado das cefalosporinas de 3ª geração, foram relatadas as primeiras bactérias produtoras de ESBL em cepas de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* (ROSSI; ANDREAZZI, 2005). As enzimas ESBL mais comumente descritas pertencem à família TEM, SHV e CTX-M detectadas principalmente em espécies de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, mas podem estar presentes em diferentes gêneros da família *Enterobacteriaceae* (CHONG *et al.*, 2011).

Assim, a disseminação desses genes começou a ser relatada pelo mundo, através de dados como do programa sentinela de vigilância antimicrobiana (SENTRY), que entre 2008 e

2010 realizou levantamento da resistência antimicrobiana em bacilos gram-negativos na América Latina, declarando que *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* eram as espécies mais prevalentes com fenótipo positivo para ESBL (GALES *et al.*, 2012). Em levantamento atual sobre a ocorrência de enterobactérias produtoras de ESBL nos últimos 20 anos realizado pela SENTRY em 42 países distribuídos entre Europa (40%), América do Norte (34%), Ásia (13%) e América Latina (13%), ocorreu um aumento de 10 para 24% de isolados produtores de ESBL, sendo que dos cerca de 179.000 micro-organismos analisados entre 1997-2016, 22% dos isolados produtores de ESBL eram da América Latina (CASTANHEIRA *et al.*, 2018).

### 3.9.2 Metallo-beta-lactamases (MBL)

As metallo-beta-lactamases são enzimas que se caracterizam pela habilidade de hidrolisarem antimicrobianos beta-lactâmicos, exceto o monobactâmico (aztreonam). Essas enzimas não são inibidas por inibidores de beta-lactamases (ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam) e são dependentes de íons de zinco ou cátions divalentes como cofator de metal para realizarem sua ação catalítica, sendo inibidas *in vitro* pelos agentes quelantes de íons metálicos como o ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) (LOGAN & WEINSTEIN, 2017; QUEENAN & BUSH, 2007). Alguns micro-organismos produzem naturalmente essas enzimas, conferindo-lhes resistência intrínseca, como *Bacillus cereus* e *Aeromonas spp.* (MENDES *et al.*, 2006).

Em 1994, o primeiro relato de MBL apresentando resistência ao imipenem e aos beta-lactâmicos de amplo espectro foi descrito em um isolado de *Serratia marcescens*, espécie que não produz naturalmente essa enzima (OSANO *et al.*, 1994). No Brasil, em 2003, cepas de *Acinetobacter baumannii* foram relatadas como produtoras de MBL (GALES *et al.*, 2012).

Imipenemase (IMP) e Verona imipenemase (VIM), são as principais famílias de MBL adquiridas disseminadas pelo mundo. Quase exclusiva do território brasileiro, a São Paulo metallo beta-lactamase (SPM) foi disseminada pelo país, sendo descrita a primeira vez na espécie *Pseudomonas aeruginosa*. Isoladas em diferentes centros de saúde brasileiro, cerca de 40% dos isolados de *P. aeruginosa* apresentaram produção da enzima (ANDRADE; DARINI 2014; CORNAGLIA *et al.*, 2011; MENDES *et al.*, 2006; TOLEMAN *et al.*, 2002),

### 3.9.3 *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemases (KPC)

O termo *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase foi atribuído devido à primeira incidência dessa enzima, em 1996, na Carolina do Norte, detectada em um isolado da espécie *K. pneumoniae* que apresentou resistência significativa ao imipenem e ao meropenem (YIGIT *et al.*, 2001). Embora o nome esteja associado à espécie *K. pneumoniae*, essa denominação é utilizada para representar a presença da enzima em diferentes gêneros e espécies bacterianas (ANDRADE; DARINI, 2014). Estudos fenotípicos e moleculares concluíram que a resistência correspondia a uma nova beta-lactamase, não inibida por EDTA e, portanto, não MBL; porém, a atividade foi atribuída pela presença do aminoácido serina, inibida fracamente por ácido clavulânico (YIGIT *et al.*, 2001).

No Brasil, a produção de KPC é o mecanismo de resistência mais descrito nas espécies de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos antimicrobianos carbapenêmicos (SAMPAIO; GALES, 2016). Levantamentos recentes relatam a disseminação dessa enzima em patógenos gram-negativos em mais de 20 países espalhados em quatro continentes, com surtos importantes na China, Suíça, Portugal e Polônia (BARANIAK *et al.*, 2017; BRADFORD, 2018; KAZMIERCZAK, 2016; LIANG *et al.*, 2017; RUPPE *et al.*, 2017; VUBIL *et al.*, 2017).

Codificadas por genes plasmidiais móveis em quase toda sua totalidade, essas enzimas conferem o maior espectro de inativação antimicrobiana, conferindo resistência a todos beta-lactâmicos, ou seja, todas penicilinas, cefalosporinas, monobactâmico e carbapenêmicos, restringindo as opções terapêuticas em infecções graves causadas por bactérias gram-negativas e, tornando-se um desafio para a saúde pública de diversos países (LOGAN & WEINSTEIN, 2017).

## PARTE II

### 4. MANUSCRITO I

#### **Extended-spectrum $\beta$ -lactamase, Metallo $\beta$ -lactamase and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in bovine meat of South Brazil**

Ticiane da Rosa Pinheiro, Cheila Denise Ottonelli Stopiglia

Manuscrito em fase de submissão para Journal of Food Protection



**Research paper**

**Runnig title:** ESBL-, MBL- and KPC-producing *Enterobacteriaceae* in bovine meat

**Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, Metallo  $\beta$  –lactamase and *Klebsiella pneumoniae*  
carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in bovine meat of South Brazil**

**Ticiane da Rosa Pinheiro<sup>1</sup>, Cheila Denise Ottonelli Stopiglia<sup>1\*</sup>**

Microbiology Laboratory, Federal University of Pampa, Uruguaiana, Brazil.

<sup>1</sup>Posgraduate Program of Pharmaceutical Sciences

**Keywords:** *Enterobacteriaceae*, ESBL, MBL, KPC, bovine meat

---

<sup>1</sup> \*Author for correspondence: Tel: (55) 55 – 3911-0200, E-mail:  
[cheilastopiglia@unipampa.edu.br](mailto:cheilastopiglia@unipampa.edu.br)

## ABSTRACT

Resistance in *Enterobacteriaceae* is mainly mediated the enzyme production Extended-spectrum Beta-Lactamases (ESBLs) and carbapenemases. Considering high consumption of bovine meat and few studies that evaluate the real exposure of meat as potential source the resistance spread, we salient the importance this research. This study phenotypically detected ESBL-, and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* to bovine meat from south Brazil. Were acquired 45 bovine meat samples, soon a portion 25 g added in 225 mL of peptone water and shaken for 18 h ate 15°C. Serial dilutions ( $10^{-1}$   $10^{-5}$ ) were spread on MacConkey agar plates, incubated at 35°C for 24 h. The isolates were identified through morphological screening and biochemical tests. Antibiotic susceptibility testing using disk diffusion method. Phenotypic ESBL confirmation was performed with double-disk synergy test and phenotypic carbapenemase confirmation was performed with combined disks test. A total of 161 *Enterobacteriaceae* were isolates. High resistance rates for beta-lactams were observed, 123(86%), 86(53.5%), 29(18%), 25(15.5%) and 21(13%) *Enterobacteriaceae* isolates were resistant against cefazolin, ampicillin, cefoxitin, ceftriaxone and ceftazidime, respectively. ESBL-production *Enterobacteriaceae* was detected in 50 of 58 isolates classified in the screening; three isolates were MBL producers and five isolates were KPC producers. Reported that *Enterobacteriaceae* isolates from bovine meat showed high prevalence of antimicrobial resistance for beta-lactam. The phenotypic tests confirmed different ESBL- and carbapenemases-producing *Enterobacteriaceae*. Considering high consumption of bovine meat and shortage research evaluating the exposure of meat as potential source the resistance spread, we salient the importance of this study. However, more research and genotypic studies are needed to evaluate the mechanism of transmission of resistance genes of ESBL- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in bovine meat.

## HIGHLIGHTS

- ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in bovine meat;
- MBL- and KPC-producing *Enterobacteriaceae* in bovine meat;
- High resistance rates for beta-lactams in bovine meat of South Brazil.

Antimicrobial resistance (AMR) is a global public health problem occurring in multiple sectors (animal, agriculture and human) (30, 48). Microorganisms suffer selective pressure as a consequence of the use of antimicrobials, and as a defense mechanism, end up expressing resistance genes that are shared with different bacteria facilitating the spread of AMR (26, 47).

Antibiotics are widely used in food-producing animals for treatment, prophylaxis and as growth promoters (19). However, many of these agents are also used in human therapy to treatment of infectious diseases including penicillins, cephalosporins, macrolides, lincosamides, tetracyclines, aminoglycosides and fluoroquinolones (8). China, the United States and Brazil are among the countries with the highest production and export of bovine meat, and consequently, make the most use of antibiotics in animal production (43).

*Enterobacteriaceae* constitute a large family of bacteria widely found in nature and, the most, are inhabitants of the intestinal microbiota of humans and animals. Some species are important pathogens that cause foodborne and hospital infections (28). The prevalence of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* (MDR) has increased significantly in recent years (17). Resistance is mainly mediated the enzyme production like Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs), and carbapenemases that promote antibiotic inactivation by making bacteria resistant to most antibiotics used in human therapy (22, 33, 34).

Researches have reported the development of beta-lactamases-producing *Enterobacteriaceae* in foods of animal origin such as meats (bovine, pork and poultry), cheeses, milks and vegetables (2, 25, 27, 32, 41). The microorganisms resistant to multiple drugs transmitted through the consumption of food of animal origin for humans are a concern, resulting in decrease the efficacy of antibiotics (14, 29, 36, 44).

Taking into account Brazil is one of the largest exporters of bovine meat in the world and the consumption of this food is highly valued in the country, more studies are needed to evaluate the real exposure of bovine meat as a potential source of resistance propagation. Therefore, aim of this study was to phenotypically detect ESBL, and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* to bovine meat from South Brazil.

## MATERIALS AND METHODS

**Collection, preparation and identification of samples.** Bovine meat samples were acquired in supermarkets and butchers at Uruguaiana city, South Brazil, between June 2017 and August 2018, adding 45 samples. Posteriorly, 25 g of samples were added in 225 mL of peptone water and shaken for 18 h at 15°C. Serial dilutions ( $10^{-1}$   $10^{-5}$ ) were spread on MacConkey agar (Oxoid, Basingstoke, UK) plates, incubated at 35°C overnight. The isolates were identified through morphological screening (Gram staining) and biochemical tests, like, triple sugar iron, lysine iron agar, citrate, indol, motility, sulfur production, urease, catalase, oxidase, citrate, indole and motility (28).

**Antibiotic susceptibility testing.** Using the Kirby–Bauer disk diffusion method, antibiotic susceptibility testing was performed. The results were interpreted according to CLSI guidelines 2017 (Clinical and Laboratory Standards Institute) (12). Twelve antimicrobial agents were used including ampicillin (AMP 10 µg), aztreonam (ATM 30 µg), cefazolin (CFZ 30 µg), cefepime (CPM 30 µg), cefoxitin (CFO 30 µg), ceftazidime (CAZ 30 µg), ceftriaxone (CRO 30 µg), ciprofloxacin (CIP 5 µg), gentamycin (GEN 10 µg), meropenem (MER 10 µg), trimethoprim-sulfamethoxazole (SUT 23,75+1,25) and tetracycline (TET 30 µg).

**Extended-spectrum β-lactamase (ESBL) screening and detection.** Isolates classified as “intermediate” and/or “resistant” for ceftazidime and/or ceftriaxone by disk

diffusion were considered to be suggestive ESBL producers. The phenotypic ESBL confirmation was performed with double-disk synergy test (DDST) (7) by placing an amoxicillin–clavulanic acid (AMC; 20/10 µg) disk in the center between aztreonam (ATM; 30 µg), ceftriaxone (CRO; 30 µg), ceftazidime (CAZ; 30 µg) and cefotaxime (CTX; 30 µg), using a 0.5 Mc Farland suspension of the isolates on Mueller Hinton agar (Oxoid, Basingstoke, UK) plates (6,7). It was considered a positive test for ESBL production when observed increase of zone inhibition from any cephalosporin toward the AMC disk. **Carbapenemase screening and detection.** Isolates presenting zone diameter <25mm for meropenem disk (10 µg) were considered to be suggestive carbapenemase producers. The phenotypic carbapenemase confirmation was performed with combined disks test (CDT) by placing meropenem (MER 10 µg), meropenem + phenylboronic acid (PBA 10 µL), and meropenem + ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA 10 µL), using a 0.5 Mc Farland suspension of the isolates on Mueller Hinton agar (Oxoid, Basingstoke, UK) plates (6,7). The isolates presenting zone diameter >5mm around MER + PBA than zone diameter around MER without inhibitor, was considered class A carbapenemase producer (KPC). The isolates presenting zone diameter >5mm around MER + EDTA than zone diameter around MER without inhibitor was considered class B carbapenemase producer (MBL).

## RESULTS AND DISCUSSION

High resistance rates for beta-lactams were observed, 123(86%), 86(53.5%), 29(18%), 25(15.5%) and 21(13%) *Enterobacteriaceae* isolates were resistant of cefazolin, ampicillin, cefoxitin, ceftriaxone and ceftazidime, respectively (Table 1).

The occurrence of *E.coli* and *Salmonella* spp. was observed in beef cattle production and processing continuum in United States, and corroborating our study the isolates showed resistance to beta-lactams tested (35). Similar resistant data were report in evaluate realized in

chicken carcasses from Brazil, most of *E. coli* isolates were resistant for beta-lactam, including ampicillin, cefuroxime and cefotaxime (3). Differently, study evaluating antimicrobial resistance in bovine meat in Midwest Brazil, five *E. coli* isolates was sensitive to the tested antibiotics, except two isolates, which presented intermediate resistance to streptomycin (9). Still in Brazil, among the 26 ground beef samples, two were positive for *Salmonella*, similar our study where the presence of this microorganism is in disagreement with the Brazilian legislation. However non beta-lactamase was detected (13).

Genotypic tests are the gold standard for detection of enzymatic production. However phenotypic tests are commonly used in laboratory routines, for economic and offer good sensitivity (7, 16, 40). The most used phenotypic tests in clinical practice are: double-disk synergy (DDST) and combined disk testing (CDT) using specific enzyme inhibitors (24, 31, 37). ESBL-production *Enterobacteriaceae* was detected in 50 of 58 isolates classified in the screening (Table 2). In the carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* screening, eight isolates were detected, three MBL producers and five KPC producers (Table 3). The frequency of ESBL- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* was 31% and 5%, respectively.

This result is consistent with other studies that reported the frequency of these enzymes production on a wide diversity of *Enterobacteriaceae* in food isolates. Worldwide the presence of ESBL-, MBL- and KPC-producing *Enterobacteriaceae* in food was reported (10, 21, 25, 38, 39).

Among the *Enterobacteriaceae* isolated in this study, the genera *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp. and *Enterobacter* spp. are part of the coliform group, indicative microbiological quality bacteria in foods, being *E. coli* species of exclusively fecal origin (20). According to the World Health Organization (WHO), *E. coli* and *Salmonella* spp. are the most described etiological agents in foodborne diseases of bacterial origin (5). In

addition, according to technical regulation of the Brazilian health surveillance agency, the absence of *Salmonella* in 25 g or more of fresh or ready-to-eat beef is required (4). The *Salmonella* and *E. coli* isolates in this study were confirmed ESBL-producers and one *Salmonella* isolate was confirmed KPC-producing presenting a significant resistance profile to beta-lactam antibiotics.

Between 2015 and 2016, of the 32 samples of chicken meat evaluated in the northern of Spain, 17 were ESBL-producers and the most isolated species were *E. coli*, *Klebsiella* and *Serratia*. Were observed high resistance against beta-lactams antibiotics and tetracyclines, this coincided with data reported in our study (15, 46). In the same period, strains of ESBL- and carbapenemase-producing *E. coli* were isolates from chicken meat, with resistance prevalence for ampicillin and first- and third-generation cephalosporin, being first report in Pakistan (2).

In southeastern Brazil, a study on bovine, poultry and pork meats evaluated the presence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae*. ESBL-producing *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp. and *Enterobacter* spp. were the most isolated genera in bovine meat presenting third-generation cephalosporin resistance, however, ESBL-producing *Salmonella* and *E. coli* were isolated only in chicken and pork meat, increasing the importance of microorganisms isolates reported in our study (39).

In Italy, ESBL- and MBL- producing *Enterobacteriaceae* it was reported in fresh vegetables and in United States was characterized ESBL-producing *E. coli* in bovine meat, chicken breast, ground turkey and pork chops samples, showing the spread of these enzymes at different meats samples (25, 38) Ground beefs samples produced conventional and without antibiotic were evaluated in United States. *Salmonella* and *E. coli* was detected in similar proportions in samples. ESBL-producing was detected in both ground beef samples, while KPC-producing was detected only in without antibiotic ground beef samples (45).

In a poultry farm localized in Nigeria, cloacal swab samples analyzed. After phenotypically tests, confirmed MBL-producing *E. coli* (9/39) and *Klebsiella* spp. (6/33), similar frequency our study (11). Similar results were found in Egypt, chicken meat marketed was reported ESBL-producing (69/106) and carbapenemase-producing- (12/106) *Enterobacteriaceae*. (1).

High occurrence of ESBL- producing *Enterobacteriaceae* in fecal samples from chicken, bovine and pork were report in Switzerland, however, no ESBL producers were found in evaluate meat samples. The authors suggest that hygiene standards for slaughtering could be the reason for this results (21).

In Taiwan, ESBL-producing *E. coli* isolates from beef carcass surface were collected (n=19) and exhibited resistance to first- and third-generation cephalosporin, still ESBL- genotypes CTX-M3 were found in six *E. coli* isolates. The authors suggest ESBL-producing *E. coli* can be to spread resistance through beef, in view of CTX-M3 rarely report in animals and commonly report in clinical samples (10).

Reported that *Enterobacteriaceae* isolates from bovine meat showed high prevalence of antimicrobial resistance for beta-lactam. The phenotypic tests confirmed different ESBL- and carbapenemases-producing *Enterobacteriaceae*. Taking into account considerable consumption of bovine meat and few studies that evaluate the real exposure of meat as potencial source the resistance spread, we salient the importance this study. However, more research and genotypic studies are needed to evaluate the mechanism of transmission of resistance genes of ESBL- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in bovine meat.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was financed in part by the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil* (CAPES) - Finance Code 001. We thank Dr. Elton Luis Gasparotto

Denardin and team of Laboratory of Physical-chemical Studies and Natural Products of Federal University of Pampa.

## REFERENCES

1. Abdallah, H. M., Reuland, E. A., Wintermans, B. B., Al Naiemi, N., Koek, A., Abdelwahab, A. M., & Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E. 2015. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and/or carbapenemases-producing *Enterobacteriaceae* isolated from retail chicken meat in Zagazig, Egypt. *PloS one*, 10(8), e0136052.
2. Ahmad, K., Khattak, F., Ali, A., Rahat, S., Noor, S., Mahsood, N., & Somayya, R. 2018. Carbapenemases and Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Retail Chicken in Peshawar: First Report from Pakistan. *Journal of food protection*, 81(8), 1339-1345.
3. Botelho, L. A. B., Kraychete, G. B., e Silva, C., Lapa, J., Regis, D. V. V., Picão, R. C., ... & Bonelli, R. R. 2015. Widespread distribution of CTX-M and plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* from Brazilian chicken meat. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(2), 249-254.
4. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos de alimentos. DOU, Brasília, 2001. Available at: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC\\_12\\_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b)> Accessed 20 Dezember 2018.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil. 2018. Available at: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf>> Accessed 12 January 2019.
6. BrCAST - Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos; 2019. Available at: <http://brcast.org.br/documentos/> Accessed 14 January 2019.
7. BrCAST - Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – EUCAST. Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica; 2018. Available at: <http://brcast.org.br/documentos/> Accessed 12 January 2019
8. Cameron, A., & McAllister, T. A. 2016. Antimicrobial usage and resistance in beef production. *Journal of animal science and biotechnology*, 7(1), 68.
9. Castro, V. S., Teixeira, L. A. C., dos Prazeres Rodrigues, D., dos Santos, L. F., Conte-Junior, C. A., & de Souza Figueiredo, E. E. 2019. Occurrence and antimicrobial

- resistance of *E. coli* non-O157 isolated from beef in Mato Grosso, Brazil. *Tropical animal health and production*, 1-7.
10. Chen, C. M., Ke, S. C., Li, C. R., Wu, Y. C., Chen, T. H., Lai, C. H., ... & Wu, L. T. 2017. High diversity of antimicrobial resistance genes, class 1 Integrons, and genotypes of multidrug-resistant *Escherichia Coli* in beef carcasses. *Microbial Drug Resistance*, 23(7), 915-924.
  11. Chika, E., Ifeanyichukwu, I., Carissa, D., Thomas, A., Okoro, O., Joshua, E., ... & Charles, E. 2016. Occurrence of Metallo-Beta-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* from a Local Poultry Farm in Abakaliki, Nigeria. *International Journal of Applied Pharmaceutical Sciences and Research*, 1(2), 70-75.
  12. Clinical and Laboratory standards institute (CLSI). 2017. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Approved Standard—Twenty seventh Edition. CLSI document M100; Wayne PA.
  13. da Cunha-Neto, A., Castro, V. S., Carvalho, L. A., dos Prazeres Rodrigues, D., Mano, S. B., de Souza Figueiredo, E. E., & Conte-Junior, C. A. 2017. Serotypes and antimicrobial resistance profiles of *Salmonella* isolated from fresh beef processing and chilled fresh beef samples produced and marketed in the metropolitan region of Cuiaba, in the State of Mato Grosso, Brazil. *African Journal of Microbiology Research*, 11(45), 1626-1631.
  14. Dandachi, I., Fayad, E., El-Bazzal, B., Daoud, Z., & Rolain, J. M. 2018. Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Gram-Negative Bacilli and Emergence of mcr-1 Colistin Resistance Gene in Lebanese Swine Farms. *Microbial Drug Resistance*.
  15. Davis, G. S., Waits, K., Nordstrom, L., Grande, H., Weaver, B., Papp, K., & Price, L. B. 2018. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* from retail poultry meat with different antibiotic use claims. *BMC microbiology*, 18(1), 174.
  16. Djahmi, N., Dunyach-Remy, C., Pantel, A., Dekhil, M., Sotto, A., & Lavigne, J. P. 2014. Epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean countries. *BioMed research international*, 2014.
  17. Exner, M., Bhattacharya, S., Christiansen, B., Gebel, J., Goroncy-Bermes, P., Hartemann, P., et al. 2017. Antibiotic resistance: What is so special about multidrug-resistant gram-negative bacteria? *GMS Hyg. Infect. Control*, 12.
  18. Food and Agriculture Organization (FAO). Drivers, Dynamics and Epidemiology of Antimicrobial Resistance in Animal Production. 2016. Available at: <<http://www.fao.org/3/a-i6209e.pdf>> Accessed on 12 December 2018).
  19. Food and Drug Administration. CVM Updates - CVM Reports on Antimicrobials Sold or Distributed for Food-Producing Animals. 2010. (Food Drug Admin, Silver Spring, MD). Available at: <[www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/CVMUpdates/ucm236143.htm](http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/CVMUpdates/ucm236143.htm)> Accessed 13 December 2018.

