



Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS
Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição - PPGAN

FABIANA MONTOVANELE DE MELO

**CARACTERIZAÇÃO DO RESISTOMA DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS,
PRINCIPALMENTE DA ORDEM ENTEROBACTERALES, DE AMOSTRAS DE
QUEIJOS PROVENIENTES DE UM HOSPITAL PÚBLICO DA CIDADE DO RIO DE
JANEIRO, BRASIL**

**BACTERIAL RESISTOME GRAM-NEGATIVES, MAINLY OF THE ORDER
ENTEROBACTERALES, FROM CHEESE SAMPLES COMING FROM A PUBLIC
HOSPITAL IN THE CITY FROM RIO DE JANEIRO, BRAZIL**

RIO DE JANEIRO

2024

FABIANA MONTOVANELE DE MELO

**CARACTERIZAÇÃO DO RESISTOMA DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS,
PRINCIPALMENTE DA ORDEM ENTEROBACTERALES, DE AMOSTRAS DE
QUEIJOS PROVENIENTES DE UM HOSPITAL PÚBLICO DA CIDADE DO RIO DE
JANEIRO, BRASIL**

**BACTERIAL RESISTOME GRAM-NEGATIVES, MAINLY OF THE ORDER
ENTEROBACTERALES, FROM CHEESE SAMPLES COMING FROM A PUBLIC
HOSPITAL IN THE CITY FROM RIO DE JANEIRO, BRAZIL**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientador(a): Prof. Dr. Victor Augustus Marin

RIO DE JANEIRO

2024

Catálogo informatizada pelo(a) autor(a)

M528 Melo, Fabiana Montovanele de
 CARACTERIZAÇÃO DO RESISTOMA DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS,
PRINCIPALMENTE DA ORDEM ENTEROBACTERALES, DE AMOSTRAS DE
QUEIJOS PROVENIENTES DE UM HOSPITAL PÚBLICO DA CIDADE DO
RIO DE JANEIRO, BRASIL / Fabiana Montovanele de Melo. --
Rio de Janeiro, 2024.
 144

 Orientador: Victor Augustus Marin .
 Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Estado do
Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Alimentos e
Nutrição, 2024.

 1. Alimento seguro. 2. Infecções bacteriana. 3.
Resistência antimicrobiana. I. Augustus Marin , Victor ,
orient. II. Título.

Fabiana Montovanele de Melo

CARACTERIZAÇÃO DO RESISTOMA DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS,
PRINCIPALMENTE DA ORDEM ENTEROBACTERALES, DE AMOSTRAS DE
QUEIJOS PROVENIENTES DE UM HOSPITAL PÚBLICO DA CIDADE DO RIO DE
JANEIRO, BRASIL

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da
Universidade Federal de Universidade Federal
do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovado em: 25/03/2024

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 Victor Augustus Marin
Data: 03/05/2024 15:50:42-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Presidente da banca: Prof. Dr. Victor Augustus Marin (PPGAN / UNIRIO)

Documento assinado digitalmente
 ALINE DOS SANTOS GARCIA GOMES
Data: 15/05/2024 16:56:28-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. Aline dos Santos Garcia Gomes (IFRJ)

Documento assinado digitalmente
 BARBARA CRISTINA EUZEBIO PEREIRA DIAS DE
Data: 09/05/2024 14:35:52-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. Bárbara Cristina Euzebio Pereira Dias de Oliveira (IFRJ)

Documento assinado digitalmente
 ROBERTA FONTANIVE MIYAHIRA
Data: 07/05/2024 13:27:36-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. Roberta Fontanive Miyahira (UERJ)

Documento assinado digitalmente
 THAIS SOUZA SILVEIRA MAJEROWICZ
Data: 02/05/2024 22:49:12-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. Thais Souza Silveira Majerowicz (IFRJ)

Dedico este trabalho ao meu esposo Mauro
e ao meu filho Henrique, pelo fiel
amor e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Gratidão a Deus, por me guiar nesse momento tão difícil, e ter me ajudado a seguir em frente. Sem a vontade d'Ele nada seria possível.