20. Franco, B.D.G.; Landgraf, M. *Microbiologia dos alimentos*. 2003.
21. Geser, N., Stephan, R., & Hächler, H. 2012. Occurrence and characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC veterinary research*, 8(1), 21.
22. Gupte, S., & Kaur, T. 2015. Clinical importance of carbapenemase production in Gram-negative bacteria. *Journal of Tropical Diseases & Public Health*.
23. Hoelzer, K., N. Wong, J. Thomas, K. Talkington, E. Jungman, and A. Coukell. 2017. Antimicrobial drug use in food-producing animals and associated human health risks: what, and how strong, is the evidence? *BMC Vet Res*. 13:211
24. Hrabák, J., Chudáčková, E., & Papagiannitsis, C.C. 2014. Detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(9), 839-853.
25. Iseppi, R., de Niederhäusern, S., Bondi, M., Messi, P., & Sabia, C. 2018. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase, AmpC, and MBL-Producing Gram-negative bacteria on fresh vegetables and ready-to-eat salads sold in local markets. *Microbial Drug Resistance*, 24(8), 1156-1164.
26. Koningstein, M., Simonsen, J., Helms, M., & Mølbak, K. 2010. The interaction between prior antimicrobial drug exposure and resistance in human *Salmonella* infections. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(8), 1819-1825.
27. Kurekci, C., M. Arkadaş, and Y. K. Avşar. 2016. Occurrence, genetic characterization and antimicrobial resistance of extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* isolated from surk samples, a traditional Turkish cheese. *J. Food Meas. Charact.* 10:709–714.
28. Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. 2015. *Medical microbiology. Elsevier Health Sciences*.
29. Nguyen, D. P., T. A. D. Nguyen, T. H. Le, N. M. D. Tran, T. P. Ngo, V. C. Dang, T. Kawai, M. Kanki, R. Kawahara, M. Jinnai, S. Yonogi, Y. Hirai, Y. Yamamoto, and S. Yonogi. 2016. Dissemination of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-and AmpC  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* within the food distribution system of Ho Chi Minh City. *Vietnam. BioMed Res. Int.* 2016:8182096.
30. O'Neill, J. *Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations the Review on Antimicrobial Resistance*. 2016. Available at: < [https://amr-review.org/sites/default/files/160525\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf)> Accessed on 10 December 2018.
31. Queenan, A. M., & Bush, K. 2007. Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases. *Clinical microbiology reviews*, 20(3), 440-458.
32. Randall, L., Lodge, M., Elviss, N., Lemma, F., Hopkins, K., Teale, C., et al. 2017. 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*, 241, 283–290.
33. Ruppe, E., P.L. Woerther, and F. Barbier. 2015. Mechanisms of antimicrobial resistance in gram-negative bacilli. *Ann. Intensive Care* 5:21.
  34. Schill, F., Abdulmawjood, A., Klein, G., and Reich, F. 2017. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and AmpC betalactamase producing *Enterobacteriaceae* in fresh pork meat at processing level in germany. *Int. J. Food Microbiol.* 257, 58–66. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017. 06.010
  35. Schmidt, J. W., Agga, G. E., Bosilevac, J. M., Brichta-Harhay, D. M., Shackelford, S. D., Wang, R., & Arthur, T. M. 2015. Occurrence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* in the beef cattle production and processing continuum. *Appl. Environ. Microbiol.*, 81(2), 713-725.
  36. Seiffert, S.N., M. Hilty, V. Perreten, and A. Endimiani. 2013. Extended-spectrum cephalosporin-resistant Gram-negative organisms in livestock: an emerging problem for human health? *Drug Resist. Updat.* 16:22–45.
  37. Stefani, S., Giovanelli, I., Anacarso, I., Condò, C., Messi, P., DE NIEDERHAUSERN, S., ... & Sabia, C. 2014. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in food-producing animals in Northern Italy.
  38. Tadesse, D. A., Li, C., Mukherjee, S., Hsu, C. H., Bodeis Jones, S., Gaines, S. A., & McDermott, P. F. 2018. Whole-Genome Sequence Analysis of CTX-M Containing *Escherichia coli* Isolates from Retail Meats and Cattle in the United States. *Microbial Drug Resistance*, 24(7), 939-948.
  39. Takahashi, J. T. 2015. Detecção e identificação de beta-lactamases de espectro estendido e de genes de resistência às quinolonas em *Enterobacteriaceae* isoladas de amostras de carnes de frango, suína e bovina destinadas ao consumo humano.
  40. Tamma, P. D., Opene, B. N., Gluck, A., Chambers, K. K., Carroll, K. C., & Simner, P. J. 2017. Comparison of 11 phenotypic assays for accurate detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Journal of clinical microbiology*, 55(4), 1046-1055.
  41. Tark, D. S., Moon, D. C., Kang, H. Y., Kim, S. R., Nam, H. M., Lee, H. S., ... & Lim, S. K. 2017. Antimicrobial susceptibility and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* isolated from bovine mastitic milk in South Korea from 2012 to 2015. *Journal of dairy science*, 100(5), 3463-3469.
  42. Tepeli, S. Ö., & Zorba, N. N. D. 2018. Frequency of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)–and AmpC  $\beta$ -lactamase–producing *Enterobacteriaceae* in a cheese production process. *Journal of dairy science*, 101(4), 2906-2914.
  43. Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., ... & Laxminarayan, R. 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18), 5649-5654.

44. Verraes, C., Van Boxstael, S., Van Meervenne, E., Van Coillie, E., Butaye, P., Catry, B., & Daube, G. 2013. Antimicrobial resistance in the food chain: a review. *International journal of environmental research and public health*, 10(7), 2643-2669.
45. Vikram, A., Miller, E., Arthur, T. M., Bosilevac, J. M., Wheeler, T. L., & Schmidt, J. W. 2018. Similar Levels of Antimicrobial Resistance in US Food Service Ground Beef Products with and without a “Raised without Antibiotics” Claim. *Journal of food protection*, 81(12), 2007-2018.
46. Vitas, A. I., Naik, D., Pérez-Etayo, L., & González, D. 2018. Increased exposure to extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* through the consumption of chicken and sushi products. *International journal of food microbiology*, 269, 80-86.
47. Woolhouse, M. E., & Ward, M. J. 2013. Sources of antimicrobial resistance. *Science*, 341(6153), 1460-1461.
48. WHO, World Health Organization. 2015. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance; WHO: Geneva, Switzerland. Available at: <[http://www.wpro.who.int/entity/drug\\_resistance/resources/global\\_action\\_plan\\_eng.pdf](http://www.wpro.who.int/entity/drug_resistance/resources/global_action_plan_eng.pdf)> Accessed on 12 December 2018.

**TABLE 1.** Resistance profiles of *Enterobacteriaceae* isolates in bovine meat

Resistance profile			
Antibiotic	Isolates (n=161)	(%)	Antibiotic class
CFZ	n=123	86%	Cephalosporin 1 <sup>st</sup> generation
AMP	n=86	53,5%	Penicillin
CFO	n=29	18%	Cephalosporin 2 <sup>nd</sup> generation
CRO	n=25	15,5%	Cephalosporin 3 <sup>rd</sup> generation
ATM	n=25	15,5%	Monobactam
CAZ	n=21	13%	Cephalosporin 3 <sup>rd</sup> generation
TET	n=14	8,6%	Tetracycline
CPM	n=06	3,7%	Cephalosporin 4 <sup>th</sup> generation
SUT	n=06	3,7%	Sulfonamide
MER	n=02	1,2%	Carbapenem
CIP	n=01	0,6%	Fluoroquinolone
GEN	--	--	Aminoglycoside

CFZ, cefazolin; AMP, ampicillin; CFO, cefoxitin; CRO, ceftriaxone; ATM, aztreonam; CAZ, ceftazidime; TET, tetracycline; CPM, cefepime; SUT, trimethoprim-sulfamethoxazole; MER, meropenem; CIP, ciprofloxacin; GEN, gentamycin; --, none.

**TABLE 2.** Resistance profiles of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in bovine meat.

Microorganisms	CFZ	TET	CRO	SUT	CAZ	AMP	CIP	CFO	ATM	MER	GEN	CPM	ESBL positive samples
<i>Klebsiella</i> spp. (n=20)	16	08	15	09	11	17	01	10	10	06	01	09	17/20
<i>Enterobacter</i> spp. (n=11)	10	05	08	03	08	09	05	07	04	03	01	06	10/11
<i>Serratia</i> spp. (n=10)	08	05	07	02	06	06	03	-	01	-	01	03	08/10
<i>Providencia</i> spp. (n=05)	05	02	03	02	03	04	01	02	02	-	-	01	05/05
<i>Citrobacter</i> spp. (n=05)	03	01	-	-	03	02	-	-	02	-	-	-	03/05
<i>Escherichia coli</i> (n=04)	04	02	02	-	02	04	-	-	01	01	01	02	04/04
<i>Salmonella</i> spp. (n=03)	03	01	02	01	03	03	02	02	02	-	-	01	03/03

CFZ, cefazolin; TET, tetracycline; CRO, ceftriaxone; SUT, trimethoprim-sulfamethoxazole; CAZ, ceftazidime; AMP, ampicillin; CIP, ciprofloxacin; CFO, ceftiofur; ATM, aztreonam; MER, meropenem; GEN, gentamycin; CPM, cefepime; ESBL, extended-spectrum beta-lactamase.

**TABLE 3.** Resistance profiles of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in bovine meat.

Microorganisms	MER <25mm	MBL positive samples	KPC positive samples
<i>Klebsiella</i> spp.	n=12	-	04
<i>Enterobacter</i> spp.	n=04	01	-
<i>Serratia</i> spp.	n=02	01	-
<i>Providencia</i> spp.	n=01	01	-
<i>Citrobacter</i> spp.	n=01	-	-
<i>Escherichia coli</i>	n=01	-	-
<i>Salmonella</i> spp.	-	-	01

MER, meropenem; MBL, Metallo beta-lactamase; KPC, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

## 5. MANUSCRITO II

### **Avaliação da qualidade microbiológica e perfil de resistência de bactérias Gram-positivas isoladas da carne bovina comercializadas em Uruguaiana-RS.**

Ticiane da Rosa Pinheiro, Cheila Denise Ottonelli Stopiglia

Manuscrito em fase de submissão para Brazilian Journal of Food Technology



**AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E PERFIL DE RESISTÊNCIA  
DE BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS ISOLADAS DA CARNE BOVINA  
COMERCIALIZADAS EM URUGUAIANA-RS.**

**RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS NA CARNE BOVINA**

Ticiane da Rosa Pinheiro<sup>1</sup>; Cheila Denise Ottonelli Stopiglia<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Pampa – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Uruguaiana –RS, Brasil.

\*Autor correspondente:

Cheila Denise Ottonelli Stopiglia

Universidade Federal do Pampa – Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

BR 472 – Km 585, Caixa postal: 118. CEP: 97501-970. Uruguaiana, RS, Brasil

Telefone: (55) 3911-0200

E-mail: [cheilastopiglia@unipampa.edu.br](mailto:cheilastopiglia@unipampa.edu.br)

# AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E PERFIL DE RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DA CARNE BOVINA COMERCIALIZADAS EM URUGUAIANA-RS.

## RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar a qualidade microbiológica e o perfil de resistência de bactérias isoladas da carne bovina comercializadas em Uruguaiana-RS. As amostras de carne bovina foram adquiridas em cinco supermercados e dois açougues de Uruguaiana-RS entre os meses de junho de 2017 e agosto de 2018, totalizando 45 amostras. Para o preparo das amostras foram pesados  $25 \pm 2$ g, que foram adicionadas em 225 mL de água peptonada e homogeneizadas 18h a 15°C. Diluições ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) foram semeadas em placas de ágar sangue e ágar MacConkey, incubadas a 35°C por 24h. Colônias isoladas com diferentes características morfológicas foram submetidas à técnica de coloração de gram e provas de identificação. Para avaliar a resistência, foi utilizado o teste de disco-difusão e a análise de resíduos antimicrobianos foi realizada por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS). Dentre os micro-organismos isolados, nove identificados como *Staphylococcus aureus*, seis identificados como *Staphylococcus* coagulase negativa e três isolados identificados como *Listeria* spp.. Em geral, os isolados de *S. aureus* apresentaram sensibilidade frente aos antimicrobianos avaliados, enquanto os isolados de *Staphylococcus* coagulase negativa apresentaram resistência a eritromicina e cefoxitina. Os isolados de *Listeria* spp. mostraram resistência a, pelo menos, dois dos quatro antibióticos testados, sendo dois isolados considerados multirresistentes. Nenhum resíduo de agente antimicrobiano foi identificado e/ou quantificado nas amostras. Pode-se concluir preliminarmente que há uma impraticabilidade higiênica em alguns

estabelecimentos que comercializam a carne bovina em Uruguaiiana – RS, apresentando baixa qualidade microbiológica, além disso, a resistência antimicrobiana relatada serve de alerta sobre a disseminação desses microorganismos embora nenhum resíduo de antimicrobiano tenha sido detectado nas amostras.

**Palavras-chave:** resistência antimicrobiana; *Staphylococcus aureus*; *Staphylococcus* coagulase negativa; *Listeria* spp.; carne bovina.

## **EVALUATION OF MICROBIOLOGICAL QUALITY AND RESISTANCE PROFILE OF ISOLATED BACTERIA FROM BOVINE MEAT MARKETED IN URUGUAIANA-RS.**

### **ABSTRACT**

The aim of this study was evaluate the microbiological quality and resistance profile of bacteria isolated from bovine meat marketed in Uruguaiiana-RS. The samples were purchased from five supermarkets and two butchers from Uruguaiiana-RS between June 2017 and August 2018, totaling 45 samples. To prepare the samples were weighed  $25 \pm 2$ g added in 225 mL of peptone water, homogenized 18h at 15°C. Dilutions ( $10^{-1}$   $10^{-5}$ ) were seeded on MacConkey agar and blood agar plates, incubated at 35°C for 24 h. Isolated colonies with different morphological characteristics were selected and submitted to Gram staining technique and identification tests were performed. The disk diffusion test was used to evaluate the resistance and the analysis of antimicrobial residues was performed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS / MS). Among the isolates, nine identified as *Staphylococcus aureus*, six identified as Coagulase-negative *Staphylococcus* and three identified as *Listeria* spp.. In general, *S. aureus* isolates

showed sensitivity while Coagulase-negative *Staphylococcus* isolates showed resistance to erythromycin and ceftiofur. *Listeria* spp. isolates showed resistance to at least two of the four antibiotics tested and two isolates considered multiresistant. No antimicrobial agent residue was identified and / or quantified in the samples. We preliminarily concluded that there is a hygienic impracticability in some establishments that marketed the bovine meat in Uruguaiana - RS, presenting low microbiological quality, in addition, the antimicrobial resistance reported serves as alert about the spread of these microorganisms, although no antimicrobial residue has been detected in the samples.

**Keywords:** antimicrobial resistance; *Staphylococcus aureus*; Coagulase-negative *Staphylococcus*; *Listeria* spp.; bovine meat.

## INTRODUÇÃO

No Rio Grande do Sul a carne bovina é muito valorizada para o consumo, haja vista que o churrasco é instituído por lei estadual o prato típico do gaúcho (DO SUL, 2003). Altamente nutricional devido a sua composição química, constituída basicamente de água (75%) e proteínas (19%), a carne bovina torna-se um ambiente propício à proliferação microbiana (PARDI *et al.*, 2001). Além de suas características intrínsecas, outros fatores podem influenciar na contaminação da carne, como o processo do abate e a manipulação desse alimento até chegar ao consumidor (FORSYHTE, 2013; JAY, 2005; ORDÓÑEZ, 2005).

Alguns micro-organismos considerados indicadores são utilizados na avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos, e, quando presentes, indicam contaminação fecal, possível presença de patógenos ou deteriorantes (MIRANDA *et al.*, 2012). O sabor, cor, odor, maciez e textura são alguns fatores que influenciam na decisão de compra, e a fim de suprir essas exigências, o mercado de carnes necessita oferecer produtos que mantenham condições higiênicas sanitárias adequadas, preservando à saúde do consumidor (MADI, 2005; OLIVEIRA, 2006).

Considerada como um problema ecológico, a resistência aos antimicrobianos envolve seres humanos, animais e o meio ambiente e, o uso indiscriminado e inadequado desses agentes está diretamente envolvido com a disseminação desses micro-organismos resistentes (WHO, 2015, SO *et al.*, 2015; ZINSSTAG *et al.*, 2012).

Nos animais produtores de alimentos, os antimicrobianos são amplamente utilizados no tratamento de infecções, profilaxia e, principalmente, como agente indutor de crescimento (JAY, 2005). As boas práticas veterinárias precisam ser mantidas, caso contrário, resíduos dos antimicrobianos podem permanecer nos tecidos animais, trazendo danos à saúde (BRASIL, 2018; STOLKER; BRINKMAN, 2005).

Bactérias resistentes isoladas em diferentes alimentos de origem animal e em animais produtores de alimentos, frequentemente são relatadas e, provavelmente são fontes de transmissão dessa resistência aos seres humanos (KIRBIS; KRIZMAN, 2015). Estudos brasileiros descrevem a presença de bactérias como *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria* spp. com importante perfil de resistência em carnes bovinas, suínas, frango, entre outras (IGLESIAS, 2014; MONTEIRO *et al.*, 2018; MONTEZANI *et al.*, 2017).

Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a qualidade microbiológica, traçar o perfil de resistência de bactérias Gram-positivas isoladas e determinar a presença de resíduos antimicrobianos da carne bovina comercializada em Uruguaiana-RS.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Coleta, preparação e identificação das amostras**

Amostras de carne bovina foram adquiridas em cinco supermercados e dois açougues de Uruguaiana-RS entre os meses de junho de 2017 e agosto de 2018, totalizando 45 amostras. Para o preparo das amostras foram pesados  $25 \pm 2$ g, retiradas assepticamente da parte interna e adicionadas em 225 mL de água peptonada e posteriormente homogeneizadas em incubadora de agitação orbital durante 18h a 15°C. Diluições seriadas ( $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ ) foram semeadas em placas de ágar sangue e ágar Mac Conkey e incubadas a 35°C por 24h (BRASIL, 2003). Colônias isoladas com diferentes características morfológicas foram selecionadas e submetidas à técnica de coloração de gram e provas de identificação (BARTH *et al.*, 2010).

### **Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos**

A avaliação fenotípica da resistência foi realizada pelo método de disco-difusão de Kirby-Bauer. Os resultados foram interpretados de acordo com as diretrizes do BrCAST (*Brazilian Committe on Antimicrobial Susceptibility Testing*). Foram utilizados sete agentes antimicrobianos: ampicilina, clindamicina, cefoxitina, eritromicina, penicilina, meropenem e sulfametoxazol-trimetoprima (BrCast, 2019).

### **Análise de resíduos antimicrobianos**

A análise de resíduos foi realizada por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS). Para separação cromatográfica foi utilizada coluna C18 e a fase móvel foi composta por metanol e água (JANK *et al.*, 2017). O método avaliou resíduos de 46 antibióticos. As classes majoritárias analisadas foram os beta-lactâmicos, as tetraciclina, as sulfonamidas, as fluoroquinolonas e os macrolídeos.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Foram isolados 179 micro-organismos das 45 amostras avaliadas. Desses, nove isolados foram identificados como *Staphylococcus aureus*, seis isolados identificados como *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN), três isolados identificados como *Listeria* spp. e outros 161 isolados foram identificados como enterobactérias (dados não informados).

A presença de *Staphylococcus* spp. em alimentos em muitos casos é associada a impraticabilidade higiênica por parte dos manipuladores, tendo em vista que esse gênero é abundante na microbiota da pele, mucosas e trato respiratório do homem (BORGES *et al.*, 2011). De modo geral, os *S. aureus* isolados nesse estudo apresentaram sensibilidade à maioria dos antibióticos testados e 08/09 foram resistentes à penicilina (Tabela 1), porém os isolados de SCN mostraram resistência

importante, tendo em vista que 03/06 isolados apresentaram resistência a eritromicina e a cefoxitina (Tabela 1), resultados similares aos encontrados por Hachiya e colaboradores (2016). A resistência a cefoxitina reporta esses isolados como resistentes a todos os antibióticos beta-lactâmicos, restringindo as opções de tratamento em caso de infecções por esse micro-organismo. Ainda um isolado de SCN apresentou resistência a todos antibióticos testados, que o classifica como multirresistente.

**Tabela 1.** Perfil de resistência de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus coagulase negativa* isolados na carne bovina.

Isolados	CFO <sup>a</sup>	CLI <sup>d</sup>	ERI <sup>e</sup>	SUT <sup>f</sup>	PEN <sup>g</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=1)	S <sup>b</sup>	S	S	S	S
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=8)	S	S	S	S	R
<i>Staphylococcus</i> Coagulase negative (n=2)	S	S	S	S	R
<i>Staphylococcus</i> Coagulase negative (n=1)	S	S	R	S	R
<i>Staphylococcus</i> Coagulase negative (n=1)	R <sup>c</sup>	S	S	S	R
<i>Staphylococcus</i> Coagulase negative (n=1)	R	S	R	S	R
<i>Staphylococcus</i> Coagulase negative (n=1)	R	R	R	R	R

<sup>a</sup>CFO – cefoxitina; <sup>b</sup>S – sensível; <sup>c</sup>R - resistente; <sup>d</sup>CLI – clindamicina; <sup>e</sup>ERI – eritromicina; <sup>f</sup>SUT – sulfametoxazol-trimetoprima; <sup>g</sup>PEN - penicilina

Segundo a RDC nº12/2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a *Listeria* spp. é um dos micro-organismos que não pode ser isolado em amostras de 25g de carnes frescas ou prontas para consumo e, ao contrário do que é exigido pela regulamentação brasileira, foram identificados três isolados de *Listeria* spp. nesse estudo, onde 02/03 foram resistentes a três classes de antimicrobianos testados, podendo ser considerados multirresistentes (Tabela 2). A presença de *Listeria* spp. resistente aos antibióticos em resultados similares foram relatados em amostras de

carne bovina no Distrito Federal e em leites crus analisados em Pernambuco (PALMA *et al.*, 2016; MOURA *et al.*, 2018). Esse micro-organismo é causador da listeriose, infecção causada pela ingestão de alimentos contaminados, descrita em surtos pelo mundo (CDC, 2016; PIETA, 2010; RODRIGUES *et al.*, 2016).

**Tabela 2.** Perfil de resistência de *Listeria* spp. isoladas na carne bovina.

Isolados	AMP <sup>a</sup>	ERI <sup>c</sup>	MER <sup>e</sup>	SUT <sup>f</sup>
<i>Listeria</i> spp. (n=1)	R <sup>b</sup>	S <sup>d</sup>	S	R
<i>Listeria</i> spp. (n=1)	R	S	R	R
<i>Listeria</i> spp. (n=1)	R	R	S	R

<sup>a</sup>AMP – ampicilina; <sup>b</sup>R - resistente; <sup>c</sup>ERI – eritromicina; <sup>d</sup>S – sensível; <sup>e</sup>MER – meropenem; <sup>f</sup>SUT – sulfametoxazol-trimetoprima.

Embora relatado o isolamento de bactérias resistentes aos antibióticos, nosso estudo não detectou resíduos dos agentes antimicrobianos rastreados na carne bovina (dados não mostrados), sugerindo que o período adequado de espera para eliminação do antibiótico foi respeitado para a realização do abate dos animais. Entretanto, um rastreio de resíduos antimicrobianos foi realizado em 50 bovinos abatidos na Nigéria, onde 16 amostras de fígado e seis amostras de rins apresentaram resíduos de penicilinas e tetraciclinas (IBRAHIM *et al.*, 2009). Resíduos de tetraciclinas também foram detectados em carne bovina de três abatedouros na Etiópia (ADDISALEM *et al.*, 2012).

## CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, foi possível concluir preliminarmente que há uma impraticabilidade higiênica em alguns estabelecimentos que comercializam a carne bovina em Uruguaiana – RS, apresentando baixa qualidade microbiológica, além

disso, a resistência antimicrobiana relatada serve de alerta sobre a disseminação desses micro-organismos.

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e Rede de Laboratórios Nacionais Agropecuários – LANAGRO.

## REFERÊNCIAS

ADDISALEM H.B, Bayleyegn M.Z, Bayleyegn M.Z (2012) Tetracycline Residue Levels in Slaughtered Beef Cattle from Hree Slaughterhouses in Central Ethiopia. **Global Veterinaria** 8: 546-554.

BARTH, A. L. ; Peixoto ; PIETA, V. P. ; MARTINS, A. F. **Bacteriologia Clínica - Manual de Aulas Práticas**. 1. ed. Porto Alegre: Editora Sulina, 2010. v. 1. 101 p

BORGES, M.D.F., Nassu, R. T., Pereira, J. L., Andrade, A.P.C.D., & Kuaye, A. Y. (2008). Perfil de contaminação por Staphylococcus e suas enterotoxinas e monitorização das condições de higiene em uma linha de produção de queijo de coalho. **Ciência Rural**. Santa Maria, v.38, n.5, p.1431-1438, 2008.

BRANDÃO, J. L.. **Monitoramento microbiológico em uma linha de abate de bovinos mediante o emprego de micro-organismos indicadores de higiene e pesquisa de patógenos de importância em saúde pública**. 2011. 74f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Norte do Paraná, Curitiba, 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Limites Máximos de Resíduos de Medicamentos Veterinários em Alimentos de Origem Animal**. 2018. Disponível em: <  
[http://portal.anvisa.gov.br/documents/219201/219401/Med+Vet\\_Documento+base+discussa~o+18.10/69d161b5-785c-4907-862c-2294b48a79c5](http://portal.anvisa.gov.br/documents/219201/219401/Med+Vet_Documento+base+discussa~o+18.10/69d161b5-785c-4907-862c-2294b48a79c5)> Acesso em 23 de janeiro de 2019.

\_\_\_\_\_. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para o controle de produtos de origem animal e água. **Instrução Normativa 62**, de 26 de agosto de 2003. Diário Oficial da União. 2003.

BrCAST - Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - EUCAST. **Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos**; 2019. Available online: <http://brcast.org.br/documentos/> Accessed 14 January 2019.

CDC. **Centers Disease Control and Prevention**. Disponível em: <  
<https://www.cdc.gov/listeria/timeline.html>> US., 2016.

DE MACEDO, R. E. F., Rossa, L. S., Nunes, L. C. D. A. S., Biasi, R. S., Gomes, C., Galeb, L. D. A. G., & Kirschnik, P. G. Atmosferas modificadas para conservação de carnes frescas: tendências e aplicabilidade tecnológica do monóxido de carbono. Revista Acadêmica: **Ciência Animal**, v. 7, n. 4, p. 469-482, 2009.

DO SUL, RIO GRANDE. **Lei Nº 11.929, de 20 de junho de 2003**. Institui o churrasco como "prato típico" e o chimarrão como "bebida símbolo" do Estado do Rio Grande do Sul e dá outras providências. Assembleia Legislativa do Estado do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, RS, v. 23, 2003.

FORSYTHE, S.J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed. São Paulo: Artmed, 2013, 607 p.

HACHIYA, J. O., Rossi, G. A. M., Amaral, L. A., Ribeiro, L. F., Sato, R. A., Silva, H. O., ... & Vidal, A. M. C.. Ocorrência de *Staphylococcus* spp. resistente à metilina em queijo "requeijão" e "especialidade láctea tipo requeijão". Revista de **Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia** do CRMV-SP, v. 14, n. 3, p. 79-80, 2016.

IBRAHIM A, Junaidu A, Garba M (2009) Multiple antibiotic residues in meat from slaughtered cattle in Nigeria. **Internet Journal of Veterinary Medicine** 8: 1.

IGLESIAS, Mariana Almeida. Caracterização molecular e sensibilidade a antimicrobianos de *Listeria monocytogenes* isoladas de carcaças bovinas no sul do Brasil. 2014. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas.

JANK, L., Martins, M. T., Arsand, J. B., Motta, T. M. C., Feijó, T. C., dos Santos Castilhos, T., & Pizzolato, T. M.. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry multiclass method for 46 antibiotics residues in milk and meat: development and validation. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 7, p. 2152-2164, 2017.

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

KIRBIS, A; KRIZMAN, M. Spread of antibiotic resistant bacteria from food of animal origin to humans and vice versa. **Procedia Food Science**, v. 5, p. 148-151, 2015.

LAXMINARAYAN, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A. K., Wertheim, H. F., Sumpradit, N., & Greko, C (2013) Antibiotic resistance-the need for global solutions. **Lancet Infect Diseases** 13(12):1057–1098.

MADI, L. Brasil Pack Trends 2005 – Embalagem, Distribuição e Consumo. Campinas, São Paulo - Brasil: CETEA/ITAL, 2000.

MIRANDA, Priscila.C.; CAZETTA, M.L.; BARRETO, Norma.S.E. Carne de sol bovina: Aspectos higiênico-sanitários. **Revista Higiene Alimentar**, v. 26, n. 214/215, p. 65-68, 2012.

MONTEIRO, E. da Costa, P. A., de Castro Manfrin, L., Freire, D. O., da Silva, I. C. R., & Orsi, D. C. Qualidade microbiológica de carne bovina moída comercializada em supermercados do Distrito Federal, Brasil. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 12, n. 4, p. 520-530, 2018.

MONTEZANI, E. Giuffrida, R., Pereira Andrade, R. A., & Silva, B. L. Isolamento de *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* em carne de frango e condições dos estabelecimentos comerciais no município de Tupã-SP. **Colloquium Vitae**. 2017.

MOURA, F. M.; et al. Formação de biofilme e perfil de resistência a antimicrobianos e sanitizantes de *Listeria monocytogenes* isoladas de leite de tanques de expansão. 2018.

OLIVEIRA, Léa M., Sarantópoulos, Claire IGL, Cunha, Débora G., & Lemos, Aline B. (2006). Embalagens termoformadas e termoprocessáveis para produtos cárneos processados. **Polímeros**, 16 (3), 202-210.

ORDÓÑEZ, Juan.A. **Tecnologia de Alimentos de Origem Animal**. v. 2. São Paulo: Artmed, 2005. 279 p.

PALMA, Joana M., Lisboa, Rodrigo C., Rodrigues, Dália P., Santos, André F.M., Hofer, Ernesto, & Santana, Angela P.. (2016). Caracterização molecular de *Listeria monocytogenes* oriundas de cortes cárneos bovinos e de abatedouros frigoríficos de bovinos localizados no Distrito Federal, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 36(10), 957-964.

PARDI, Miguel. C., SANTOS, Iacir.F.; SOUZA, Elmo.R.; PARDI, Henrique.S. **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne**. Universidade Federal Fluminense. EDUFF- Editora Universitária, p.623, 2001.

PIETA, Luiza. **Investigação da presença de *Listeria* spp. e *Listeria monocytogenes* em equipamentos e utensílios de indústrias de laticínios**. 2010.

RODRIGUES, Carla.S.; SÁ, Claudia. V.G.; MELO, Cristiano.B. An overview of *Listeria monocytogenes* contamination in ready to eat meat, dairy and fishery foods. **Ciência Rural**, v. 47, n. 2, 2017.

SARANTÓPOULOS, Claire. I.G.L.; SOLER, Raul. Embalagens com atmosfera modificada/controlada. **Revista Nacional da Carne**, São Paulo, n. 209, p. 32-42, 1991.

\_\_\_\_\_, Claire. I.G.L.; OLIVEIRA, L. M.; ANJOS, V. D. A.; ALVES, R. M. V. & ARDITO, E.F.G. Embalagem para produtos cárneos, **CETEA/ITAL**, Campinas (1994).

\_\_\_\_\_, Claire I.G.L. et al. Embalagens plásticas flexíveis: principais polímeros e avaliação de propriedades. Campinas: **CETEA/ITAL**, v. 1,p. 267, 2002.

SO, A.D.; SHAH, T.A.; ROACH, S.; LING CHEE, Y.; NACHMAN, K.E. An Integrated Systems Approach is Needed to Ensure the Sustainability of Antibiotic Effectiveness for Both Humans and Animals. **Journal Law Medicine Ethics** 2015, 43, 38–45.

SOUZA, Laura N.. **Detecção de *Listeria monocytogenes* em queijos coloniais comercializados no município de Porto Alegre**. 2016.

STOLKER, Alida .A.M.; BRINKMAN, Udo.A.T. Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food producing animals - a review. **Journal of Chromatography A**, v.1067, p.15-53, 2005.

VENTURINI, A. C. et al. A review: modified atmosphere packaging systems for fresh beef. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 1/4, p. 128-137, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global Action Plan on Antimicrobial Resistance**; WHO: Geneva, Switzerland, 2015. Disponível em: [http://www.wpro.who.int/entity/drug\\_resistance/resources/global\\_action\\_plan\\_eng.pdf](http://www.wpro.who.int/entity/drug_resistance/resources/global_action_plan_eng.pdf) . Acesso em 10 de janeiro de 2019.

ZINSSTAG, J.; Meisser, A.; Schelling, E.; Bonfoh, B.; Tanner, M. From 'Two Medicines' to 'One Health' and Beyond. Onderstepoort **Journal of Veterinary Research**. 2012, 79, a492.

## 6. MANUSCRITO III

### **Evaluation of viability and resistance profile of isolated bacteria from bovine meat at different cooking points**

Ticiane da Rosa Pinheiro, Mariana de Quadros Freitas, Cheila Denise Ottonelli Stopiglia

Manuscrito em fase de submissão para revista Ciência Animal Brasileira



## **EVALUATION OF VIABILITY AND RESISTANCE PROFILE OF ISOLATED BACTERIA FROM BOVINE MEAT AT DIFFERENT COOKING POINTS**

Ticiane da Rosa Pinheiro<sup>1</sup>; Mariana de Quadros Freitas<sup>2</sup>; Cheila Denise Ottonelli Stopiglia<sup>1</sup>

Affiliation:

<sup>1</sup> Postgraduate studies in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pampa, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>2</sup> Graduation in Pharmacy, Federal University of Pampa, Rio Grande do Sul, Brazil.

Corresponding author: Cheila Denise Ottonelli Stopiglia, Federal University of Pampa –BR 472 – Km 585, Mailbox: 118, Uruguaiana, RS, Brazil, Zip code: 97501-970, Phone number: (55) 55 – 3911-0200, Mail address: [cheilastopiglia@unipampa.edu.br](mailto:cheilastopiglia@unipampa.edu.br)

## EVALUATION OF VIABILITY AND RESISTANCE PROFILE OF ISOLATED BACTERIA FROM BEEF AT DIFFERENT COOKING POINTS

### Abstract

Intake food contaminated is the principal reason of foodborne diseases. Some microorganisms can accelerate deterioration meat products, being the temperature a viability control condition of these bacteria. The aim of this study was evaluate the viability of isolated bacteria from bovine meat at different cooking points and describe antimicrobial susceptibility profile. A barbecue was simulated with three bovine meat samples ( $\pm 600g$  each). Were analyzed raw, medium-rare and well-done meat. Agar blood and MacConkey utilized for isolation. The microorganisms identification was realized by biochemical tests. The antimicrobial susceptibilities of isolates were determined using a disk diffusion method. *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Listeria* spp., *Staphylococcus aureus*, Coagulase-negative *Staphylococcus*, *Acinetobacter* spp., *Salmonella* spp. and *Serratia* spp. were isolated. Even after being submitted to high temperatures, some microorganisms remained viable in bovine meat samples. *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp. and *Staphylococcus aureus* were isolated on the medium-rare and well done meat. However, *Salmonella* spp. was isolated in the medium-rare samples, it was not isolated in the well done samples. *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. and *Salmonella* spp. genera presented reduced sensitivity to cefazolin. *Staphylococcus* isolates presented important resistance to clindamycin, penicillin and cefoxitin antibiotics. *Listeria* spp. isolates presented penicillin resistance. The presence of deteriorates microorganisms with potential pathogenic risk in bovine meat samples even after temperature action and important antimicrobial resistance reported present an alert to our health.

**Keywords:** meat, antibiotic resistance, viability, food microbiology

## AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE E PERFIL DE RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE CARNE EM DIFERENTES PONTOS DE COZIMENTO

### Resumo

A ingestão de alimentos contaminados é a principal razão das doenças transmitidas por alimentos. Alguns micro-organismos aceleram a deterioração dos produtos cárneos, sendo a temperatura uma condição de controle de viabilidade. O objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade de bactérias isoladas de carne bovina em diferentes pontos de cozimento e descrever o perfil de suscetibilidade antimicrobiana. Um churrasco foi simulado com três amostras de carne bovina ( $\pm 600g$  cada). Foi analisada carne crua, mal passada e assada. Ágar sangue e MacConkey foram utilizados para isolamento. A identificação dos micro-organismos foi realizada por testes bioquímicos. Teste de disco-difusão foi utilizado para determinar a suscetibilidade antimicrobiana. *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Listeria* spp., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase-negativo, *Acinetobacter* spp., *Salmonella* spp. e *Serratia* spp. foram isolados. Mesmo após serem submetidos à altas temperaturas, alguns micro-organismos permaneceram viáveis nas amostras de carne bovina. *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp. e *Staphylococcus aureus* foram isolados na carne mal passada e assada. No entanto, *Salmonella* spp. foi isolado nas amostras mal passadas, e não foi isolada nas amostras assadas. *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. e *Salmonella* spp. apresentaram sensibilidade reduzida à cefazolina. Os isolados de *Staphylococcus* apresentaram importante resistência aos antibióticos clindamicina, penicilina e cefoxitina. Os isolados de *Listeria* spp. apresentaram resistência à penicilina. A presença de

micro-organismos deteriorantes com potencial risco patogênico em amostras de carne bovina, mesmo após a ação da temperatura e a importante resistência antimicrobiana relatada, apresentam um alerta para a nossa saúde.

**Palavras-chave:** carne, resistência a antibióticos, viabilidade, microbiologia alimentar.

## **Introduction**

Due to its chemical character, basically composed of water and proteins, bovine meat is a favorable environment for microbial growth and proliferation<sup>(1,2)</sup>. In addition to intrinsic factors, extrinsic factors such as manipulation, slaughter process and temperature may also influence the growth of microorganisms on bovine meat<sup>(3)</sup>.

Intake contaminated food is the main reason for foodborne diseases, causing enteric symptoms that can result in outbreaks. In Brazil 12,503 cases have been reported since 2000, being *Salmonella* spp., *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* etiologic the most agents described<sup>(4,5)</sup>. Microorganisms action on the meat product can accelerate the deterioration process, being the temperature a viability control condition of these bacteria<sup>(6,7)</sup>.

Used as promoters of growth and prophylaxis, antimicrobials are widely used in livestock farming<sup>(8)</sup>. However, the irrational use of these drugs can cause the presence of residues in the meat product, favoring the emergence of resistant bacteria that can easily reach our consumption<sup>(9)</sup>.

The aim of this study was evaluate the viability of isolated bacteria from bovine meat at different cooking points and describe antimicrobial susceptibility profile.

## **Materials and methods**

### **Samples collected and preparation**

Three samples of bovine fillet ( $\pm 600$ g each) were acquired in different supermarkets and a butcher shop in the Uruguaiana city, South Brazil between May and July 2018. For the barbecue, the bovine meat was salted and roasted under coals. Each sample was analyzed at three different points: a portion of raw meat (R) was cut before the start of barbecue. After beginning of the barbecue, a medium-rare (MR) portion was cut, and finally, a well-done (WD) portion was cut for analysis. Aliquots  $25 \pm 0.2$  g were aseptically removed from the internal part of each sample and added in 225 mL of 0.1% peptone saline<sup>(10)</sup>. An orbital shaking incubator was used for the homogenization of the samples for 18h / 15°C.

### Isolation and identification

Serial dilutions ranging from  $10^{-1}$  to  $10^{-5}$  were prepared and aliquots of 25  $\mu$ L were seeded on the blood agar and MacConkey agar plates in duplicate. Plates were incubated at  $35 \pm 2^\circ\text{C}$  for 24 hours. For the identification, the isolated colonies with different morphological characteristics were selected. The technique of Gram staining was applied and biochemical identification tests were performed for each microorganism group<sup>(10, 11)</sup>.

### Antimicrobial susceptibility assay

The antimicrobial susceptibility assay was performed by disk diffusion agar method, as described by the Clinical and Laboratory Standards Institute<sup>(12)</sup>. Used amoxicillin clavulanic acid (20/10  $\mu$ g), ampicillin (10  $\mu$ g), azithromycin (15  $\mu$ g), cefazolin (30  $\mu$ g); cefoxitin (30  $\mu$ g), clindamycin (2  $\mu$ g); erythromycin (15  $\mu$ g); penicillin (10 UI) and tobramycin (10  $\mu$ g) disks;

### Results and discussion

A total of 34 microorganisms were isolated and identified. With temperature action the viability of microorganisms decreased, remaining thermotolerant microorganisms (TABLE 1). It is possible to observe that some microorganisms only appear in the raw meat and well-done samples meat, while others appear in the medium-rare and well-done samples meat. This may occur because representative samples of 25g were retired from each portion of meat.

**Table 1** All isolated microorganisms

Samples	Isolates (n)	Microorganisms (n)
RM	n=16	<i>Acinetobacter</i> spp. (n=1) <i>Citrobacter</i> spp. (n=6) <i>Enterobacter</i> spp. (n=2) <i>Klebsiella</i> spp. (n=3) <i>Listeria</i> spp. (n=2) <i>Serratia</i> spp. (n=1) Coagulase negative <i>Staphylococcus</i> (n=1)
MR	n=12	<i>Citrobacter</i> spp. (n=1) <i>Enterobacter</i> spp. (n=3) <i>Klebsiella</i> spp. (n=4) <i>Salmonella</i> spp. (n=1) <i>Staphylococcus aureus</i> (n=2) Coagulase negative <i>Staphylococcus</i> (n=1)

WD	n=06	<i>Citrobacter</i> spp. (n=2) <i>Klebsiella</i> spp. (n=1) <i>Listeria</i> spp. (n=2) <i>Staphylococcus aureus</i> (n=1)
----	------	---

R- raw; MR – medium-rare; WD – well-done.