Ao meu amado companheiro e amigo Mauro por todo o apoio, paciência e incentivo ao combate de cada batalha da minha vida pela busca dos meus objetivos. Podemos dizer juntos...não é fácil, mas venceremos!

Ao meu amado filho kike que mesmo tão pequeno, soube compreender minha ausência e me apoiar, me dando seu boneco do homem-aranha para não ficar sozinha nas horas de estudo.

Aos meus amados pais, Marcia e Antonio, pelos ensinamentos, valores e esforços que me fortalecem a cada vitória em minha vida.

As minhas amadas irmãs, Marcelle e Cristine, pela nossa união, carinho e suporte com meu filho, nos vários momentos que precisei.

Todos meus lindos e maravilhosos sobrinhos e afilhados, por sempre torcerem por mim.

Aos meus cunhados, Anna, Mauricio e Rafael, por todo o incentivo e apoio.

Aos profissionais humanistas que cuidam da minha saúde mental; a médica do meu trabalho, Dr. Laura, que me incentivou a chegar aqui independente das questões em avaliação naquele momento.

Às amigas Rose, Ju (e madrinha), Lorrany e Gabriela que contribuíram na revisão do meu material.

A doutoranda e amiga Andrea e Veronica (doutora) que sempre estiveram por perto, me apoiando nos momentos mais difíceis.

A Cristiane, agora doutora e técnica do laboratório, por toda orientação e ajuda que me deu. E ao aluno de iniciação científica Gabriel, pelo auxílio nas análises e pelos momentos descontraídos com suas respostas irônicas.

Aos membros das bancas de qualificação e defesa, pelo carinho, cuidado e grande contribuição para melhoria do meu trabalho.

Por último, mas não menos importante, agradeço a todos que fizeram parte desta caminhada e torceram por mim. Seria impossível incluir todos aqui.

“O Senhor é o meu pastor, nada me faltará”

Salmo 23

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO DO RESISTOMA DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS, PRINCIPALMENTE DA ORDEM ENTEROBACTERALES, DE AMOSTRAS DE QUEIJOS PROVENIENTES DE UM HOSPITAL PÚBLICO DA CIDADE DO RIO DE JANEIRO, BRASIL

A resistência antimicrobiana é um problema crítico de saúde pública, particularmente as bactérias Gram-negativas resistentes a múltiplas classes de antimicrobianos, sobretudo em populações vulneráveis. Os alimentos podem ser potenciais reservatórios e veículos de determinantes genéticos de resistência a antimicrobianos para os seres humanos, sendo os produtos lácteos um importante veículo de transmissão, uma vez que podem ser consumidos sem tratamento térmico adicional. Sob este prisma, este estudo teve como objetivo avaliar o perfil de resistência aos antimicrobianos em microbiota Gram-negativa cultiváveis de queijos servidos a pacientes internados em um hospital público do Rio de Janeiro. Foram coletadas 8 amostras de diferentes tipos de queijos. Esta pesquisa utilizou metodologia que investigou o conjunto de bactérias Gram-negativas viáveis e elementos de resistência antimicrobiana presentes nesses queijos. O teste de difusão em disco e a reação em cadeia da polimerase (PCR) foram realizados para investigar, respectivamente, a resistência fenotípica e genotípica em microbiota Gram-negativas aos antimicrobianos testados. Com exceção do antimicrobiano ciprofloxacino, os percentuais de resistência das microbiotas apresentaram acima de 63,6%, incluindo cefalosporinas de quarta geração (81,8%). Em 87,5% das amostras, a resistência da microbiota atingiu mais de sete antimicrobianos testados. Perfil de resistência a ampicilina e ampicilina-sulbactam foi observada em 100% das microbiotas analisadas. A categoria intermediária foi mais frequente no comitê americano CLSI (*Clinical Laboratory Standard Institute*) quando comparado com o nacional BrCAST (*Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) e valores mais conservadores de ponto de corte pelo BrCAST. Todas as amostras de queijo carregavam pelo menos um elemento de resistência. Sete diferentes elementos de resistência foram detectados em 34 microbiotas de bactérias Gram-negativas (*ctx*, *shv*, *tem*, *tetA*, *tetB*, *int-1* e *int-2*). Os resultados indicam microbiota Gram-negativa com alta taxa de resistência a antimicrobianos utilizados na terapêutica de infecções graves; e presença alarmante de elementos genéticos codificadores de diferentes mecanismos de resistentes e mobilizadores da disseminação desses genes em queijos servidos a pacientes hospitalizados, indicando que este alimento pode ser um potencial agravante da resistência a antimicrobianos em ambiente hospitalar.