*Citrobacter* spp. (n = 9), *Klebsiella* spp. (n = 8) and *Enterobacter* spp. (n = 5) were the most genera isolated, similar a study by Sousa<sup>(13)</sup>, that detected the same genera after analysis of fresh crab meat. These microorganisms are part of the coliform group at 35°C of non-fecal origin, indicative of food contamination<sup>(3)</sup>. Also, the genera *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., showed reduced sensitivity to cefazolin (TABLE 2), contrary reported by Alcântara<sup>(14)</sup>, where three samples of *Klebsiella* spp. isolated from bovine meat were sensitive to cephalosporin used.

**Table 2** Antimicrobial resistance profile of *Enterobacteriaceae* isolates

Microorganisms	Isolates	TOB	AMP	CFZ	ERT	AMC
<i>Citrobacter</i> spp.	n=09	S	R (n=3)	R (n=8)	S	R (n=1)
<i>Klebsiella</i> spp.	n=08	S	R (n=3)	R (n=7)	R (n=1)	R (n=1)
<i>Enterobacter</i> spp.	n=05	S	S	R (n=4)	S	S
<i>Salmonella</i> spp.	n=01	S	R (n=1)	R (n=1)	S	S
<i>Serratia</i> spp.	n=01	S	R (n=1)	R (n=1)	S	R (n=1)

TOB – tobramycin, AMP – ampicillin, CFZ cefazolin, ERT – erythromycin, AMC – amoxicillin clavulanic acid, S- sensitive; R – resistant.

The *Staphylococcus* isolates presented important resistance to clindamycin, penicillin and cefoxitin antibiotics (TABLE 3), remaining viable in samples medium-rare and well-done bovine meat. Isolates of cefoxitin resistant *Staphylococcus* also present resistance to other  $\beta$ -lactam antibiotics, according to CLSI<sup>(12)</sup>, restricting the possibility of treatment in cases of infections by this microorganism. Resistant bacteria isolated in different animal foods and food-producing animals are reported as likely sources of transmission of this resistance to humans<sup>(13)</sup>

**Table 3** Antimicrobial resistance profile of *Staphylococcus* isolates

Microorganisms	Isolates	AZI	CLI	PEN	CFO
<i>Staphylococcus aureus</i>	n=03	S	R(n=3)	R(n=3)	R(n=3)
Coagulase-negative <i>Staphylococcus</i>	n=02	S	R(n=2)	R(n=2)	R(n=2)

AZI – azithromycin, CLI – clindamycin, PEN – penicillin, CFO – ceftiofloxacin, S- sensitive; R – resistant.

In this study, were identified *Salmonella* spp. and *Listeria* spp., however, according to microbiological standards for food of the National Health Surveillance Agency<sup>(16)</sup>, is necessary the absence of these microorganisms in 25g of raw meat or ready-to-eat meat products. These disease-causing microorganisms are described in countless outbreaks of food infections in the world<sup>(5)</sup>. Yet, *Listeria* spp. isolates presented penicillin resistance (TABLE 4) corroborating the profile of the 11 strains of *Listeria monocytogenes* isolated in 2017 by Palma<sup>(17)</sup>, who were also resistant to penicillin.

**Table 4** Antimicrobial resistance profile of *Listeria* spp. isolates

Microorganisms	Isolates	AZI	CLI	PEN
<i>Listeria</i> spp.	n=04	S	S	R(n=4)

AZI – azithromycin, CLI – clindamycin, PEN – penicillin, S- sensitive; R – resistant.

## Conclusion

We observed in this study that even after cooking some microorganisms remained viable in the bovine meat samples, in addition, some isolates presented important resistance profile to different antibiotics tested, which may limit therapeutic options in cases of infections, of being a possible source of transmission of resistant bacteria via food for humans.

## Acknowledgment

This study was financed in part by the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil* (CAPES) - Finance Code 001. We thank Dr. Elton Luis Gasparotto Denardin and team of Laboratory of Physical-chemical Studies and Natural products of Federal University of Pampa.

## References

1. Raj AS, Jayaram R, Dev S, Ravikumar S. A review on recent advances in meat processing. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 2013;2(8):169-76.
2. FAO. Composition of meat 2012. Available from: [http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/meat/backgr\\_composition.html](http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/meat/backgr_composition.html). Accessed in 23 October 2018.
3. Franco BDG, Landgraf M. *Microbiologia dos alimentos.* Microbiologia dos alimentos 2003.

4. Melo ES, de Amorim WR, Pinheiro REE, do Nascimento Corrêa PG, de Carvalho SMR, Santos ARSS, et al. Doenças transmitidas por alimentos e principais agentes bacterianos envolvidos em surtos no Brasil. PUBVET. 2018;12:131.
5. Saúde BMD. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. Available from: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/17/Apresentacao-Surtos-DTA-2018.pdf> . Accessed in 19 December 2018.
6. Alcantara M, de Moraes ICL, de Matos C, de Souza OdCC. Principais Microrganismos envolvidos na deterioração das características sensoriais de derivados cárneos. Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal. 2012;6(1):1-20.
7. Hedrick HB. Principles of meat science: Kendall/Hunt Publishing Company; 1994.
8. Andreotti R, Nicodemo MLF. Uso de antimicrobianos na produção de bovinos e desenvolvimento de resistência: Embrapa Gado de Corte Campo Grande; 2004.
9. Brito JRF, Portugal JAB. Diagnóstico da qualidade do leite, impacto para a indústria ea questão dos resíduos de antibióticos: Embrapa Gado de Leite; 2003.
10. Brasil. Métodos analíticos oficiais para análises microbiológicas para o controle de produtos de origem animal e água (Instrução Normativa 62, de 26 de agosto de 2003). Diário Oficial da União. 2003.
11. Barth LAP, Ana L.; Martins, Andreza; Perez, Vinícius. Bacteriologia clínica: manual de aulas práticas. Porto Alegre: Publisher Universitária; 2010. 101 p.
12. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; CLSI Supplement M100S. 2016.
13. Kirbis, Andrej, and Manja Krizman. "Spread of antibiotic resistant bacteria from food of animal origin to humans and vice versa." Procedia Food Science 5 (2015): 148-151.
14. Sousa MM, Correia MMF, Nascimento RA. Análise microbiológica do Caranguejo Uçá, *Ucidescordatus* (Linnaeus, 1763), como bioindicador ambiental dos manguezais do Rio Paciência, Ilha de São Luís-MA. Sociedade de Ecologia do Brasil. 2007. Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil.
15. Alcântara MA. Ocorrência e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de micro-organismos isolados de cortes de carne bovina. Veterinária em Foco. 2012;10(1).
16. Brasil. RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Dispõe sobre os princípios gerais para o estabelecimento de critérios e padrões microbiológicos para alimentos Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Available from: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC\\_12\\_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b) . Accessed in 12 December 2018.
17. Palma JM, Lisboa RC, Rodrigues DdP, Santos AF, Hofer E, Santana AP. Caracterização molecular de *Listeria monocytogenes* oriundas de cortes cárneos bovinos e de abatedouros frigoríficos de bovinos localizados no Distrito Federal, Brasil. 2016.

### PARTE III

#### 7. DISCUSSÃO GERAL

A carne bovina é um alimento de alto valor nutricional, e, em especial, no Rio Grande do Sul, é muito valorizado para o consumo, haja vista que o churrasco é o prato típico dos gaúchos. Sendo composta por água e proteínas a carne acaba sendo um meio propício para proliferação microbiana. Essa pesquisa tem como resultado um estudo da diversidade de micro-organismos que podem estar presentes na carne bovina, diferentemente dos encontrados na literatura que realizam o levantamento de determinadas espécies de micro-organismos. Durante o período de quinze meses, foi realizado o isolamento, identificação e testes de suscetibilidade aos antibióticos na carne bovina comercializada na cidade de Uruguaiana – RS, além do rastreamento de resíduos de agentes antimicrobianos e avaliação da viabilidade dos micro-organismos após submeter a carne a diferentes pontos de cozimento.

Dentre os diferentes grupos de micro-organismos isolados da carne bovina *in natura*, os bacilos Gram-negativos, em especial, as enterobactérias (n=161) foram os mais isolados, seguidos dos cocos Gram-negativos (n=21), cocos Gram-positivos (n=15), e bacilos Gram-positivos (n=03).

Quanto à avaliação do perfil de resistência aos antibióticos, foram testados doze diferentes agentes pertencentes a cinco diferentes classes. Foi observada alta taxa de resistência bacteriana frente aos antibióticos beta-lactâmicos, onde 123(86%), 86(53,5%), 29(18%), 25(15,5%) e 21(13%) isolados foram resistentes a cefazolina, ampicilina, cefoxitina, ceftriaxona e ceftazidima, respectivamente. Vale ressaltar a importância desse resultado, tendo em vista que os isolados testados são de origem alimentar (carne bovina) e esses micro-organismos apresentaram resistência à maior parte dos antibióticos comumente usados na prática clínica para tratamento de infecções bacterianas.

*Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., *Citrobacter* spp., *E. coli* e *Salmonella* spp. foram as enterobactérias mais isoladas. Além disso, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. e *E. coli* fazem parte do grupo coliformes, indicativo de qualidade microbiológica em alimentos, sendo *E. coli*, exclusivamente de origem fecal. Ainda, de acordo com a RDC nº12/2001 da ANVISA, não é aceitável a presença da bactéria *Salmonella* em 25g de carnes frescas ou produtos cárneos prontos para o consumo, ao contrário do que relatamos.

Fenotipicamente foram confirmados que 50 isolados produziam enzimas ESBL capazes de inativar os antibióticos beta-lactâmicos, exceto os carbapenêmicos; três isolados produziam MBL, enzimas inativadoras de todos beta-lactâmicos, exceto aztreonam e cinco isolados produziam KPC, capaz de inativar todos antibióticos beta-lactâmicos, sendo então, a produção enzimática o mecanismo de resistência produzido por essas bactérias encontradas na carne. A ampla utilização de antibióticos em animais produtores de alimentos é uma grande preocupação para a saúde humana, pois acabam induzindo o desenvolvimento de micro-organismos resistentes que podem chegar via alimentar ao nosso consumo.

Os cocos Gram-negativos isolados nesse estudo, apresentaram sensibilidade frente a todos os antimicrobianos testados.

Dentre os cocos Gram-positivos isolados, foram identificados *Staphylococcus aureus* (n=9) e *Staphylococcus coagulase negativa* (n=6). A presença do gênero *Staphylococcus* em alimentos geralmente está associada à impraticabilidade higiênica durante a manipulação, haja vista que esse gênero faz parte da microbiota natural da pele, mucosas e trato respiratório do homem, o que facilita sua disseminação. Frente aos antibióticos, três isolados apresentaram resistência a cefoxitina, o que reporta esses isolados como resistentes a todos antibióticos beta-lactâmicos. Um dos isolados apresentou resistência a todos os antibióticos testados,

sendo reportado como multirresistente, restringindo bastante às opções de tratamento em casos de infecções causadas por essa espécie de micro-organismo.

Embora em menor quantidade de isolados, os bacilos Gram-positivos (n=3), identificados como *Listeria* spp. também representam um resultado indesejável nas amostras de carne bovina, pois, segundo RDC nº12/2001 da ANVISA, do mesmo modo que exige a ausência de *Salmonella* spp, é exigida a ausência de *Listeria* spp. em 25g de carnes frescas ou produtos cárneos prontos para o consumo. Essa bactéria é causadora da listeriose, infecção alimentar pelo consumo de alimentos contaminados pelo micro-organismo, podendo estar presente inclusive em carnes mal passadas. Além disso, os isolados apresentaram resistência a, pelo menos, três antibióticos testados.

Paralelamente ao estudo que determinou a diversidade de micro-organismos em carnes *in natura*, simulamos um churrasco, a fim de avaliarmos a viabilidade de micro-organismos em diferentes pontos de cozimento da carne. Um total de 34 micro-organismos foram isolados das amostras, sendo dezesseis oriundos da carne crua, doze da carne mal passada e seis da carne assada. É possível perceber diante dos resultados obtidos que com a ação da temperatura a viabilidade de micro-organismos foi reduzida, porém, não foi eliminada.

Micro-organismos do grupo coliformes, *Citrobacter* spp., *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. foram isolados nas amostras de carne crua e mal passada, e, *Citrobacter* spp. e *Klebsiella* permaneceram viáveis inclusive na carne assada, comprovando a capacidade dessas bactérias resistirem mesmo com ação da temperatura no alimento. Em desconformidade com a regulação sanitária vigente, por serem micro-organismos com potencial patogênico, novamente foram isolados *Salmonella* spp. (carne mal passada) e *Listeria* spp., (carne assada). Os isolados de *Listeria* spp. foram resistentes a todos antibióticos testados. Os demais isolados apresentaram resistência à maioria dos antibióticos

testados, incluindo cefazolina, cefoxitina, ampicilina, clindamicina e penicilina, geralmente utilizados na prática clínica.

Embora o relato de bactérias resistentes aos antibióticos, nosso estudo não detectou nenhum resíduo dos agentes antimicrobianos testados, o que sugere que o período de espera entre a administração e eliminação total do medicamento até o momento do abate do animal foram respeitados.

Este estudo trouxe uma abordagem ampla da diversidade de micro-organismos que podem estar presentes na carne bovina. Foram isoladas bactérias indicadoras de má qualidade higiênica e com potencial patogênico. Além disso, em geral, os isolados apresentaram perfil de resistência preocupante frente aos antibióticos testados. Isso significa que há uma forte relação entre os micro-organismos isolados na carne e a possível transferência de resistência aos seres humanos, sendo o alimento, uma das fontes dessa disseminação.

## 8. CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos nesse estudo mostraram que a carne bovina comercializada em Uruguaiana apresentou:

- contaminação microbiana predominantemente composta por *Enterobacteriaceae*;
- presença de micro-organismos em desconformidade com a regulamentação sanitária vigente;
- de modo geral, prevalência de resistência a diferentes e importantes agentes antimicrobianos;
- ocorrência de bactérias produtoras de enzimas que inativam a maior parte dos antibióticos utilizados na terapia humana;
- ocorrência de bactérias resistentes na carne mal passada e assada;
- nenhum resíduo de antimicrobiano.

## **9. PERSPECTIVAS**

Como perspectivas para enriquecimento e complemento desse trabalho, estão previstas a determinação da sequência genotípica dos isolados que se mostraram fenotipicamente produtores de ESBL e carbapenemase para confirmar o mecanismo envolvido na resistência.

## 10. REFERÊNCIAS

ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E. An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. **Nature**, [s.l.], v. 146, n. 3713, p.837-837, 28 dez. 1940. Springer Nature.

AGUIAR, E. **Introdução à microbiologia clínica e ao tratamento de doenças infecciosas**. 1. ed. S.Paulo: Casa do Novo Autor, 2008. v. 150. 128p

AHMAD, Kafeel et al. Carbapenemases and Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Retail Chicken in Peshawar: First Report from Pakistan. **Journal of food protection**, v. 81, n. 8, p. 1339-1345, 2018.

ALCANTARA, Marcela et al. Principais Microorganismos envolvidos na deterioração das características sensoriais de derivados cárneos. **Revista brasileira de higiene e sanidade animal**, v. 6, n. 1, p. 1-20, 2012.

AL-JASSER, M. S. Effect of cooling and freezing temperatures on microbial and chemical properties of chicken meat during storage. **Journal of Food Agriculture & Environment**, Helsinki, v. 10, n. 1, p. 113-116, Jan. 2012.

AMBLER, R. P. The Structure of beta-Lactamases. **Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences**, [s.l.], v. 289, n. 1036, p.321-331, 16 maio 1980. The Royal Society.

ANDRADE LN, Woodford N, DARINI AL. International gatherings and potential for global dissemination of Sao Paulo metallo-beta-lactamase (SPM) from Brazil. **Int J Antimicrob Agents** [Letter Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2014 Feb;43(2):196-7.

ANGULO, F. J.; NARGUND, V. N.; CHILLER, T. C. Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. **Journal of Veterinary Medicine**, Series B, v. 51, n. 8-9, p. 374-379, 2004.

BARANCELLI, G.V.; SILVA-CRUZ, J.V.; PORTO, E.; OLIVEIRA, C.A.F. *Listeria Monocytogenes*: Ocorrência em Produtos Lácteos e Suas Implicações Em Saúde Pública. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.78, n.1, p.155-168, jan./mar., 2011.

BARANIAK A, IZDEBSKI R, ZABICKA D, BOJARSKA K, GORSKA S, LITERACKA E, et al. Multiregional dissemination of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258/ST512 genotypes in Poland, 2010-14. **J Antimicrob Chemother**. 2017;72(6):1610–6.

BOELTER, R. **Resíduos de Antibióticos nos Alimentos de Origem Animal. In Farmacologia Veterinária - Temas Escolhidos** MAGALHÃES, H.M> (org) Ed. Agropecuária LTDA, Guaíba, Rio Grande do Sul, 1998.

BORGES, J.T. *et al.* Aplicação do Sistema Hazard Analysis and Critical Control Points (HACCP) no processamento de carne bovina fresca. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 20, n. 1, 2002.

BOTELHO, Larissa Alvarenga Batista et al. Widespread distribution of CTX-M and plasmid-mediated AmpC  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* from Brazilian chicken meat. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 2, p. 249-254, 2015.

BOTSOGLOU, N.A. & Fletouris, D.J. **Drug Residues in Food**. Marcel Dekker, 2001; Inc., New York, NY

BRADFORD P.A.(2018) Epidemiology of Bacterial Resistance. In: Fong I., Shlaes D., Drlica K. (eds) Antimicrobial Resistance in the 21st Century. **Emerging Infectious Diseases of the 21st Century**. Springer, Cham

BRANDÃO, Juliana L. **Monitoramento microbiológico em uma linha de abate de bovinos mediante o emprego de micro-organismos indicadores de higiene e pesquisa de patógenos de importância em saúde pública**. 2011.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde - Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica**. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/servicos/audite/manuais/microbiologia/mod\\_5\\_2004.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicos/audite/manuais/microbiologia/mod_5_2004.pdf)>. Acesso em 05 de dezembro de 2018.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. **Portaria Ministerial nº 448, de 10 de setembro de 1998 – Proíbe a fabricação, importação, comercialização e o emprego de preparação farmacêutica de uso veterinário, nas rações e aditivos alimentares, contendo cloranfenicol, furazolidona e nitrofurazona em animais cujo produto seja destinado ao consumo humano**. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 1998.

\_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Projeções do Agronegócio: Brasil 2016/2017 a 2026/2027**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. – Brasília: Mapa/ACS, 2017.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. 158 p.

Disponível em: <

[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_integrado\\_prevencao\\_doencas\\_alimentos.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_prevencao_doencas_alimentos.pdf)> Acesso em: 18 de dezembro de 2018.

\_\_\_\_\_. Decreto n. 30, 691, alterado pelos Decretos n. 1,255 de 2506-62, n. 1236 de 02-09-94, n. 1.812 de 08-02-96 e n. 2.244 de 04-06-97. **Aprova o regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal (RIISPOA)**. 1997.

BUSH, K.; JACOBY G.A. Updated Functional Classification of  $\beta$ -lactamases. **Antimicrobial Agents Chemother**, v. 53, n. 3, p. 969-976, Mar 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. A Functional Classification Scheme for  $\beta$ -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. **Antimicrobial Agents Chemother**, v.39, n.6, p.1211-1233, June 1995.

CASTANHEIRA, M.; SMITH, C.; MENDES, R. E.; MORENO, C.; SADER, H. S.; JONES, R. N. **Variations in the Occurrence of ESBL, CRE and MDR Phenotypes Among Enterobacteriaceae Isolates: Results from 20 Years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program**. Disponível em: < <https://www.jmilabs.com/publications/variations-in-the-occurrence-of-esbl-cre-and-mdr-phenotypes-among-enterobacteriaceae-isolates-results-from-20-years-of-the-sentry-antimicrobial-surveillance-program/> >. Acesso em 14 de janeiro de 2019.

CASTRO, Vinicius Silva et al. Occurrence and antimicrobial resistance of *E. coli* non-O157 isolated from beef in Mato Grosso, Brazil. **Tropical animal health and production**, p. 1-7, 2019.

CHANTZIARAS I, Boyen F, Callens B, Dewulf J (2014) Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: A report on seven countries. **Journal Antimicrobial Chemother** 69(3):827–834.

CHEN, Chih-Ming et al. High diversity of antimicrobial resistance genes, class 1 Integrons, and genotypes of multidrug-resistant *Escherichia coli* in beef carcasses. **Microbial Drug Resistance**, v. 23, n. 7, p. 915-924, 2017.

CHONG Y, Ito Y, Kamimura T. Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **Infect Genet Evol** 2011;11:1499-504.

CODEX. **Codex Alimentarius**. Disponível em: <<http://www.codexalimentarius.org/about-codex/en/>> Acesso em: 12 de junho de 2017.

COLLIGNON, Peter J.; MCEWEN, Scott A. One Health—Its Importance in Helping to Better Control Antimicrobial Resistance. **Tropical medicine and infectious disease**, v. 4, n. 1, p. 22, 2019.

COLLIGNON. P.; Beggs, J.J.; Walsh, T.R.; Gandra, S.; Laxminarayan, R. Anthropological and Socioeconomic Factors Contributing to Global Antimicrobial Resistance: A Univariate and Multivariable Analysis. **Lancet Planet Health**. 2018, 2, e398–e405.

CORNAGLIA G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo- $\beta$ -lactamases: a last frontier for  $\beta$ -lactams? **The Lancet Infectious Diseases**. 2011;11(5):381-393.

COUTINHO, Luiz Carlos Mesquita *et al.* **Parâmetros de qualidade de cortes de carne bovina resfriada comercializada na cidade do Rio de Janeiro**. 2004. Tese de Doutorado.

DIAS, Maria Bárbara Nanes; JÚNIOR, Agenor Tavares Jácome; FERREIRA, Adilma Leite. **Avaliação da contaminação por *Staphylococcus aureus*, Coliformes e *Salmonella* em espetinhos comercializados por ambulantes no centro de Caruaru-PE**. 2016.

DÍAZ-CRUZ, M.S. & BARCELÓ, D. Recent advances in LCMS residue analysis of veterinary medicines in the terrestrial environment. **TrAC Trends Analytical Chemistry** v.26, p.637-646, 2007.

FAO. **Food and Agriculture Organization**. Disponível em: <http://www.fao.org/brasil/pt/>. Acesso em: 07 de junho de 2017.

FDA. **Food and Drug Administration**. Summary report on antimicrobials sold or distributed for use in food-producing animals. 2017. Disponível em: <  
<https://www.fda.gov/downloads/ForIndustry/UserFees/AnimalDrugUserFeeActADUFA/UCM628538.pdf>> Acesso em 04 de janeiro de 2019.

\_\_\_\_\_. **Food and Drug Administration**. Final Rule:Antimicrobial Animal Drug Sales and Distribution Reporting.  
<https://federalregister.gov/articles/2016/05/11/20161082/antimicrobial-animal-drug-sales-and-distribution-reporting>. Published 2016. Acesso em 20 de dezembro de 2018.

FERNANDES, A. T. **Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde**. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2000. 953 p, v.1.

FONTOURA, C. L. **Estudo microbiológico em carcaças bovinas e influência da refrigeração sobre a microbiota contaminante**. Jaboticabal, 2006.

FORSYTHE Stephen. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, p. 1-12, 2003.

FRANCO, Robson Maia et al. Resistência antimicrobiana de Escherichia coli isoladas de carne e dejetos suínos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, n. 1, p. 31-36, 2010.

GALES AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gramnegative bacilli isolated from Latin America: resultsfrom SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagn Microbiol Infect Dis** 2012; 73:354- 60.

GOERING, Richard V. **Microbiologia Médica de Mims** / Richard V. Goering ; [tradução Alcir Costa Fernandes]. - [5. ed.] - Rio de Janeiro : Elsevier, 2014. 538 p. : il. ; 27 cm.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Censo Agropecuário 2017. Resultados preliminares. Disponível em:  
[https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo\\_agro/resultadosagro/pecuaria.html](https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/pecuaria.html). Acesso em 20 de dezembro de 2018.

IGLESIAS, Mariana Almeida. **Caracterização molecular e sensibilidade a antimicrobianos de *Listeria monocytogenes* isoladas de carcaças bovinas no sul do Brasil.** 2014. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas.

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

KAZMIERCZAK KM, BIEDENBACH DJ, HACKEL M, RABINE S, de JONGE BLM & BOUCHILLON SK. Global dissemination of <sup>bla</sup>KPC into bacterial species beyond *Klebsiella pneumoniae* and in vitro susceptibility to ceftazidime-avibactam and aztreonam-avibactam. **Antimicrob Agents Chemother.** 2016;60(8):4490–500.

KIRBIS, Andrej; KRIZMAN, Manja. Spread of antibiotic resistant bacteria from food of animal origin to humans and vice versa. **Procedia Food Science**, v. 5, p. 148-151, 2015.

KOLÁR, M.; URBÁNEK, K.; LÁTAL, T. Antibiotic selective pressure and development of bacterial resistance. **Int J Antimicrob Agents**, v.17, n.5, p.357-63, 2001.

LAMBERTZ, S. Thisted et al. Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods in Sweden 2010. **International Journal of Food Microbiology**, v. 160, n. 1, p. 24-31, 2012.

LAXMINARAYAN R, et al. (2013) Antibiotic resistance-the need for global solutions. **Lancet Infect Dis** 13(12):1057–1098.

LAZARUS, B., Paterson, D. L., Mollinger, J. L. & Rogers, B. A. 2015. Do Human Extraintestinal *Escherichia coli* Infections Resistant to Expanded-Spectrum Cephalosporins Originate from Food-Producing Animals? A Systematic Review. **Clin Infect Dis**, 60: 439-52

LEVINSON, Warren; **Microbiologia Médica e Imunologia.** 10. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2010; 664p. 28cm.

LIANG Y, Yin X, Zeng L, Chen S. Clonal replacement of epidemic KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in China. **BMC Infect Dis.** 2017;17(1):363.

LOGAN, Latania K.; WEINSTEIN, Robert A. The epidemiology of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: the impact and evolution of a global menace. **The Journal of infectious diseases**, v. 215, n. suppl\_1, p. S28-S36, 2017.

MATTHEW, M; HEDGES, R.W.; SMITH, J. T. Types of  $\beta$ -lactamase determined by plasmids in Gram-negative bacteria. **Journal of Bacteriology.** 1979; 138: 657-62.

MENDES, R. E., et al. Metallo-beta-lactamases. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, [s.l.], v. 42, n. 2, p.103-113, abr. 2006.

MONTEIRO, Erika et al. Qualidade microbiológica de carne bovina moída comercializada em supermercados do Distrito Federal, Brasil. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 12, n. 4, p. 520-530, 2018.

MONTEZANI, Erica *et al.* Isolamento de *Salmonella* spp. e *Staphylococcus aureus* em carne de frango e condições dos estabelecimentos comerciais no município de Tupã-SP. In: **Colloquium Vitae**. 2017.

MURRAY, Patrick R. **Microbiologia Médica**: tradução de Claudia Adelino Espanha... [et al]. – Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. il.

OLIVEIRA, Léa M. et al. Embalagens termoformadas e termoprocessáveis para produtos cárneos processados. **POLIMEROS CIENCIA E TECNOLOGIA**, v. 16, n. 3, p. 202, 2006.

ORDÓÑEZ-PEREDA, J.A. **Tecnologia de Alimentos – Alimentos de Origem Animal** – vol.2, Porto Alegre: Artmed, 2005.

OSANO, E. et al. Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, n. 1, p. 71-78, 1994.

PARDI, M. C., SANTOS, I. F. S., SOUZA, E. **Ciência, Higiene e Tecnologia da Carne**. 2ª edição rev. Goiânia: Editora UFG, v. 2, 2001.

PATERSON DL, BONOMO RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Review**. 2005 Oct;18(4):657-86.

PIGARRO, M. A. P.; SANTOS, M. **Avaliação microbiológica da carne moída de duas redes de supermercados da cidade de Londrina-PR**. Trabalho de conclusão de curso (Pós-Graduação em Higiene e Inspeção de Produtos de Origem Animal)–Instituto Qualittas–Universidade Castelo Branco, v. 59, 2008.

PRANDL, O. et al. **Tecnologia e Higiene de la carne**. Zaragoza, 1994.

PRATA, L. F.; FUKUDA, R. T. **Fundamentos de higiene e inspeção de carnes: Resíduos Químicos e Biológicos na Carne**. Jaboticabal: Funep, p.197-199, 2001.

PRICE LB, Johnson E, Vailes R, Silbergeld E (2005) Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* isolates from conventional and antibiotic-free chicken products. **Environ Health Perspect** 113(5):557–560.

PRICE, J.; SCHWEIGERT, B. **Ciência de la carne y de los productos carnicos**. 2.ed. Zaragoza: Acribia, p. 581, 1994.

PRICE, Lance B. et al. *Staphylococcus aureus* CC398: host adaptation and emergence of methicillin resistance in livestock. **MBio**, v. 3, n. 1, p. e00305-11, 2012.

QUEENAN AM and BUSH K. Carbapenemases: the Versatile  $\beta$ -lactamases. **Clinical Microbiology Review**.2007; 20:440-58.

RIO GRANDE DO SUL. **Atlas Socioeconômico do Rio Grande do Sul**. 2011. Disponível em: <http://www.scp.rs.gov.br/atlas>. Acesso em: 10 de junho de 2017

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistencia bacteriana. Interpretando o antibiograma**. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p.118.

RUPPE E, OLEARO F, PIRES D, BAUD D, RENZI G, CHERKAOUI A, et al. Clonal or not clonal? Investigating hospital outbreaks of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* with whole-genome sequencing. **Clin Microbiol Infect**. 2017;23(7):470–5.

SAMPAIO JL, GALES AC. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brazil: focus on beta-lactams and polymyxins. **Braz J Microbiol** [Review]. 2016 Oct 25.

SANTOS, A. A.; SIMÕES, G. T. N.; CRUZ, M. M.; FERREIRA, N. S. S.; LIMA, R. T. C.; TUNON, G. I. L. Avaliação da qualidade microbiológica de sushi comercializado em restaurantes de Aracaju, Sergipe. **Scientia Plena**. Vol. 8 num. 3, 2012.

SARCINELLI, M. F.; VENTURINI; K. S.; DA SILVA, L. C. **Características da Carne Bovina**. Boletim Técnico - PIE-UFES:00807, 2007.

SCHMIDT, John W. et al. Occurrence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* in the beef cattle production and processing continuum. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 81, n. 2, p. 713-725, 2015.

SIRTOLI, D. B. & CAMARELLA, L. 2018. O papel da vigilância sanitária na prevenção das doenças transmitidas por alimentos (DTA). **Saúde e Desenvolvimento**, 12, 197-209.

SO, A.D.; SHAH, T.A.; ROACH, S.; LING CHEE, Y.; NACHMAN, K.E. An Integrated Systems Approach is Needed to Ensure the Sustainability of Antibiotic Effectiveness for Both Humans and Animals. **Journal Law Medicine Ethics** 2015, 43, 38–45.

TAKAHASHI, Juliana Tiemi et al. **Deteccção e identificação de beta-lactamases de espectro estendido e de genes de resistência às quinolonas em Enterobacteriaceae isoladas de amostras de carnes de frango, suína e bovina destinadas ao consumo humano**. 2015.

TEPELI, Seda Özdikmenli; ZORBA, Nükhet N. Demirel. Frequency of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)–and AmpC  $\beta$ -lactamase–producing *Enterobacteriaceae* in a cheese production process. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 4, p. 2906-2914, 2018.

THIELE-BRUHN, S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**. , v.166, p.145-167, 2003.

TOLEMAN MA, SIMM AM, MURPHY TA, Gales AC, BIEDENBACH DJ, Jones RN, et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** [Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2002 Nov;50(5):673-9.

TORTORA, Gerard J. **Microbiologia** [recurso eletrônico] / Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case ; tradução: Aristóboles Mendes da Silva ... [et al.] ; revisão técnica: Flávio Guimarães da Fonseca. – 10. ed. – Dados eletrônicos. – Porto Alegre : Artmed, 2012.

VAN BOECKEL, Thomas P. et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 18, p. 5649-5654, 2015.

VARMAN, A.H.; EVANS, M.G. **Foodborne pathogens. An illustrated text**. Marison publishing, 1996. 501p.

VUBIL D, FIGUEIREDO R, REIS T, CANHA C, BOAVENTURA L, GJ. Outbreak of KPC-3-producing ST15 and ST348 *Klebsiella pneumoniae* in a Portuguese hospital. **Epidemiol Infect.** 2017;145(3):595–9.

WEGENER, H. C. Antibiotics feed and their role in resistance development. **Curr Opin Microbiol.**, v.6, p.439-445, 2003.

WITTE, W.; TSCHAPE, H.; KLARE, I.; WERNER, G. Antibiotics in animal feed. **Acta Veterinaria Scandinavica**, V. 6, n. 93, p. 37-45, 2000.

WHO - World Health Organization. **Global Action Plan on Antimicrobial Resistance**; Geneva, Switzerland, 2015. Disponível em: [http://www.wpro.who.int/entity/drug\\_resistance/resources/global\\_action\\_plan\\_eng.pdf](http://www.wpro.who.int/entity/drug_resistance/resources/global_action_plan_eng.pdf) . Acesso em 10 de janeiro de 2019.

YIGIT, Hesna et al. Novel carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151-1161, 2001.

YOU Y, Silbergeld EK. Learning from agriculture: Understanding low-dose antimicrobials as drivers of resistome expansion. **Fro.t Microbiol**, 2014. 5:284.

ZINSSTAG, J.; MEISSER, A.; SCHELLING, E.; BONFOH, B.; TANNER, M. From ‘Two Medicines’ to ‘One Health’ and Beyond. Onderstepoort **Journal of Veterinary Research**. 2012, 79, a492.

## 11. ANEXOS

### **Anexo I**

#### **Instruções para autores – Journal of Food Protection**

Disponível em: <<https://www.foodprotection.org/upl/downloads/library/journal-of-food-protection-instructions-for-authors.pdf>>

**JOURNAL OF FOOD PROTECTION®**  
**INSTRUCTIONS FOR AUTHORS**

[Scope of the Journal](#)  
[How to Submit Manuscripts](#)  
[Types of Papers](#)  
[Preparation of Manuscripts](#)  
[Organization of Research Papers and Research Notes](#)  
[Organization of Review, Mini-Review, or General Interest Papers](#)  
[Supplemental Material](#)  
[Preparation of Tables](#)  
[Preparation of Figures](#)  
[Common Abbreviations](#)  
[Policy on Commercialism](#)  
[Review Procedure](#)  
[Copyright, Open Access, and Permissions Policy](#)  
[Plagiarism Policy](#)  
[Manuscript Publication Fees](#)  
[Contact Information](#)  
[Common Problems with Manuscripts](#)  
[English Language and Copyediting Services](#)  
[Online Submission Instructions](#)

**SCOPE OF THE JOURNAL**

The *Journal of Food Protection*® (*JFP*) is an international, monthly scientific journal in the English language published by the International Association for Food Protection (IAFP). *JFP* publishes research and review articles on all aspects of food protection and safety. Major emphases of *JFP* are placed on studies dealing with:

1. Tracking, detecting (including traditional, molecular, and real-time), inactivating, and controlling food-related hazards including microorganisms (including antibiotic resistance), microbial (mycotoxins, seafood toxins) and non-microbial toxins (heavy metals, pesticides, veterinary drug residues, migrants from food packaging, and processing contaminants), allergens and pests (insects, rodents) in human food, pet food and animal feed throughout the food chain;
2. Microbiological food quality and traditional/novel methods to assay microbiological food quality;
3. Prevention of food-related hazards and food spoilage through food preservatives and thermal/non-thermal processes, including process validation;
4. Food fermentations and food-related probiotics;
5. Safe food handling practices during pre-harvest, harvest, post-harvest, distribution and consumption, including food safety education for retailers, foodservice, and consumers;

6. Risk assessments for food-related hazards;
7. Economic impact of food-related hazards, foodborne illness, food loss, food spoilage, and adulterated foods;
8. Food fraud, food authentication, food defense, and foodborne disease outbreak investigations.

**Manuscripts of a sensitive nature.** Bioterrorism and food security are of major concern to all involved in food production, processing, evaluation, and distribution, including members of IAFP. Manuscripts dealing with sensitive issues are expected to approach the subject from a preventative stance and not provide a how-to guide. A review policy is used in evaluating manuscripts submitted for publication in journals published by IAFP to minimize the possibility that their contents may be used to pose a food security threat. To view the policy, go [HERE](#).

**Suitability for publication.** Prospective authors with questions about the suitability of their research are invited to request an opinion from the Scientific Editors.

#### **HOW TO SUBMIT MANUSCRIPTS**

Submit manuscripts online via AllenTrack at <https://foodprotection.allentrack.net>. Instructions for online submission and a sample manuscript for formatting purposes are available on the site. Corresponding authors will be required to complete an electronic "Assignment of Copyright" form after their manuscript has been reviewed and revised. All material dealing with affairs of the Association, book reviews, or news and events of interest to IAFP Members is published in *Food Protection Trends (FPT)*. Such material should be sent directly to Donna Bahun, *FPT* Production Editor, at [dbahun@foodprotection.org](mailto:dbahun@foodprotection.org).

**Open Researcher and Contributor ID (ORCID).** *JFP* now publishes author ORCID IDs in articles. ORCID provides a persistent digital identifier that distinguishes you from every other researcher and, through integration in key research workflows such as manuscript and grant submission, supports automated linkages between you and your professional activities ensuring that your work is recognized.

The ORCID Registry is available free of charge to individuals, who may obtain an ORCID identifier, manage their record of activities, and search for others in the ORCID Registry. Click the appropriate login link at <https://foodprotection.allentrack.net> to either register for a new ORCID or associate an existing ORCID. A new page will open to create and/or validate your ORCID. Once the validation is complete, the new page will close and you will return to AllenTrack to finish your submission.

#### **TYPES OF PAPERS**

**Research Paper.** A research paper reports the results of original research that have not been published elsewhere. If the research has in part been previously reported, such as on a website, in a thesis or dissertation, or in another journal, this must be disclosed in the author's letter of submission. The journal will consider for publication research reports, which due to government

regulations, have previously appeared on websites. A research paper usually consists of 10 or more double-spaced typewritten pages of text (typically no more than 18, not including the title page, abstract, highlights, reference list, figure legend, tables, and figures). A research paper deals with its subject in some depth.

**Research Note.** A research note is a shorter paper that describes observations made in a limited area of investigation. Negative results are sometimes best reported in the form of a research note. However, the research note should not be used as a vehicle for reporting results of inferior research. A research note usually consists of nine or fewer double-spaced typewritten pages of text (not including the title page, abstract, reference list, figure legend, tables, and figures). The author must specify that a manuscript is submitted as a research note so it can be properly evaluated during the review process.

**Review and Mini-Review papers.** Review papers are scholarly summaries of the literature that synthesize the current state of knowledge. While review papers covering any aspect of food protection or safety can be submitted for consideration, papers that critically evaluate emerging, neglected, or "hot" topics in which there have been important recent advances are particularly encouraged. The journal also publishes mini-reviews. These papers focus on a narrower aspect of food safety and are generally under 8,000 words in length (including text and references). All review papers should include a title page, abstract, introduction, main text with appropriate headings and subheadings (paragraph lead-ins), conclusions, acknowledgments (optional), and references. Use of summary tables and figures is also encouraged.

**General Interest.** General interest papers are scholarly discussions that do not fit the definition of a "Review" paper. They may be, for example, recommended methods developed by an expert committee or organization, interpretation or presentation of foodborne pathogen prevalence or foodborne illness statistical data, or best practices for controlling foodborne pathogens, etc. A general interest paper should include a title page, abstract, introduction, main text with appropriate headings and subheadings (paragraph lead-ins), conclusions, acknowledgments (optional), references, tables, and figures.

**Letter to the Editor.** *JFP* invites letters to the editor. Letters commenting on articles printed in this publication are subject to review from the Scientific Editors before acceptance. Letters to the Editor are limited to no more than five double-spaced pages. The author of the article that is the focus of the letter is provided the opportunity to respond to the comments. This response is sent back to the author of the letter who is then given the option to continue with the publication process or to withdraw the Letter to the Editor. If withdrawn, neither the Letter to the Editor nor the author's response will be published. If not withdrawn, both the Letter to the Editor and the author's response will be published in their entirety. Send all Letters to the Editor directly to Didi Loynachan, Administrative Editor, at [dloynachan@foodprotection.org](mailto:dloynachan@foodprotection.org). Do not submit online.

## PREPARATION OF MANUSCRIPT

All parts of manuscripts must be typed fully double-spaced, at least 11-point type, including references, tables, table captions, footnotes, and figure legends. Manuscripts must be in Word or RTF format. Page margins on all sides must be 1 in. (2.5 cm) wide. Lines on each page must be

numbered consecutively to facilitate review of papers, but final revised manuscripts must NOT have line numbers. Number all pages, including tables and figures. *JFP* uses American conventions of spelling and punctuation.

Manuscripts are divided into sections, which must be arranged in the following order:

- Title page
- Abstract
- Highlights
- Introduction
- Materials and Methods
- Results
- Discussion (or Results and Discussion combined)
- Acknowledgments
- Supplemental Materials (if applicable)
- References
- Figure legend(s)
- Tables
- Figures

Except for the introduction, all of these sections have separate headings, which should appear in the manuscript worded exactly as above. A conclusions section is not used in research papers or notes but can be included in mini-review, review and general interest papers.

**Subheadings take the form of paragraph lead-ins.** Paragraph lead-ins should be boldface, indented, and run in with the text, separated by a period. Third-order subheadings will not be accepted. *JFP* follows many of the recommendations for manuscript preparation in the *ASM Style Manual*, 2nd ed., 1991, published by the American Society for Microbiology. Authors will find useful guidance concerning scientific nomenclature, abbreviations, numbers and measurement, English, references, tables, and figures, as well as a helpful bibliography. For further reference, see *Scientific Style and Format: The CBE Manual*, 6th ed., Cambridge University Press, 1994; *The Chicago Manual of Style*, 15th ed., University of Chicago Press, 2003; and the bibliographies in these guides.

## **ORGANIZATION OF RESEARCH PAPERS AND RESEARCH NOTES**

**Title Page.** Type double-spaced on a separate page. At the top, provide a running head indicating the topic of the paper, followed by the type of manuscript (i.e., Research Paper, Research Note, etc.). Then list the full title of the paper, the names of all authors, and name and address of the institution(s) or organization(s) where the work was done. Do not use trade names in titles. When authors are affiliated with more than one department or unit within an institution, or with more than one institution, superscript numbers are used to indicate each author's address. Above the footnotes, supply up to six key words, indicating the principal topics of the paper. Footnotes are used to give the present addresses of authors who are no longer at the institution(s) where the work was done. A footnote asterisk (\*) must be placed after the name of the author to whom correspondence about the paper and proofs are to be sent. The telephone and fax numbers and

email address of this author are placed in the footnote of the author for correspondence. No manuscript text appears on the title page. Statements regarding institutional practices are not allowed in any part of the manuscript. Statements disclaiming endorsement or approval of the views reflected in the manuscript should be in the Acknowledgments section.