Palavras-chave: Alimento seguro, Infecções bacteriana, Bactérias Gram-negativas, Resistência antimicrobiana, genes.

ABSTRACT

BACTERIAL RESISTANCE GRAM-NEGATIVES, MAINLY OF THE ORDER ENTEROBACTERIALES, FROM CHEESE SAMPLES COMING FROM A PUBLIC HOSPITAL IN THE CITY OF RIO DE JANEIRO, BRAZIL

Antimicrobial resistance is a critical public health problem, particularly Gram-negative bacteria resistant to multiple classes of antimicrobials, especially in vulnerable populations. Food can be potential reservoirs and vehicles of genetic determinants of antimicrobial resistance for humans, with dairy products being an important vehicle of transmission, as they can be consumed without additional heat treatment. From this perspective, this study aimed to evaluate the antimicrobial resistance profile in growable Gram-negative microbiota of cheeses served to patients admitted to a public hospital in Rio de Janeiro. Eight samples of different types of cheese were collected. This research used a methodology that investigated the set of viable Gram-negative bacteria and elements of antimicrobial resistance present in these cheeses. The disk diffusion test and the polymerase chain reaction (PCR) were performed to investigate, respectively, the phenotypic and genotypic resistance in Gram-negative microbiota to the tested antimicrobials. With the exception of the antimicrobial ciprofloxacin, the percentages of microbiota resistance were above 63.6%, including fourth generation cephalosporins (81.8%). In 87.5% of the samples, microbiota resistance reached more than seven antimicrobials tested. Resistance profile to ampicillin and ampicillin-sulbactam was observed in 100% of the microbiota analyzed. The intermediate category was more frequent in the American committee CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) when compared to the national BrCAST (Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) and more conservative cut-off values by BrCAST. All cheese samples carried at least one resistance element. Seven different resistance elements were detected in 34 microbiota of Gram-negative bacteria (ctx, shv, tem, tetA, tetB, int-1 and int-2). The results indicate a Gram-negative microbiota with a high rate of resistance to antimicrobials used in the treatment of serious infections; and alarming presence of genetic elements encoding different resistance mechanisms and mobilizing the dissemination of these genes in cheeses served to hospitalized patients, indicating that this food may be a potential aggravator of resistance to antimicrobials in a hospital environment.

Keywords: Food Safety, Bacteria Infections, Gram-negative Bacteria, Antimicrobial Resistance, genes.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----------|
| Figura 1 - Resultado de coloração Gram na parede celular bacteriana. | 20 |
| Figura 2 - Características das camadas superficiais de bactérias Gram-negativas . | 21 |
| Figura 3 - Estrutura do integron e mecanismo de aquisição de cassetes gênicos. .. | 26 |
| Figura 4 - Etapas da análise fenotípica | 36 |
| Figura 5 - Análise da avaliação da resistência genotípica | 38 |
| Figura 6 - Registro fotográfico da etapa de pré-seleção..... | 41 |
| Figura 7 - Perfis de resistência fenotípica antimicrobiana de MGN de amostras de queijo..... | 42 |
| Figura 8 - Registro fotográfico da etapa de disco difusão | 42 |
| Figura 9 - Percentuais da interpretação do teste fenotípico por amostra de queijo.. | 44 |
| Figura 10 - Distribuição de categorias discrepantes interpretadas por CLSI e BrCAST.. .. | 45 |
| Figura 11 - Perfil genético das MGNs por amostra de queijo. | 47 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----------|
| Tabela 1 - Resumo dos mecanismos de ação de antimicrobianos e genes de resistência mais frequentemente encontrados em BGNs | 23 |
| Tabela 2 - Pontos de corte interpretativos da ordem Enterobacterales – CLSI e BRCASST..... | 37 |
| Tabela 3 - Componentes e conteúdo do kit comercial utilizados em cada extração. | 38 |
| Tabela 4 - Sequência de nucleotídeos, ciclos, tamanho dos genes e referências.... | 40 |
| Tabela 5 - Perfis de resistência antimicrobiana de MGN de amostras de queijo | 43 |
| Tabela 6 - Distribuição das categorias fenotípica por amostras de queijo e antimicrobiano | 43 |
| Tabela 7 - Categorias discrepantes de acordo com a interpretação CLSI e BrCAST. | 44 |
| Tabela 8 - Percentual e valores absolutos de GRA por amostras de queijo e MGNs. | 46 |
| Tabela 9 - Perfil genotípico das MGNs de amostras de queijo por antimicrobiano... | 48 |