**Abstract.** An abstract of no more than 2,000 characters, including spaces, must be placed on the second page of the manuscript to summarize the principal points of the study. The abstract contains only the abstract title and does not contain references, figures, or tables. Abstracts are reprinted separately by abstracting services and therefore must be meaningful without reference to the body of the paper.

**Highlights.** The journal now requires and publishes highlights in order to increase the visibility and discoverability of each article. Highlights should include 3–5 bullet points limited to 85 characters each (including spaces), each a complete sentence that describes a main result or conclusion of the study. A highlight title should be included and the highlights section should be placed immediately following the abstract within the manuscript file.

**Introduction.** The introductory section has no title and begins on the page following the abstract. It provides the reader with sufficient background information to evaluate the results of the research. An extensive review of the literature is not needed. The introduction also gives the rationale for and objectives of the study that is being reported.

**Materials and Methods.** Sufficient information must be provided so that another researcher can repeat the experiments that are described in the paper. If reference is made to a method published elsewhere in a journal or document that may not be readily available to most readers, then details of the method are to be included. If a published method is modified, such modification(s) must be described. Sources (company, city, state, or country) of chemicals, bacterial strains, reagents, and equipment must be identified. Delete registered and trademark symbols when given with trade names.

**Availability of Materials.** By publishing in the journal, the authors agree that, subject to requirements or limitations imposed by national or international laws or regulations, or institutional policies, any DNAs, viruses, microbial strains, mutant animal strains, cell lines, antibodies, and similar materials described in the article are available from a national collection or will be made available in a timely fashion, at reasonable cost, and in limited quantities to members of the scientific community for noncommercial purposes. The authors agree that they have the authority to comply with this policy either directly or by means of material transfer agreements through the owner.

**Microarray Data.** Where appropriate, complete microarray data must be deposited in a public database such as GEO, ArrayExpress, or CIBEX and must be accessible without restriction from the date of publication. The accession number must be included in the paper before publication and be accompanied by the website address of the databank.

**Results.** The Results section provides information by means of text, tables, and figures. Results and Discussion may be combined, or there may be a separate Discussion section. If a Discussion

section is to be included, place extensive interpretations of results in the Discussion section. Tables and figures must be numbered in the order in which they are mentioned in the text. All tables and figures must be cited in the text. Tables and figures reporting results should not be cited in the "Materials and Methods" section.

**Discussion.** Do not extensively repeat the introduction or "Results" sections. Provide an interpretation of the results in relation to known information. Conclusions should be included in this section.

**Acknowledgments.** Acknowledge financial and personal assistance (sources other than your institution) and any potential conflict of interest. Additionally, disclaimers of product endorsement or disclaimers of the views reflected by the manuscript are appropriate here.

### **ORGANIZATION OF REVIEW, MINI-REVIEW, OR GENERAL INTEREST PAPERS**

Review, mini-review, or general interest papers must have a title page and an abstract as described in the section on research papers. Do not include a table of contents. The remainder of the text begins with an introductory statement and then is divided into appropriate sections with headings and subheadings. An acknowledgment section may come at the end of the text, followed by the references, as described for a research paper. Authors are encouraged to cite original references where possible, but it is acceptable to use appropriate recent review papers in lieu of discussing numerous older papers. When appendices are included in a general interest or review paper, the decision to publish them in the article or separately as supplemental material (see below) is at the discretion of the Editor.

### **REFERENCES**

- Number and order the references alphabetically by the last name of the authors between and within each reference.
- Order references chronologically only when all authors' names are the same with the newest first.
- Only the first author's name and initials are inverted. Coauthors should be listed by first name or initials, then last name.
- Names of governments/organizations must be spelled out and placed in alphabetical order by name. Do not use acronyms such as EPA, FDA, and USDA.
- All references must be cited in the text by italicized numbers in parentheses, with a space between the numbers of the references: (3, 7, 22). Lists of references should be in numerical order.
- Journal names should be italicized and abbreviated according to the style of *BIOSIS*.
- References may be made to papers that are in press, i.e., that have been accepted for publication. References for papers that have not been accepted for publication should be listed by the authors' names, as submitted for publication. Do not include the journal name or year.
- Examples of different types of references are given below.

**Paper in a journal (inclusion of a DOI is optional)**

1. Moschonas, G., I. Geornaras, J. D. Stopforth, D. Wach, D. R. Woerner, K. E. Belk, G. C. Smith, and J. N. Sofos. 2012. Antimicrobials for reduction of *Salmonella* contamination in uncooked, surface-browned breaded chicken products. *J. Food Prot.* 75:1104-1175. doi:10.4315/0362-028X.JFP-11-492.
2. Santillana Farakos, S. M., D. Schaffner, and J. F. Frank. 2014. Predicting survival of *Salmonella* in low-water activity foods: an analysis of literature data. *J. Food Prot.* 77:1448-1461.
3. Tenorio-Bernal, M. I., B. P. Marks, E. T. Ryser, and A. M. Booren. 2013. Evaluating the predictive ability of a path-dependent thermal inactivation model for *Salmonella* subjected to prior sublethal heating in ground turkey, beef, and pork. *J. Food Prot.* doi:10.4315/0362-028X.JFP-12-279.

**Paper or chapter in a book**

4. Stopforth, J. D., J. N. Sofos, and F. F. Busta. 2005. Sorbic acid and sorbates, p. 49-90. In P. M. Davidson, J. N. Sofos, and A. L. Branen (ed.), *Antimicrobials in foods*, 3rd ed. CRC Taylor and Francis, Boca Raton, FL.

**Book by author(s)**

5. Pitt, J. I., and A. D. Hocking. 1997. *Fungi and food spoilage*. Blackie Academic and Professional, London.

**Book by editor(s)**

6. Doyle, M. P., and R. L. Buchanan (ed.). 2012. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, 4th ed. ASM Press, Washington, DC.

**Government/group publications**

7. U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. 2013. Detection of isolation of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) from meat products and carcass and environmental sponges. MLG 5B.04. In *Microbiology laboratory guidebook*. U.S. Department of Agriculture, Washington, DC.
8. U.S. Environmental Protection Agency. 2013. Literature review of contaminants in livestock and poultry manure and implications for water quality. Available at: <http://water.epa.gov/scitech/cec/upload/Literature-Review-of-Contaminants-in-Livestock-and-Poultry-Manure-and-Implications-for-Water-Quality.pdf>. Accessed 15 April 2014.
9. U.S. Food and Drug Administration. 2009. Prevention of *Salmonella* Enteritidis in shell eggs during production, storage, and transportation; final rule. *Fed. Regist.* 74:33029–33101.

**Patent**

10. Hussong, R. V., E. H. Marth, and D. G. Vakaleris. January 1964. Manufacture of cottage cheese. U.S. patent 3,117,870.

**Standard Methods**

11. International Organization International Organizational for Standardization, for Standardization. 2016. *Microbiology of the food chain—method validation—Part 2: Protocol for*

validation of alternative (proprietary) methods against a reference method. ISO 16140-2. International Organization for Standardization, Geneva.

#### **Publication with no identifiable author or editor**

12. Anonymous. 2001. Real decree 3-484/2000 (12 January 2001) on the hygiene of ready-to-eat foods. BOE no. 11. Boletín Oficial de Estado, Madrid.

#### **Personal communication**

13. Perrotta, N. G. 1989. Personal communication.

14. Perrotta, N. G. (University of Massachusetts). 1989. Personal communication.

#### **Electronic mail**

Email messages should include the name of the person who sent the message, the date, the subject, the sender's email address, and availability (if appropriate).

15. Notaro, J. 13 June 1994. Banned in the USA [email: jnotaro@ukans.edu]. Available from: the author at Smith@odo.msoe.edu.

16. Sofos, J. N. 3 January 2001. Personal communication [email: john.sofos@colostate.edu].

#### **Web pages**

Include author, date, title, availability information, and accession date, if needed.

17. Anonymous. 19 February 2000. Avis du Centre national de reference des Listeria de l'Institut Pasteur [press release]. Available at: <http://www.agriculture.gouv.fr/actu/doss/com190200.htm>.

18. U.S. Food and Drug Administration. 1999. Guidance for industry: reducing microbial food safety hazards for sprouted seeds. Docket no. 99D-4488. Available at: <http://vm.cfsan.gov/~dms/sprougd1.html>. Accessed 17 July 1999.

19. Wang, S. L., and G. C. L. Chu. 2001. Evaluation of modified atmosphere packaging systems for retaining freshness of Ontario's fruit and vegetables. Available at: <http://gov.on.ca/OMAFREA.../archives/researchfund/ofpdocs/fp4041.html>. Accessed 9 November 2001.

#### **Full-text articles obtained from an online source**

For journals without volume and page information, a document number may be used:

20. Harrison, C. L., P. Q. Schmidt, and J. D. Jones. 2 January 1992. Aspirin compared with acetoaminophen for relief of headache. *Online J. Therap.* [serial online]. Doc. no. 1.

For journals with volume and page information, include the same information as print journals as well as availability information and accession date:

21. Friedman, S. A. January 1988. Preeclampsia: a review of the role of prostaglandins. *Obstet. Gynecol.* [serial online] 71:22-37. Available from: BRS Information Technologies, McLean, VA. Accessed 15 December 1990.

#### **SUPPLEMENTAL MATERIAL**

Supplemental material is information that is useful to readers, but is not essential to understanding the main results of the published article. Supplemental material can be hosted on the *JFP* website for published articles beginning in 2017. These materials may include additional

figures, data sets and other tables, appendices, and additional references. One or more files may be hosted as long as they are relevant to the main article.

Supplemental material should be uploaded as part of the manuscript submission through the journal's AllenTrack Manuscript Submission System. It is preferred that supplemental figures and tables are provided in one file with each item numbered as Figure S1, Table S2, etc. Authors may choose to include figures and tables in the same file with supplemental text and/or other materials. During the process, authors should select the "Supplemental Material" paper type and appropriately title the files. The name assigned to each item should be used when citing the material within the article text.

Files will be accepted in all commonly used formats including: .docx, .pdf, .xlsx. **Supplemental material will be posted online as provided by the author.** It is the author's responsibility to put supplemental material in a final, copyedited form before submission. The authors must certify that they have the right to publish all supplementary materials and are not violating copyright or software licenses by doing so. Copyright of supplementary materials remains with the original copyright holder. All supplemental material hosted on the *JFP* website will be fully available to everyone.

Supplemental material will be assigned a supplement DOI by the publisher. The DOI of a supplement should be the DOI of the original article with .s1, .s2, etc., appended at the end. In the original article, a "Supplemental Material" section should precede the references as follows:

#### **SUPPLEMENTAL MATERIAL**

Supplemental material associated with this article can be found online at: [URL to be completed by the publisher].

#### **PREPARATION OF TABLES**

If submitting tables, the format must be XLS or DOC. In DOC files, use the Table Tools feature; do not insert as a graphic. Each table, comprising the title, body, and footnotes, must be typed double-spaced on a page separate from the text, following the Figure Legend(s) or References. Number tables in the order in which they are first cited in the text. The title is brief but fully descriptive of the information in the table. Headings and subheadings must be concise; abbreviations are used. **Use no vertical rules, no shading, no graphics, and only three full horizontal rules: under the title, under the box heads, and at the bottom of the table.** Use italic superscript letters for footnotes. Like data in columns must read down, not across. A well-organized table should be understandable without extensive reference to the text.

#### **PREPARATION OF FIGURES**

Type figure legends double-spaced in a list on a page separate from the figures. The Figure Legends section should be placed within the manuscript file following the References. Number each consecutively in the order in which they are first cited in the text. All illustrations, both line drawings and halftones (e.g., photographs), must be submitted in electronic format, preferably in separate files. Figures should not be less than 85 mm wide, should not be framed with a box, and

should not contain horizontal lines or gridlines within the figure. Figures containing multiple components (e.g., 1A, 1B, 1C, etc.) should be mounted together on the same page with appropriate labels. Place the figure number in the upper-right corner of the page. Data presented in figures must not be repeated in tables.

Figures are normally published in black and white. Figures can be printed in color, but there is an additional cost to the author. Authors wishing to publish figures in color should indicate this when submitting the manuscript. Embed fonts when using Photoshop, Illustrator, and other graphics programs. If you do not embed your fonts, and we do not have them in our library, your figure will not convert to PDF.

The preferred formats for electronic figures are TIF, EPS, JPG or PDF. The following native application file formats are also acceptable for final figures: Adobe Photoshop, Adobe Acrobat, Illustrator, Canvas, PowerPoint, Word and Excel. If you have other software, you should scan your figures and submit as TIF files. The resolution required for halftone and color images is 300 dots per inch (dpi); line is usually good at 300 dpi, but if there are fine lines and screens, figures should be scanned at 600 dpi. Please note that images that are in JPG or GIF format are normally 72 dpi and not acceptable for printing. Digital color files must be submitted in CMYK mode.

#### COMMON ABBREVIATIONS

Frequently used acceptable abbreviations are given below. For further details on abbreviations, see the current edition of the *ASM Style Manual*. Note that a period is used with some but not all abbreviations. Abbreviations of non-SI units (e.g., atm) must be followed by the corresponding converted quantity and SI unit in parentheses: 1 atm = 101.29 kPa.

ångström, Å	hour(s), h
atmosphere, atm	high-performance liquid chromatography, HPLC
base pairs, bp	international unit, IU
calorie, cal	intramuscular, i.m.
centimeter, cm	intraperitoneal, i.p.
CFU (never spelled out: colony-forming units)	intravenous, i.v.
cubic centimeter, cm <sup>3</sup>	kilocalorie, kcal
day (no abbreviation)	kilogram, kg
degrees Celsius, °C	kilometer, km
degrees Fahrenheit, °F	lethal dose, median, LD <sub>50</sub>
diameter, diam	liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS
enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA	limit of detection, LOD
equivalent weight, eq wt	liter, L
fluid ounce, fl oz	logarithm (base 10), log
Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR	logarithm (base e), ln
gram, g	lumen, lm
gravity, g	lux, lx
	matrix-assisted laser desorption/ionization

time of flight, MALDI-TOF	parts per billion, ppb
meter, m	parts per million, ppm
microequivalent, $\mu\text{eq}$	PCR (never spelled out: polymerase chain reaction)
microgram, $\mu\text{g}$	percent, %
microliter, $\mu\text{L}$	PFU (never spelled out: plaque-forming units)
micrometer, $\mu\text{m}$	pulsed-field gel electrophoresis, PFGE
micromole, $\mu\text{mol}$	real-time (quantitative) PCR, qPCR
milliequivalent, meq	reverse transcription PCR, RT-PCR
milligram, mg	revolutions per minute, rpm
milliliter, mL	second, s
millimeter, mm	species (singular), sp.
millimolar, mM	species (plural), spp.
minute(s), min	specific activity, sp act
molar, M	thin-layer chromatography, TLC
mole, mol	UV (never spelled out: ultraviolet)
most probable number, MPN	volume/volume (v/v)
nanometer, nm	weight/volume (w/v)
normal, N	weight/weight (w/w)
number, no.	whole genome sequencing, WGS
optical density (please indicate wavelength), OD	

## **POLICY ON COMMERCIALISM**

Manuscripts submitted for consideration for publication in *JFP* are not to be used as a platform for commercialism or the promotion of branded products or services. References to branded products or services, except as may be warranted by scientific merit and research data or as are necessary for the understanding evaluation and replication of the work, described are to be avoided. In general, the trade name of a product should be used only once in a manuscript and that is in the "Materials and Methods" section. In addition, evaluation of scientific merit is not possible with strict proprietary secrecy. Authors must reveal the basis for the activity or mechanism of a proprietary product so that reviewers may gauge its plausibility. The excessive use of brand names, product names, logos or trade names, failure to substantiate performance claims, and the failure to objectively discuss alternative methods, processes, products, and equipment may be considered indicators of commercialism. Disclosure and acknowledgment of both funding sources and any conflicts of interest by the authors is encouraged. Restricting commercialism benefits the authors and the audience of *JFP*. The Scientific Editor shall in his or her sole discretion, determine whether a submitted manuscript violates this policy on commercialism.

## **REVIEW PROCEDURE**

Authors of manuscripts submitted for consideration to be published in *JFP* are notified by email after the manuscripts have passed an initial quality check. Authors can monitor the status of their

papers by logging on to <https://foodprotection.allentrack.net>. Authors are responsible for their login ID and password throughout the review process. The assigned manuscript number must be included in all correspondence and on the revised manuscript for identification. Manuscripts are accepted for publication only after they have been reviewed by two or more members of the Editorial Board or by ad hoc reviewers with the requisite expertise. After review, the manuscript is returned to the author for revision in accord with suggestions made by the reviewers and the Editor. Authors can hasten publication of their papers by submitting well-written manuscripts conforming to *JFP* style and by revising and returning manuscripts promptly. If, after review of a manuscript is completed, the author chooses to withdraw rather than to revise the paper, the Scientific Editor must be notified promptly. If the author does not respond within 2 months after a reviewed paper is returned, the paper will be considered withdrawn. Authors are notified by email when a manuscript has or has not been accepted for publication. Proofs of accepted manuscripts are sent to the author for correction within 4 weeks after acceptance. They should be proofread carefully according to the instructions attached and returned within 4 days. Authors will be charged for major corrections to their proofs.

Membership in the Association is not a prerequisite for acceptance of a manuscript for publication. Non-member scientists are invited to submit papers for consideration for publication. However, authors may pay the Member rate for publications fees if at least one coauthor becomes an IAFP Member.

The Scientific Editors assume that the corresponding author has received proper clearance from his or her organization and from coauthors for review and publication of the paper. It is also assumed that the paper is not being considered for publication in any other journal or publication.

Authors are responsible for the scientific accuracy of their papers. *JFP* assumes no responsibility for errors made, including those that may be made in the copyediting process, or conclusions reached by authors.

#### **COPYRIGHT, OPEN ACCESS, AND PERMISSIONS POLICY**

IAFP holds the copyright for articles published in *JFP*, except for manuscripts submitted by the federal government as part of their duties, which is exempted from copyrighting. No part of the copyrighted publication may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopy, recording, or any information storage and retrieval system without permission from IAFP (except in limited quantities for the noncommercial purposes of scientific or educational advancement).

IAFP does not grant permission to post copyrighted journal articles on public/open access websites/repositories or in other online publications. Complimentary PDF versions of the article are provided to the authors for their personal use. Authors who wish to use their published paper in their thesis or dissertation may do so without requesting permission. Article abstracts may be posted without requesting permission as long as the article's DOI is included with the post. If you plan to electronically distribute the article, other than incidental copies for education or research use, you must request permission through the Copyright Clearance Center.

Authors have the option to pay an open access fee in lieu of the publication fees. Open access articles published in *JFP* are distributed under the CC BY-NC-ND\* license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>). This license permits noncommercial copying and distribution of articles with proper attribution, and prohibits distribution of derivative content.

Authors of all papers may deposit a PDF of their accepted manuscript in funder-mandated repositories, such as PubMed Central, for public release after a 12-month embargo. IAFP also has a 12-month embargo policy for posting a PDF of an author's accepted manuscript in password-protected organizational repositories. Permission is required for this purpose. Authors choosing the open access option may immediately post the final published PDF of their paper anywhere, with proper attribution. In all cases, the DOI must appear on the PDF.

*JFP* uses the Copyright Clearance Center at [copyright.com](http://copyright.com) for granting permission requests to reuse all or part of a published article.

#### PLAGIARISM POLICY

*JFP* does not allow any form of plagiarism. Plagiarism is considered to be a serious breach of scientific ethics by the *Journal*. Incidents of plagiarism in a manuscript or published paper whether detected or reported, will be dealt with severely in accordance with the IAFP. To view the policy, go [HERE](#).

IAFP is a member of Similarity Check, a service offered by CrossRef and powered by iThenticate software. iThenticate is a plagiarism screening service that verifies the originality of content submitted before publication. iThenticate checks submissions against millions of published research papers, and billions of Web content urls. Authors, researchers, and freelancers can also use iThenticate to screen their work before submission by visiting [www.ithenticate.com](http://www.ithenticate.com).

#### MANUSCRIPT PUBLICATION FEES

Authors will be informed of the actual cost of the manuscript publication fee shortly after acceptance. Arrangements for payment of the publication fees must be made at that time to facilitate publication online ahead of print.

<i>Journal of Food Protection</i> Fees for Publication			
<b>Publication Fees</b> Flat-rate fee based on the number of accepted manuscript pages. All manuscript components (title page, abstract, text, references, figure legend, tables and figures) are included in the page count. Payment due after acceptance.			
<b>Research Papers &amp; Notes</b>	<b>Up to 19</b>	<b>20 to 39</b>	<b>40 or more</b>
Member	\$550	\$750	Request a quote
Nonmember	\$750	\$950	Request a quote

<b><i>Journal of Food Protection</i></b>			
<b>Fees for Publication</b>			
<b>Publication Fees</b>			
Flat-rate fee based on the number of accepted manuscript pages. All manuscript components (title page, abstract, text, references, figure legend, tables and figures) are included in the page count. Payment due after acceptance.			
<b>Review &amp; General Interest</b>	<b>Up to 39</b>	<b>40 to 59</b>	<b>60 or more</b>
Member and Nonmember	\$550	\$750	Request a quote
<b>Mini-Review</b>	<b>Up to 19</b>	<b>20 to 39</b>	
Member and Nonmember	\$350	\$550	
<b>Open Access Fee, in lieu of</b>	<b>Per Article</b>		
Member	\$2,500		
Nonmember	\$3,000		
<b>Color Figure Fees</b>	<b>Per Article</b>		
Member and Nonmember	\$795		

Review or mini-review papers invited by one of the Scientific Editors are exempt from the manuscript service charge. An open access option is available for authors who would like their article available with immediate open access upon publication.

An exemption from payment of the publication fee will be made only under extenuating circumstances that must be requested by the author when the manuscript is first submitted. The author should describe the circumstances that require the exemption in the section indicated in the online submission form. Exemptions or discounts are granted at the discretion of the Scientific Editor at the time of acceptance. The author will be notified in the decision letter.

#### **REPRINTS**

Corresponding authors will be provided with a complimentary PDF of the published article by email 1 to 2 weeks prior to publication. This PDF may be forwarded to coauthors.

Authors who wish to order paper reprints should contact the IAFP Office.

After publication, individual articles published in *JFP* and its predecessor, the *Journal of Milk, Food and Technology*, from 1967 to the current issue are available online at <http://jfoodprotection.org>. Contact the Association's Order Processing Department to order earlier articles published in the *Journal of Milk and Food Technology* and its predecessor, the *Journal of Milk Technology*.

#### **CONTACT INFORMATION**

*Journal of Food Protection*®  
International Association for Food Protection

Attn: Didi Loynachan, Administrative Editor  
6200 Aurora Avenue, Suite 200W  
Des Moines, IA 50322-2864, USA  
Phone: +1 515.276.3344  
Fax: +1 515.276.8655  
Email: [dloynachan@foodprotection.org](mailto:dloynachan@foodprotection.org)

\*CC BY License is only offered if mandated

### **COMMON PROBLEMS WITH MANUSCRIPTS**

- Authors not providing all author names consistently throughout the submission and manuscript preparation processes in the correct order for publication: first name, middle name/initial, last name.
- Authors not providing a fax number on the title page of the manuscript (or indicating they do not have a fax).
- Authors not providing manufacturer names and locations (city and state; country if necessary).
- Improper subheading format—subheadings should be paragraph lead-ins, not separate from the paragraph. They should be indented, bold font and end with a period. They must not be numbered. Only one level of subheading is allowed.
- References:
  - Not numbered in correct alphabetic order, e.g., Food and Drug Administration under U.S. Food and Drug Administration, and FSIS under U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service
  - Journal titles are not abbreviated according to BIOSIS format and italicized
  - Issue numbers are not necessary for journals with continuous pagination
  - Inclusive pages are not provided for each reference
  - Not providing active URLs and access dates
  - Not verifying that all necessary references are included in reference list and are cited in the text

### **ENGLISH LANGUAGE AND COPYEDITING SERVICES**

Manuscripts submitted to scholarly journals are sometimes rejected, not on the basis of their science but because of poor readability. This is especially true of manuscripts submitted by non-native speakers of English. We encourage authors to ensure that their manuscripts are carefully edited for readability and correct use of the English language prior to submission.

There exist a number of professional language and copyediting services, some of which are listed below, that may be of assistance to you. Provision of these sources does not imply *JFP*'s endorsement of any individual or agency. Professional qualifications and compensation must be discussed directly with the editing service that you contact.

<http://www.aje.com/us/>

<http://www.proof-reading-service.com/en/journal-editing/>

<http://www.editage.com>  
<http://www.prof-editing.com/>  
<http://www.internationalscienceediting.com/>  
<http://www.asiascienceediting.com/>

## ONLINE SUBMISSION INSTRUCTIONS

### Review Process

The manuscript submission and peer review process is broken down into the following 6 steps:

1. The Author submits a manuscript.
2. The Administrative Editor assigns a Scientific Editor to the manuscript.
3. The Scientific Editor assigns 2+ Reviewers to the manuscript.
4. The Reviewers review the manuscript.
5. The Scientific Editor makes a decision to revise, accept or reject.
6. The Author is contacted by email with the decision.

### Submission Process

The manuscript submission process is broken into a series of four parts that gather detailed information about your manuscript, allow you to upload the pertinent files, and ask you to validate your manuscript submission. There are two parts for manuscript information including Files and Manuscript Information. Each part has several tabs. The parts and tabs can be completed in any order. If you begin at Files and continue through the process, clicking the "Next" button, the website will prompt you to complete each step in the submission process.

The submission process has the following parts:

1. **Files** - The first tab asks for the actual file locations on your computer (via an open file dialog). After finding all of your files, press the "Upload Files" button. Once the files are uploaded, you will list what type of file you have. Once you have chosen the file type, you can give each file a special title or description. Next you can select a file order. The file order will be used to determine the sequence of the files in the merged pdf. A merged pdf of your submission will be created so that Editors and Reviewers can download all of your manuscript files as one pdf. You will also check off the box at the bottom that says "Please check here to verify that you have completed the ordering and selection process."
2. **Manuscript Information** - A series of tabs will ask for information such as title, abstract and highlights, author contact information, key words, detailed information, required questions, and reviewer suggestions. Each question marked with an asterisk is required.
3. **Validate** - When you arrive at the validate screen, the system may ask you to answer those questions from the Files and Manuscript Information parts that are incomplete. Once you have modified them appropriately, press the "Return to Validation" button. Pressing the "Next" button will move you through each tab again. Once all of your manuscript information has been completed, the system will show you a list of pdf conversions of your manuscript files. If the pdfs are not yet ready, you can wait and return later to this screen. The files with a red arrow next to them will need to be opened and viewed. Once you have viewed the file and approve of it, check off the approve box.

After approving your files, the next step is to validate the manuscript information. Clicking "Next" at the bottom will approve this information.

4. **Submit** - Clicking the "Approve Submission" link will allow you to complete the submission process and send the manuscript to the Editorial Office for QC. If the Editorial Office asks for changes to be made to your submission, you can make the changes and complete the submission process again.

Before submitting a manuscript, please gather the following current information:

- All Authors
  - First Names, Middle Names/Initials, Last Names
  - Current Postal Addresses
  - Work Telephone Numbers
  - Current Email Addresses
  - \*\*\*As you enter each of your authors, please enter the first and last name (and/or email address) and click the "FIND PERSON" button to verify whether an account already exists for each individual. In doing this, the author's information will be inserted into this form and creation of duplicate accounts can be avoided.\*\*\*
  - Note: These addresses apply to this database ONLY. To update your IAFP membership contact information, call the IAFP office at 515.276.3344; 800.369.6337.
- Title and Running Title (you may copy and paste this from your manuscript)
- Abstract and Highlights (you may copy and paste this from your manuscript)
- Key Words
- Names, email addresses, and institutions of suggested reviewers (optional).
- A cover letter that explains how your paper is innovative, provocative, timely, and of interest to a broad audience. It should list any papers by any of the authors that have been published within the past year or that are in review or in press.
- Manuscript files in Word or RTF format. **All text lines in your manuscript (including references) must be numbered to facilitate review of your paper.**
- Tables should be included in the manuscript file following the References and Figure Legend(s) in XLS or DOC formats. Use the Table Tools feature; do not insert tables as graphics/pictures.
- Figures/Images files in TIF, EPS, PDF or JPG format (files should be no larger than what your outgoing server will allow). They should be submitted as separate files (one figure per page). **Figures containing multiple components (e.g. 1A, 1B, 1C, etc.) should be placed together on one page with appropriate labels.**
- Please place the figure number in the upper right corner of the figure.
- Figures should be submitted in black and white unless you plan to publish in color. Additional fees apply to color publication.

After the manuscript is submitted, you will be asked to select the order you would like the files to be displayed in a merged PDF file that the system will create for you. Next, you will be directed to a page that will allow you to review your converted manuscript. If the conversion is not correct, you can replace or delete your manuscript files as necessary. You may also add

additional files at this time. After you have reviewed the converted files, you will need to click on "Approve Converted Files." This link will have a red arrow ➔ next to it. Throughout the system, red arrows ➔ reflect pending action items that you should address.

### **Starting**

If you need additional help, you can click on the help signs  spread throughout the system. A help dialog will pop up with context-sensitive help.

### **Manuscript Status**

After you approve your manuscript, you are finished with the submission process. You can access the status of your manuscript at any time via:

1. Logging into the system with your password
2. Clicking on the link represented by your manuscript tracking number and abbreviated title
3. Clicking on the "Check Status" link at the bottom of the displayed page

This procedure will display detailed tracking information about where your manuscript is in the submission/peer-review process.

### **Starting**

The manuscript submission process starts by pressing the "Submit Manuscript" link on your *JFP* author "Home" page. Please make sure you have gathered all the required manuscript information listed above **BEFORE** starting the submission process.

### **Withdrawing your manuscript**

If you want to withdraw your manuscript at any point during the review process, please contact the editor, provide your manuscript number, and ask that the manuscript be withdrawn.

**Anexo II**

**Instruções para autores – Brazilian Journal of Food Technology**

Disponível em: <<http://bjft.ital.sp.gov.br/arquivos/NormaPublicacaoPortugues2018.pdf>>

## **INSTRUÇÕES AOS AUTORES**

### **NORMAS PARA SUBMISSÃO**

#### **1. CONTEÚDO E CLASSIFICAÇÃO DOS DOCUMENTOS PARA PUBLICAÇÃO**

Serão aceitos manuscritos de abrangência nacional e/ou internacional que apresentem novos conceitos ou abordagens experimentais e que não sejam apenas repositórios de dados científicos. Trabalhos que contemplam especificamente metodologias analíticas serão aceitos para publicação desde que elas sejam inovadoras ou proporcionem aperfeiçoamentos significativos de métodos já existentes. Ficarà a critério dos editores, a depender da relevância do tema, a aceitação de trabalhos que tenham resultados da análise de produtos industrializados sem informações que permitam reproduzir a sua obtenção. Não serão aceitos para publicação trabalhos que visam essencialmente à propaganda comercial.

Os documentos publicados no BJFT classificam-se nas seguintes categorias:

1.1. ARTIGOS CIENTÍFICOS ORIGINAIS: São trabalhos que relatam a metodologia, os resultados finais e as conclusões de pesquisas originais, estruturados e documentados de modo que possam ser reproduzidos com margens de erro iguais ou inferiores aos limites indicados pelo autor. O trabalho não pode ter sido previamente publicado, exceto de forma preliminar como nota científica ou resumo de congresso.

1.2. ARTIGOS DE REVISÃO: São extratos inter-relacionados da literatura disponível sobre um tema que se enquadre no escopo da revista e que contenham conclusões sobre o conhecimento disponível. Preferencialmente devem ser baseados em literatura publicada nos últimos cinco anos.

1.3 NOTAS CIENTÍFICAS: São relatos parciais de pesquisas originais que, devido à sua relevância, justificam uma publicação antecipada. Devem seguir o mesmo padrão do Artigo Científico, podendo ser, posteriormente, publicadas de forma completa como Artigo Científico.

1.4. RELATOS DE CASO: São descrições de casos, cujos resultados são tecnicamente relevantes.

1.5. RESENHAS CRÍTICA DE LIVRO: Trata-se de uma análise de um ou mais livros impressos ou online, que apresenta resumo e análise crítica do conteúdo.

1.6. COMENTÁRIOS DE ARTIGOS: Um documento cujo objeto ou foco é outro artigo ou outros artigos.

1.7. COMUNICAÇÕES RÁPIDAS: Atualização de uma pesquisa ou outros itens noticiosos.

Os manuscritos podem ser apresentados em português, inglês ou espanhol.

#### **2. ESTILO E FORMATAÇÃO**

##### **2.1. FORMATAÇÃO**

- Editor de Textos Microsoft WORD 2010 ou superior, não protegido.
- Fonte Arial 12, espaçamento duplo entre linhas. Não formate o texto em múltiplas colunas.
- Página formato A4 (210 x 297 mm), margens de 2 cm.
- Todas as linhas e páginas do manuscrito deverão ser numeradas sequencialmente.

Normas para Publicação – Revisão 05 de 01/06/2018

- A itemização de seções e subseções não deve exceder 3 níveis.
- O número de páginas, incluindo Figuras e Tabelas no texto, não deverá ser superior a 20 para Artigos Científicos Originais e de Revisão e a 9 para os demais tipos de documento. Sugerimos que a apresentação e discussão dos resultados seja a mais concisa possível.
- Use frases curtas.

2.2. UNIDADES DE MEDIDAS: Deve ser utilizado o Sistema Internacional de Unidades (SI) e a temperatura deve ser expressa em graus Celsius.

2.3. TABELAS E FIGURAS: Devem ser numeradas em algarismos arábicos na ordem em que são mencionadas no texto. Seus títulos devem estar imediatamente acima das Tabelas e imediatamente abaixo das Figuras e não devem conter unidades. As unidades devem estar, entre parênteses, dentro das Tabelas e nas Figuras. Fotografias devem ser designadas como Figuras. A localização das Tabelas e Figuras no texto deve estar identificada.

As TABELAS devem ser editadas utilizando os recursos próprios do editor de textos WORD para este fim, usando apenas linhas horizontais. Devem ser autoexplicativas e de fácil leitura e compreensão. Notas de rodapé devem ser indicadas por letras minúsculas sobscritas. Demarcar primeiramente as colunas e depois as linhas e seguir esta mesma sequência para as notas de rodapé.

As FIGURAS devem ser utilizadas, de preferência, para destacar os resultados mais expressivos. Não devem repetir informações contidas em Tabelas. Devem ser apresentadas de forma a permitir uma clara visualização e interpretação do seu conteúdo. As legendas devem ser curtas, autoexplicativas e sem bordas. As Figuras (gráficos e fotos) **devem ser coloridas e em alta definição (300 dpi)**, para que sejam facilmente interpretadas. As fotos devem estar na forma de arquivo JPG ou TIF. As Figuras devem ser enviadas (File upload) em arquivos individuais, **separadas do texto principal**, na submissão do manuscrito. Estes arquivos individuais devem ser nomeados de acordo com o número da figura. Ex.: Fig1.jpg, Fig2.tif etc.

2.4. EQUAÇÕES: As equações devem aparecer em formato editável e apenas no texto, ou seja, não devem ser apresentadas como figura nem devem ser enviadas em arquivo separado.

Recomendamos o uso do MathType ou Editor de Equações, tipo MS Word, para apresentação de equações no texto. Não misture as ferramentas MathType e Editor de Equações na mesma equação, nem tampouco misture estes recursos com inserir símbolos. Também não use MathType ou Editor de Equações para apresentar no texto do manuscrito variáveis simples (ex.,  $a=b^2+c^2$ ), letras gregas e símbolos (ex.,  $\alpha$ ,  $\infty$ ,  $\Delta$ ) ou operações matemáticas (ex.,  $x$ ,  $\pm$ ,  $\geq$ ). Na edição do texto do manuscrito, sempre que possível, use a ferramenta "inserir símbolos".

Devem ser citadas no texto e numeradas em ordem sequencial e crescente, em algarismos arábicos entre parênteses, próximo à margem direita.

2.5. ABREVIATURAS e SIGLAS: As abreviaturas e siglas, quando estritamente necessárias, devem ser definidas na primeira vez em que forem mencionadas. Não use abreviaturas e siglas não padronizadas, a menos que apareçam mais de 3 vezes no texto. As abreviaturas e siglas não devem aparecer no Título, nem, se possível, no Resumo e Palavras-chave.

2.6 NOMENCALTURA:

Reagentes e ingredientes: preferencialmente use o nome internacional não-proprietário (INN), ou seja, o nome genérico oficial.

Nomes de espécies: utilize o nome completo do gênero e espécie, em itálico, no título (se for o caso) e no manuscrito, na primeira menção. Posteriormente, a primeira letra do gênero seguida do nome completo da espécie pode ser usado.

### 3. ESTRUTURA DO ARTIGO

**PÁGINA DE ROSTO:** título, título abreviado, autores/filiação (deverá ser submetido como *Title Page*)

3.1. **TÍTULO:** Deve ser claro, conciso e representativo do assunto tratado. Deve ser escrito em caixa alta e não exceder 150 caracteres, incluindo espaços. O manuscrito em português ou espanhol deve também apresentar o Título em inglês e o manuscrito em inglês deve incluir também o Título em português.

3.2. **TÍTULO ABREVIADO (RUNNING HEAD):** Deve ser escrito em caixa alta e não exceder 50 caracteres, incluindo espaços.

3.3. **AUTORES/FILIAÇÃO:** São considerados autores aqueles com efetiva contribuição intelectual e científica para a realização do trabalho, participando de sua concepção, execução, análise, interpretação ou redação dos resultados, aprovando seu conteúdo final. Havendo interesse dos autores, os demais colaboradores, como, por exemplo, fornecedores de insumos e amostras, aqueles que ajudaram a obter recursos e infraestrutura e patrocinadores, devem ser citados na seção de agradecimentos. O autor de correspondência é responsável pelo trabalho perante a Revista e, deve informar a contribuição de cada coautor para o desenvolvimento do estudo apresentado.

Devem ser fornecidos os nomes completos e por extenso dos autores, seguidos de sua filiação completa (Instituição/Departamento, cidade, estado, país) e endereço eletrônico (e-mail). O autor para correspondência deverá ter seu nome indicado e apresentar endereço completo para postagem.

Para o autor de correspondência:

*Nome completo (\*autor correspondência)*

*Instituição/Departamento (Nome completo da Instituição de filiação quando foi realizada a pesquisa)*

*Endereço postal completo (Logradouro/ CEP / Cidade / Estado / País)*

*Telefone*

*e-mail (não utilizar os provedores **hotmail** e **uol** no cadastro do autor de correspondência, pois o sistema de submissão online ScholarOne, utilizado pela revista, não confirma a solicitação de envio de e-mail feita por estes provedores)*

Para co-autores:

*Nome completo*

*Instituição/Departamento (Filiação quando realizada a pesquisa)*

*Endereço (Cidade / Estado / País)*

*e-mail*

**DOCUMENTO PRINCIPAL:** título, resumo, palavras-chave, texto do artigo com a identificação de figuras e tabelas

3.4. **RESUMO:** Deve incluir objetivo(s) ou hipótese da pesquisa, material e métodos (somente informação essencial para a compreensão de como os resultados foram obtidos), resultados mais significativos e conclusões do trabalho, contendo no máximo 2.000 caracteres (incluindo espaços). Não usar abreviaturas e siglas. Os artigos em português ou espanhol devem também apresentar Resumo em inglês e os artigos em inglês devem incluir também o Resumo em português.

3.5. **PALAVRAS-CHAVE:** Devem ser incluídas no mínimo 2, logo após o Resumo e Summary, até no máximo 6 palavras indicativas do conteúdo do trabalho, que possibilitem a sua recuperação em buscas bibliográficas. Evitar termos que apareçam no título. Os artigos em português ou espanhol devem também apresentar as Palavras-chave em inglês e os artigos em inglês devem incluir também as Palavras-chave em português.

3.6. **INTRODUÇÃO:** Deve reunir informações para uma definição clara da problemática estudada, fazendo referências à bibliografia atual, preferencialmente de periódicos indexados, e da hipótese/objetivo do trabalho, de maneira que permita situar o leitor e justificar a publicação do trabalho. Visando à valorização da Revista, sugere-se, sempre que pertinente, a citação de artigos publicados no BJFT.

3.7. **MATERIAL E MÉTODOS:** Deve possibilitar a reprodução do trabalho realizado. A metodologia empregada deve ser descrita em detalhes apenas quando se tratar de desenvolvimento ou modificação de método. Neste último caso, deve destacar a modificação efetuada. Todos os métodos devem ser bibliograficamente referenciados ou descritos.

3.8. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Os resultados devem ser apresentados e interpretados dando ênfase aos pontos importantes que deverão ser discutidos com base nos conhecimentos atuais. Deve-se evitar a duplicidade de apresentação de resultados em Tabelas e Figuras. Sempre que possível, os resultados devem ser analisados estatisticamente.

3.9. **CONCLUSÕES:** Neste item deve ser apresentada a essência da discussão dos resultados, com a qual se comprova, ou não, a hipótese do trabalho ou se ressalta a importância ou contribuição dos resultados para o avanço do conhecimento. Este item não deve ser confundido com o Resumo, nem ser um resumo da Discussão.

3.10. **AGRADECIMENTOS:** Deve ser feita a **identificação completa da agência de fomento**, constando seu nome, país e nº do projeto. Outros agradecimentos a pessoas ou instituições são opcionais.

### 3.11. REFERÊNCIAS:

#### 3.11.1 Citações no Texto

**Citação direta:** Transcrição textual de parte da obra do autor consultado (Especificar no texto a(s) página(s), volume(s), tomo(s) ou seção(ões) da fonte consultada).

**Citação indireta:** Texto baseado na obra do autor consultado (Indicar apenas a data).

Nas citações bibliográficas no texto (baseadas na norma ABNT NBR 10520: 2002), as chamadas pelo sobrenome do autor, pela instituição responsável ou título incluído na sentença devem ser em letras maiúsculas e minúsculas e, quando estiverem entre parênteses, devem ser em letras maiúsculas (caixa alta).

Exemplos:

Guerrero e Alzamorra (1998) obtiveram bom ajuste do modelo.

Esses resultados estão de acordo com os verificados para outros produtos (CAMARGO; RASERAS, 2006; LEE; STORN, 2001).

(COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPÉIAS, 1992, p. 34)

(ANTEPROJETO..., 1987, p. 55).

As citações de diversos documentos de um mesmo autor, publicados num mesmo ano, são distinguidas pelo acréscimo de letras minúsculas, em ordem alfabética, após a data e sem espaçamento, conforme a lista de referências.

Exemplos:

De acordo com Reeside (1927a)

(REESIDE, 1927b)

Para citação de citação deve-se utilizar a expressão “apud” (citado por, conforme, segundo) após o ano de publicação da referência, seguida da indicação da fonte secundária efetivamente consultada.