LISTA DE SIGLAS

| | |
|----------|---|
| ABIQ | Associação Brasileira das Indústrias de Queijo |
| BGN-RA | Bactérias Gram-Negativas Resistentes a Antimicrobiano |
| BGN | Bactérias Gram-Negativa |
| BGP | Bactérias Gram-Positiva |
| BRA | Bactéria Resistente a Antimicrobiano |
| BrCAST | <i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i> |
| BR-GLASS | <i>Brazilian Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance Systems</i> |
| CLSI | <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>) |
| DTA | Doenças Transmitidas por Alimentos |
| EGM | Elemento Genético Móvel |
| ESBL | Beta-lactamase de Espectro Estendido (<i>Extended Spectrum Beta Lactamase</i>) |
| EUA | Estados Unidos da América |
| FAO | Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (<i>Food and Agriculture Organization</i>) |
| GRA | Genes de Resistência a Antimicrobiano |
| HUGG | Hospital Universitário Gaffrée e Guinle |
| IRAS | Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde |
| LPS | Lipopolissacarídeos |
| MGN | Microbiota Gram-Negativa |
| OMP | Proteína da Membrana Externa (<i>Outer Membrane Protein</i>) |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| ORF | Fase de Leitura Aberta (<i>Open Reading Frames</i>) |
| PB | Pares de Base |
| PCR | Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) |
| PGN | Peptidoglicano |
| RA | Resistência Antimicrobiana |
| TSA | Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 18 |
| 3 | REVISÃO DE LITERATURA | 19 |
| 3.1 | Bactérias Gram-Negativas | 19 |
| 3.1.1 | Diferença entre Bactérias Gram-negativas e Gram-positivas | 19 |
| 3.1.2 | O complexo envelope celular Gram-negativo | 21 |
| 3.1.3 | Bactéria Gram-negativa e sua gravidade..... | 22 |
| 3.2 | Mecanismos de RA | 22 |
| 3.3 | Elementos Genéticos Móveis (EGMS) | 24 |
| 3.4 | Infecções hospitalares | 27 |
| 3.5 | Segurança do alimento na cadeia alimentar | 30 |
| 3.6 | Queijos | 31 |
| 4 | OBJETIVOS | 33 |
| 4.1 | Objetivo geral | 33 |
| 4.2 | Objetivos específicos | 33 |
| 5 | MATERIAIS E MÉTODOS | 34 |
| 5.1 | Amostra | 34 |
| 5.2 | Preparo das amostras | 34 |
| 5.3 | Etapa de cultivo e pré-seleção de MGNS resistentes | 35 |
| 5.4 | Seleção de MGNS resistentes | 35 |
| 5.5 | Caracterização da resistência fenotípica | 36 |
| 5.6 | Avaliação da resistência genotípica | 37 |
| 5.6.1 | Extração de material genético - DNA | 37 |
| 5.6.2 | Identificação de gene por reação em cadeia da polimerase - PCR | 38 |
| 6 | RESULTADOS | 41 |
| 6.1 | Resistência fenotípica | 41 |
| 6.1.1 | Avaliação da etapa pré-seleção | 41 |
| 6.1.2 | Avaliação do teste disco-difusão..... | 41 |
| 6.2 | Comparação CLSI e BRCAS | 44 |
| 6.3 | Resistência genotípica | 45 |