Exemplos:

No texto:

“[...] o viés organicista da burocracia estatal e o antiliberalismo da cultura política de 1937, preservado de modo encapuçado na Carta de 1946.” (VIANNA, 1986, p. 172 apud SEGATTO, 1995).

Sobre esse assunto, são esclarecedoras as palavras de Silva (1986 apud CARNEIRO, 1981).

### 3.11.2 Referências

A lista de referências deve seguir o estabelecido pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), Norma: NBR 6023, de agosto de 2002, na seguinte forma:

- As referências são alinhadas somente à margem esquerda do texto e de forma a se identificar individualmente cada documento, em espaço simples e separadas entre si por espaço duplo.
- O recurso tipográfico (**negrito, grifo ou itálico**) utilizado para destacar o elemento título deve ser uniforme em todas as referências de um mesmo documento.
- Citar o nome de todos os autores nas Referências, ou seja, não deve ser usada a expressão “et al.”

- *Monografias (Livros, manuais e folhetos como um todo)*

Sobrenome e iniciais dos prenomes do autor (nomes de mais de 1 autor devem ser separados por ponto e vírgula). **Título** (em negrito): subtítulo. Edição (n. ed.), Local de Publicação: Editora, data de publicação. Número de páginas.

Exemplos:

*Impressos:*

EVANGELISTA, J. **Tecnologia de alimentos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 680 p.

HOROWITZ, W. (Ed.). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 18th ed., 3<sup>rd</sup> rev. Gaithersburg, Maryland: AOAC, 2010. 1 v.

PERFIL da administração pública paulista. 6. ed. São Paulo: FUNDAP, 1994. 317 p.

*Eletrônicos:*

Normas para Publicação – Revisão 05 de 01/06/2018

SZEMPLENSKI, T. **Aseptic packaging in the United State**. 2008. Disponível em: <<http://www.packstrat.com>>. Acesso em: 19 maio 2008.

- *Parte de monografias (Capítulos de livros, volume, fragmento, parte)*

AUTOR DO CAPÍTULO. Título do capítulo. In: AUTOR DO LIVRO. **Título do livro** (em negrito). Edição. Local de publicação (cidade): Editora, data. capítulo, página inicial-final da parte.

Exemplo:

*Impressos:*

ZIEGLER, G. Product design and shelf-life issues: oil migration and fat bloom. In: TALBOT, G. (Ed.). **Science and technology of enrobed and filled chocolate, confectionery and bakery products**. Boca Raton: CRC Press, 2009. Chapter 10, p. 185-210.

*Eletrônicos:*

TAMPAS de elastômeros: testes funcionais. In: AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopéia Brasileira**. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010. cap. 6, p. 294-299. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd\\_farmacopeia/pdf/volume1%2020110216.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume1%2020110216.pdf)>. Acesso em: 22 mar. 2012.

- *Teses, dissertações e trabalhos de conclusão de curso*

AUTOR. **Título** (em negrito). Ano de defesa. Número de folhas. Categoria (Grau e área) - Unidade da Instituição, Instituição, Cidade, Data de publicação.

Exemplo:

CARDOSO, C. F. **Avaliação do sistema asséptico para leite longa vida em embalagem flexível institucional do tipo Bag-in-box**. 2011. 160 f. Dissertação (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

- *Publicação periódica (Artigos de periódicos)*

AUTOR DO ARTIGO. Título do artigo. **Título do Periódico** (por extenso e negrito), Local de publicação (cidade), volume, número, páginas inicial-final, ano de publicação.

Exemplo:

*Impressos:*

KOMITOPOULOU, Evangelia; GIBBS, Paul A. The use of food preservatives and preservation. **International Food Hygiene**, East Yorkshire, v. 22, n. 3, p. 23-25, 2011.

*Eletrônicos:*

INVIOLÁVEL e renovável. **EmbalagemMarca**, São Paulo, v. 14, n. 162, p. 26, fev. 2013. Disponível em: <<http://issuu.com/embalagemmarca/docs/em162/26>>. Acesso em: 20 maio 2014.

- *Trabalho apresentado em evento*

Normas para Publicação – Revisão 05 de 01/06/2018

AUTOR. Título do trabalho apresentado, seguido da expressão In: NOME DO EVENTO, numeração do evento (se houver), ano e local (cidade) de realização. **Título do documento (anais, proceedings, atas, tópico temático, etc.)**, local: editora, data de publicação. Página inicial e final da parte referenciada.

Exemplos:

*Impressos*

ALMEIDA, G. C. Seleção classificação e embalagem de olerícolas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE PÓS-COLHEITA, 2., 2007, Viçosa. **Anais...** Viçosa: UFV, 2007. p. 73-78.

IUFOST INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CHEMICAL CHANGES DURING FOOD PROCESSING, 1984, Valencia. **Proceedings...** Valencia: Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, 1984.

*Eletrônicos*

MARTARELLO, V. D. Balanço hídrico e consumo de água de laranjeiras. In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 5., 2011, Campinas. **Anais...** Campinas: IAC; ITAL, 2011. 1 CD-ROM.

LUIZ, M. R.; AMORIN, J. A. N.; OLIVEIRA, R. Bomba de calor para desumificação e aquecimento do ar de secagem. In: CONGRESSO IBEROAMERICANO DE ENGENHARIA MECÂNICA, 8., 2007, Cusco. **Anais eletrônicos...** Cusco: PUCP, 2007. Disponível em: <<http://congreso.pucp.edu.pe/cibim8/pdf/06/06-23.pdf>>. Acesso em: 28 out. 2011.

- *Normas técnicas*

ÓRGÃO NORMALIZADOR. **Número da norma** (em negrito): título da norma. Local (cidade), ano, nº de páginas.

Exemplos:

ASTM INTERNATIONAL. **D 5047-09**: standard specification for polyethylene terephthalate film and sheeting. Philadelphia, 2009. 3 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15963**: alumínio e suas ligas - chapa lavrada para piso - requisitos. Rio de Janeiro, 2011. 12 p.

- *Legislação (Portarias, decretos, resoluções, leis)*

Jurisdição (ou cabeçalho da entidade, no caso de se tratar de normas), título, numeração, data e dados da publicação.

Exemplos:

*Impressos*

BRASIL. Medida provisória no 1.569-9, de 11 de dezembro de 1997. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 14 dez. 1997. Seção 1, p. 29514.

*Eletrônicos*

COMISSÃO EUROPÉIA. Regulamento (UE) n. 202/2014, de 03 de março de 2014. Altera o Regulamento (UE) n. 10/2011 relativo aos materiais e objetos de matéria plástica destinados a entrar em contacto com os alimentos. **Jornal Oficial da União Europeia**, Bruxelas, L 62, 04 abr.

Normas para Publicação – Revisão 05 de 01/06/2018

2014. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2014:062:0013:0015:PT:PDF>>. Acesso em: 21 mar. 2014.

#### 4. PROCESSO DE AVALIAÇÃO

O manuscrito submetido à publicação no BJFT é avaliado previamente por um Editor e, dependendo da qualidade geral do trabalho, nesta etapa pode ser rejeitado ou retornar aos autores para adequações ou seguir para revisão por dois Revisores *ad hoc*. Todo o processo de revisão por pares é anônimo (*double blind review*). Os pareceres dos revisores são enviados para o Editor Associado, que emite um parecer para qualificar a pertinência de publicação do manuscrito. Caso haja discordância entre os pareceres, outros Revisores poderão ser consultados. Quando há possibilidade de publicação, os pareceres dos revisores e do Editor Associado são encaminhados aos Autores, para que verifiquem as recomendações e procedam às modificações pertinentes. As modificações feitas pelos autores devem ser destacadas no texto em cor diferente. Não há limite para o número de revisões, sendo este um processo iterativo cuja duração depende da agilidade dos Revisores e do Editor em emitir pareceres e dos Autores em retornar o artigo revisado. No final do processo de avaliação, cabe ao Editor Chefe a decisão final de aprovar ou rejeitar a publicação do manuscrito, subsidiado pela recomendação do Editor Associado e pelos pareceres dos revisores. Este sistema de avaliação por pares é o mecanismo de auto regulação adotado pela Revista para atestar a credibilidade das pesquisas a serem publicadas.

Quando o trabalho apresentar resultados de pesquisa envolvendo a participação de seres humanos, em conformidade a Resolução nº 466 de 12 de outubro de 2012, publicada em 2013 pelo Conselho Nacional de Saúde, informar o número do processo de aprovação do projeto por um Comitê de Ética em Pesquisa.

A avaliação prévia realizada pelos Editores considera: Atendimento ao escopo e às normas e da revista; Relevância do estudo; Abrangência do enfoque; Adequação e reprodutibilidade da metodologia; Adequação e atualidade das referências bibliográficas e Qualidade da redação.

A avaliação posterior por Revisores e Editores/Conselheiros considera originalidade, qualidade científica, relevância, os aspectos técnicos do manuscrito, incluindo adequação do título e a qualidade do Resumo/Summary, da Introdução, da Metodologia, da Discussão e das Conclusões e clareza e objetividade do texto.

#### Submissão de manuscritos

A submissão do artigo deve ser online, pelo sistema ScholarOne, acessando no link: <https://mc04.manuscriptcentral.com/bjft-scielo>

Caso não seja usuário do ScholarOne, crie uma conta no sistema via **Create an Account** na tela de **Log in**. Ao criar a conta, atente para os campos marcados com \*req.\* pois são obrigatórios. Caso já seja usuário mas esqueceu a senha, utilize o **Reset Password** na mesma tela.

Caso tenha dúvidas na utilização do sistema use o tutorial (**Resources** - User Tutorials) abaixo do **Log in**. Caso necessite de ajuda use o **Help** no cabeçalho da página, à extrema direita superior.

Durante a submissão, **não usar o botão back do navegador**.

Uma carta de apresentação (**cover letter**) do manuscrito deve ser submetida online via ScholarOne, descrevendo a hipótese/mensagem principal do trabalho, o que apresenta de inédito, a importância da sua contribuição para a área em que se enquadra e sua adequabilidade para a revista Brazilian Journal of Food Technology.

Normas para Publicação – Revisão 05 de 01/06/2018

O **Termo de Responsabilidade** ([http://bjft.ital.sp.gov.br/instrucao\\_autores.php](http://bjft.ital.sp.gov.br/instrucao_autores.php)) deve ser submetido online via ScholarOne, juntamente com os demais arquivos, no item *File upload*, como “**Supplemental file NOT for Review**”. Caso não seja possível reunir as assinaturas de todos os autores em um só Termo, cada autor pode enviar seu Termo de Responsabilidade devidamente preenchido e assinado para a Secretaria da Revista ([bjftsec@ital.sp.gov.br](mailto:bjftsec@ital.sp.gov.br)). Vale ressaltar que a submissão não será considerada finalizada, caso algum dos autores não envie o Termo de Responsabilidade.

### **Anexo III**

#### **Instruções para autores – Ciência Animal Brasileira**

Disponível em: <<https://www.revistas.ufg.br/vet/about/submissions#authorGuidelines>>

**Ciência animal brasileira – ISSN: 1809-6891**

**Diretrizes para Autores**

Os trabalhos podem ser redigidos em português ou inglês, mas artigos submetidos a partir de 2018 deverão ser publicados em inglês, com a revisão e/ou tradução correndo por conta dos autores, devendo ser feita em empresas com emissão de certificado. A revista tem uma lista de empresas preferenciais sugeridas, publicada nas diretrizes que os autores devem observar e checar para a submissão do artigo.

Os nomes dos autores, bem como a filiação institucional de cada um dos mesmos, devem ser inseridos nos campos adequados a serem preenchidos durante a submissão e não devem aparecer no arquivo. Ciência Animal Brasileira sugere que o número máximo de autores por artigo seja 6 (seis). Artigos com número superior a 6 (seis) serão considerados exceções e avaliados pelo Conselho Editorial e, se necessário, solicitada a correção como condição para publicação. Sugere-se um número máximo de 20 páginas e as figuras, gráficos e tabelas devem ser colocados no corpo do texto onde forem citados. É importante ressaltar que pesquisas feitas com animais devem citar a aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisas com Animais da instituição onde o trabalho foi realizado. A falta dessa aprovação impede a publicação do artigo.

Atualmente a revista não solicita nenhum pagamento financeiro pela submissão ou publicação do artigo, mas se reserva o direito de alterar essa política em circunstâncias futuras, mediante aviso prévio a todos os usuários.

Os textos devem ser organizados da seguinte forma:

Para submissões em português:

**Título em português:** Fonte Times New Roman 14, caixa alta, centrado, negrito;

**Resumo:** Fonte Times New Roman 12, espaço 1, justificado, com um máximo de 200 palavras;

**Palavras-chave:** idem, e no máximo 5 palavras chave;

**Título em inglês** (obrigatório): Fonte Times New Roman 12, caixa alta, centrado;

**Abstract** (obrigatório): Fonte Times New Roman 12, espaço 1, justificado;

**Keywords:** idem

**Introdução:** Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

**Material e Métodos:** Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

**Resultados:** Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

**Discussão:** Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5 (Os tópicos Resultados e Discussão podem ser apresentados juntos dependendo das especificidades da área);

**Conclusões:** Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

**Agradecimentos:** (opcional) Fonte Times new Roman 12, justificado, espaçamento 1,5;

**Referências** (e não bibliografia): Usar fonte Times New Roman 11, espaço 1 entre linhas e colocar espaço 6 pontos acima e abaixo do parágrafo. As referências devem ser numeradas na ordem em que aparecem no texto. A lista completa de referências, no final do artigo, devem estar de acordo com o estilo Vancouver (norma completa <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>; norma resumida [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)).

Para as submissões em língua inglesa, a tipografia e espaçamentos são os mesmos, na seguinte sequência:

**Título em inglês (Title);**

**Abstract;**

**Keywords;**

**Título em português (obrigatório);**

**Resumo em português (obrigatório);**

**Palavras-chave;**

**Introduction;**

**Material and Methods;**

**Results and Discussion;**

**Conclusions;**

**Acknowledgments (opcional),**

**References**

Artigos do tipo **Nota Científica, Relato de Caso e similares** não estão sendo aceitos para submissão. **Artigos de Revisão de Literatura** somente serão publicados quando solicitados por convite do Conselho Editorial.

As referências a partir de resumos simples ou expandidos e trabalhos completos em anais de eventos são, em muitas ocasiões, de difícil recuperação. Por essa razão, solicitamos que esse tipo de fonte **não** seja utilizada como referência.

Com relação às teses, dissertações e monografias, solicitamos que sejam utilizados apenas documentos dos **últimos três anos** e quando não houver o respectivo artigo científico publicado em periódico. Esse tipo de referência deve, obrigatoriamente, **apresentar o link** que remeta ao cadastro nacional de teses da CAPES e os bancos locais das universidades que publicam esses documentos no formato .pdf.

Solicita-se, também, priorizar referências de periódicos e não de livros-texto.

O editor científico pode solicitar mais informações em relação às referências no momento de editoração do artigo. Seu pronto atendimento agilizará a sua publicação. O processo de resgate fácil das informações é o ponto principal de uma referencição bibliográfica, técnica ou eletrônica.

### **Exemplos de referências**

#### *Trabalho em Periódicos:*

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7282/#A32362>)

Kalavathy R, Abdullah N, Jalaludin S, Ho YW. Effects of Lactobacillus cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens. British Poultry Science. 2003;44(1):139-144.

#### *Trabalho em Periódicos Online:*

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7281/#A55587>)

Gueiros VA, Borges APB, Silva JCP, Duarte TS, Franco KL. Utilização do adesivo Metil-2-Cianoacrilato e fio de náilon na reparação de feridas cutâneas de cães e gatos [Utilization of the methyl-2-cyanoacrylate adhesive and the nylon suture in surgical skin wounds of dogs and cats]. Ciência Rural [Internet]. 2001 Apr [cited 2008 Oct 10];31(2):285-289. Available

from: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782001000200015](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782001000200015). Portuguese.

*Livro Inteiro:*

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7271/#A34171>)

Reis JC. Estatística aplicada à pesquisa em ciência veterinária. 1st ed. Olinda: Luci Artes Gráficas; 2003. 651p. Portuguese.

*Capítulo de Livro:*

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7271/#A34915>)

Pascoe PJ. Cuidados pós-operatórios do paciente. In: Slatter D. Manual de cirurgia de pequenos animais. 2nd ed. São Paulo: Manole; 1998. p. 287-299. Portuguese.

*Legislação:*

Os modelos aqui foram adaptados porque a normalização proposta no Estilo Vancouver não corresponde à realidade brasileira.

Brasil. Constituição 1988. Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília, DF: Senado; 1988. Portuguese.

Brasil. Ministério da Educação e Ministério da Saúde. Portaria interministerial no. 1000 de 15 de abril de 2004. Resolvem certificar como Hospital de Ensino das Instituições Hospitalares que servirem de campo para a prática de atividades curriculares na área da saúde, sejam Hospitais Gerais e, ou Especializados. Diário Oficial da União. 2004 Abr 16; Seção 1. Portuguese.

*Programas de Computador:*

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7244/>)

SAS Institute. Statistical Analysis System: user guide [CD-ROM]. Version 8. Cary (NC): SAS Insitute Inc., 2002.

Websites:

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7274/#A59404>)

Silva MET, Flemming S, Martinez JL, Thomazini PL. Rendimento de carcaça de búfalos (*bubalus bubalis* L.) confinados em terminação, com dietas contendo diferentes relações de volumoso e concentrado. 2 - Características Quantitativas [Internet]. Brasília: Associação Brasileira de Zootecnia; 2010 Oct 8 [cited 2013 Jun 27]. Available from: <http://www.abz.org.br/publicacoes-tecnicas/anais-zootec/artigos-cientificos/reproducao-melhoramento-anim/23861-Rendimento-carcaa-bfalos-bubalus-bubalis-confinados-terminao-com-dietas-contendo-diferentes-relaes-volumoso-concentrado---Caractersticas-Quantitativas.html>. Portuguese.

Solicita-se que o número DOI, ou o link correspondente, dos artigos assim identificados seja acrescentado ao final da referência.

Ribeiro Carina Teixeira, De Souza Diogo Benchimol, Medeiros Jr. Jorge Luiz, Costa Waldemar Silva, Pereira-Sampaio Marco Aurélio, Sampaio Francisco José Barcellos. Pneumoperitoneum induces morphological alterations in the rat testicle. Acta Cir. Bras. [periódico na Internet]. 2013 Jun [citado 2013 Jun 27]; 28(6): 419-422. Disponível em:<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502013000600003>.

Exemplo de citação

Reports of *L. similis* lesion are scarce in the literature. Histopathological studies with three *Loxosceles* species of clinical importance, *L. intermedia*, *L. laeta* and *L. reclusa*, showed that the venom induces vasodilation, edema, inflammatory infiltrate (mainly neutrophilic), hemorrhage, cutaneous muscle necrosis, thrombosis and arteriolar walls degeneration<sup>(6, 13-15)</sup>. It is necessary to elucidate whether the histological lesion induced by the *Loxosceles similis* venom is similar to that observed in other species of medical importance. Furthermore, it is important to determine the pathogenesis of the loxoscelic dermonecrotic lesion(...)

According to Zanetti et al.<sup>(17)</sup> and Nowatzki et al.<sup>(18)</sup> who studied the action of the *L. intermedia* venom in vitro on endothelial cells, it was observed that 18 hours after the venom action, cells showed plasmatic membrane convolutions and chromatin condensation.

6. Futrell J. Loxoscelism. Am J Med Sci. 1992;304(4):261-7.

13. Smith WC, Micks WD. The role of polimorphonuclear leukocytes in the lesion caused by the venom of the brown spider (*Loxosceles reclusa*). Lab Invest. 1970;22:90-3.

14. Strain GM, Snider TG, Tedford BL, Cohn GH. Hyperbaric oxygen effects on brown recluse spider (*Loxosceles reclusa*) envenomation in rabbits. Toxicon. 1991;29(8):989-96.

15. Ospedal KZ, Appel MH, Neto JF, Mangili OC, Sanches Veiga S, Gremski W. Histopathological findings in rabbits after experimental acute exposure to the *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom. Int J Exp Pathol. 2002;83(6):287-94.

17. Zanetti VC, da Silveira RB, Dreyfuss JL, Haoach J, Mangili OC, Veiga SS, et al. Morphological and biochemical evidence of blood vessel damage and fibrinogenolysis triggered by brown spider venom. Blood Coagul Fibrinolysis. 2002;13(2):135-48.

18. Nowatzki J, de Sene RV, Paludo KS, Veiga SS, Oliver C, Jamur MC, et al. Brown spider venom toxins interact with cell surface and are endocytosed by rabbit endothelial cells. Toxicon. 2010;56(4):535-43

#### **Declaração de Direito Autoral**

Autores que publicam nesta revista concordam com os seguintes termos:

a. Autores mantêm os direitos autorais e concedem à revista o direito de primeira publicação, com o trabalho simultaneamente licenciado sob a [Licença Creative Commons Attribution](#) que permite o compartilhamento do trabalho com reconhecimento da autoria e publicação inicial nesta revista.

b. Autores têm autorização para assumir contratos adicionais separadamente, para distribuição não-exclusiva da versão do trabalho publicada nesta

revista (ex.: publicar em repositório institucional ou como capítulo de livro), com reconhecimento de autoria e publicação inicial nesta revista.

c. Autores têm permissão e são estimulados a publicar e distribuir seu trabalho online (ex.: em repositórios institucionais ou na sua página pessoal) a qualquer ponto antes ou durante o processo editorial, já que isso pode gerar alterações produtivas, bem como aumentar o impacto e a citação do trabalho publicado (Veja [O Efeito do Acesso Livre](#)).

### **Política de Privacidade**

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou à terceiros.