| | | |
|-----|--|------------|
| 7 | DISCUSSÃO..... | 49 |
| 7.1 | Caracterização fenotípica..... | 49 |
| 7.2 | Caracterização genotípica..... | 54 |
| 7.3 | Genes codificadores de betalactamase | 55 |
| 7.4 | Genes de resistência à tetraciclina | 61 |
| 7.5 | Genes codificadores de carbapenemases..... | 63 |
| 7.6 | Gene plasmidial resistente à colistina | 65 |
| 7.7 | <i>INTEGRONS</i>..... | 66 |
| 7.8 | Possível transferência de genes para a microbiota humana a partir dos alimentos..... | 69 |
| 7.9 | Divergência na categorização das MGNS (CLSI - BRCAST) | 71 |
| 8 | CONCLUSÕES..... | 75 |
| | REFERÊNCIAS..... | 77 |
| | APÊNDICE A - RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DA MICROBIOTA DE QUEIJOS SERVIDOS EM HOSPITAL ONCOLÓGICO DO RIO DE JANEIRO BRASIL – ARTIGO PUBLICADO EM <i>RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT</i>..... | 97 |
| | APÊNDICE B -PRESENCE OF B-LACTAMASE PRODUCING BACTERIA IN FOODS IN BRAZIL – ARTIGO SUBMETIDO À <i>LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY</i>..... | 109 |

1 INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana (RA) se configura como uma das dez maiores ameaças à saúde global no século XXI (WHO, 2023a). Dada sua rápida disseminação, se não houver ações de controle imediatas, as consequências da RA poderão ser devastadoras e notadas em diversos contextos. Estima-se que até 2050, a RA poderá ser a principal causa de morte no mundo (O'NEILL, 2014; WALSH *et al.*, 2020).

A evolução da RA é uma consequência inevitável do uso indiscriminado de antimicrobianos em humanos e animais, o que contribuiu para a seleção de bactérias patogênicas resistentes à antimicrobianos (VARELA *et al.*, 2021). A evolução de mecanismos de bactérias resistentes, inclusive à antimicrobianos de gerações e de descoberta mais recente, têm avançado numa velocidade superior à capacidade de descoberta de novos medicamentos (SALAZAR; DÍAZ; FERRARA, 2024).

Neste seguimento, as bactérias Gram-negativas (BGNs) tem grande notoriedade entre as causas e estudos de RA em comparação a microrganismos menos resistentes, e, rotineiramente, são identificadas em amostras clínicas envolvidas em infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) (AL DABBAGH *et al.*, 2023; FONG, 2023).

Os ambientes hospitalares continuam sendo os potenciais reservatórios de transmissão de patógenos resistentes a antimicrobianos (AFZAL; JUNAID; AZIZ, 2021). No entanto, as BGNs superaram as barreiras e estão amplamente disseminadas e adaptadas a diversos nichos, como o meio ambiente, animais, alimentos e até mesmo em pessoas saudáveis (AHMAD; JOJI; SHAHID, 2023; TIEDJE *et al.*, 2023).

Os alimentos, em especial, têm sido comumente negligenciados como potenciais reservatórios e vetores de genes de resistência a antimicrobianos (GRAs) para os seres humanos. Os resíduos do uso indiscriminado de antimicrobianos na pecuária e na agricultura tem contribuído para seleção de bactérias resistentes a antimicrobianos e, devido às suas propriedades de mobilidade e adaptação em deferentes nichos, a transferência pode ocorrer através da cadeia alimentar, o que aumenta os riscos à saúde do animal e do homem (NODARI *et al.*, 2023; BACANLI; BAŞARAN, 2019; KOCH; HUNGATE; PRICE, 2017).

No âmbito hospitalar, o consumo de alimentos contaminados por BGNs que abrigam GRAs, pode ser particularmente perigoso em função de fatores de risco

encontrados na população hospitalizada como, por exemplo, a fragilidade do sistema imunológico e as modificações da constituição microbiana natural do trato gastrointestinal (CAMPOS-MADUENO *et al.*, 2023; SAN MILLAN, 2018; LUND; O'BRIEN, 2011).

Produtos lácteos, como os queijos, possuem condições ambientais favoráveis para o crescimento microbiano (FUSCO *et al.*, 2020), incluindo os principais patógenos alimentares resistentes a antimicrobianos (PARUSSOLO *et al.*, 2019; RIPON *et al.*, 2023; SILVA *et al.*, 2020). Fornecer alimentos seguros é parte integrante do cuidado centrado no paciente hospitalizado (NELSON; MOORE; RAO, 2019; PRIMAVILLA *et al.*, 2019).

Considerando que a alimentação fornecida aos pacientes pode ser uma possível fonte de IRAS (BOORA *et al.*, 2023), a RA apresentada por BGNs em alimentos também é uma questão relacionada à segurança dos pacientes, com enfoque em infecção e disseminação de RA.

2 JUSTIFICATIVA

A segurança do alimento oferecido ao paciente hospitalizado levanta especial preocupação, uma vez que os alimentos podem ser reservatórios e veiculadores de BGN-RA. Pacientes hospitalizados podem ser mais propensos à colonização por bactérias oportunistas que, somado ao fenômeno de RA, faz com que as infecções adquiridas em ambiente hospitalar estejam frequentemente associadas a um desfecho desfavorável, como o aumento dos custos do tratamento e o aumento da mortalidade dos pacientes. BGN-RA podem estar em queijos, um alimento amplamente consumido no Brasil, que tipicamente compõe o cardápio de pacientes hospitalizados.

Este estudo utiliza metodologia de análise do conjunto de BGNs, com a exposição ao antimicrobiano na etapa de pré-seleção, na tentativa de preservar os fragmentos de DNA dentro da célula bacteriana durante as análises. As vantagens do método podem possibilitar uma compreensão mais profunda da segurança do alimento.

Considerando que são escassos os trabalhos que avaliam a segurança de alimentos com foco na prevenção de IRAS e no controle da disseminação de elementos genéticos de mobilização, e que existam genes de RA sendo disseminados por BGN em queijos industrializados ofertado a pacientes internados, o presente trabalho se faz essencial uma vez que visa o controle de infecções durante a internação hospitalar mediado por bactérias transmitidas por alimentos, trazendo um alerta para a importância dos setores de Alimentação e Nutrição no combate à disseminação bacteriana via alimentos.

A hipótese é que existem genes de RA em queijos industrializados ofertados a pacientes internados em um hospital especializado em oncologia localizado na cidade do Rio de Janeiro.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Bactérias Gram-negativas

3.1.1 Diferença entre Bactérias Gram-negativas e Gram-positivas

Em termos morfológicos, embora as bactérias Gram-positivas (BGP) e BGNs tenham em comum uma membrana citoplasmática protegida por uma parede celular, essas duas grandes classes de bactérias diferem na espessura e composição de suas superfícies celulares externas (EPAND *et al.*, 2016; MALANOVIC; LOHNER, 2016).

A parede celular bacteriana tem como característica definidora o peptidoglicano (PGN), uma macromolécula dinâmica que facilita a sobrevivência em flutuações osmóticas extremas, o crescimento e a adaptação de bactérias a diversos ambientes. Todas essas propriedades tornam os PGNs um dos alvos favoritos dos antimicrobianos. Nas BGPs, o PGN é espesso, contém muitas camadas e predominam em sua superfície celular (cerca de 90% do peso seco). Enquanto nas BGNs, uma fina monocamada de PGN compõe a parede celular (cerca de 10%), coberta por uma bicamada lipídica adicional. (GARDE; CHODISETTI; REDDY, 2021).

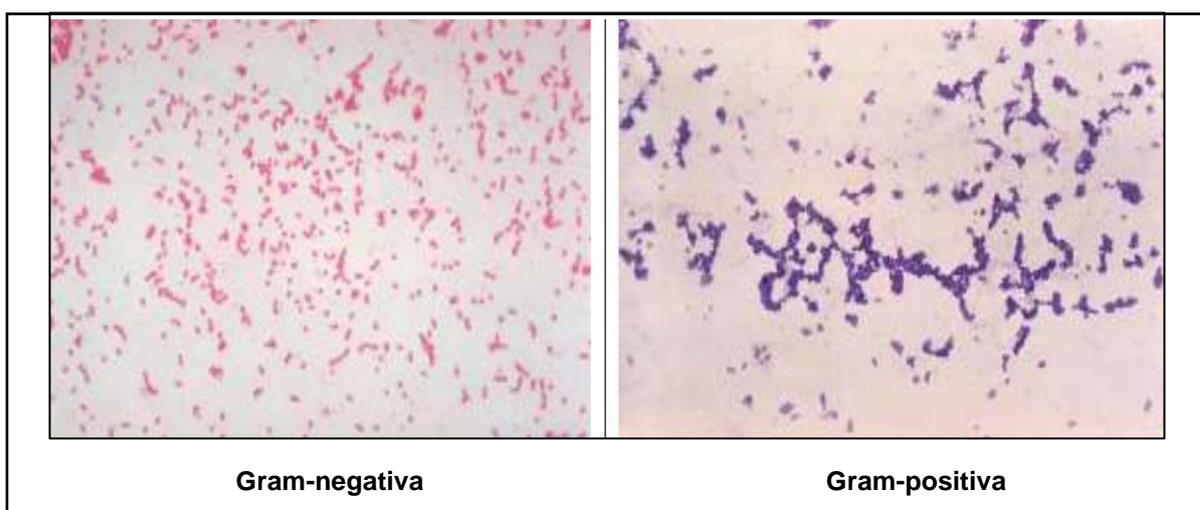
Em 1884, Hans Christian Gram desenvolveu o método Coloração de Gram, que distingui bactérias Gram-positivas e Gram-negativas usando um complexo cristal violeta-iodo e uma contra-coloração de safranina. Este método resulta em coloração diferenciada entre os dois grupos de bactérias, as BGPs são coradas de roxo, e BGNs, de rosa (Figura 1). A nomenclatura "Gram-negativa" origina-se da incapacidade deste tipo de bactéria em reter a coloração primária roxa dentro da célula (reação negativa), após o tratamento com o descolorante, por ter parede celular fina, que tem sua cor substituída por safranina (COICO, 2006).

Além da coloração diferenciada, a morfologia e os componentes moleculares das membranas das bactérias, resulta em diferenças na capacidade de permeabilidade de solutos e agentes químicos, como os antimicrobianos. Por possuir uma distinta membrana externa, importante barreira seletiva química ao meio externo, e que também fornece suporte mecânico, as BGNs, quando comparadas às BGPs, são naturalmente menos permeáveis a muitos antimicrobianos (AL HAMDAN *et al.*, 2022; EXNER *et al.*, 2017; MATHELIÉ-GUINLET *et al.*, 2020)

Outra característica inata à BGNs é decorrente do principal componente de sua membrana externa, uma endotoxina conhecida como lipopolissacarídeos (LPS). Em resposta a danos causados por estressores ambientais, as BGNs liberam moléculas de LPS que estimulam o sistema imunológico do hospedeiro, desencadeando reações tóxicas de infecções, podendo causar infecção sistêmica (MITCHELL; SILHAVY, 2019).

A dimensão do espaço periplasmático, delimitado pelas membranas externa e citoplasmática em BGNs, é muito maior do que o periplasma estreito das BGP. Este espaço, além de conter componentes vitais para inúmeras funções que refletem o estado metabólico e ambiental da célula, são compostos por enzimas de degradação capazes de inativar antimicrobianos (MILLER; SALAMA, 2018; SILHAVY; KAHNE; WALKER, 2010).

Figura 1 - Resultado de coloração Gram na parede celular bacteriana.



Fonte: Adaptada de PARAY; SINGH; AMIN MIR, 2023

De forma geral, as infecções causadas por BGNs, devido à arquitetura rígida e complexa de seu envelope celular são mais difíceis de tratar e, portanto, representam uma séria ameaça para a saúde humana quando comparadas as BGPs. Entretanto, em nível unicelular, tanto para as BGPs quanto para as BGNs, a heterogeneidade da superfície celular pode ter consequências importantes para o comportamento bacteriano, tendo impacto na sensibilidade aos antimicrobianos, bem como na patogenicidade (LITHGOW; STUBENRAUCH; STUMPF, 2023). Assim, o aumento da resistência de BGPs e BGNs a múltiplos antimicrobianos é uma preocupação mundial (KAKOULLIS *et al.*, 2021).

3.1.2 O complexo envelope celular Gram-negativo

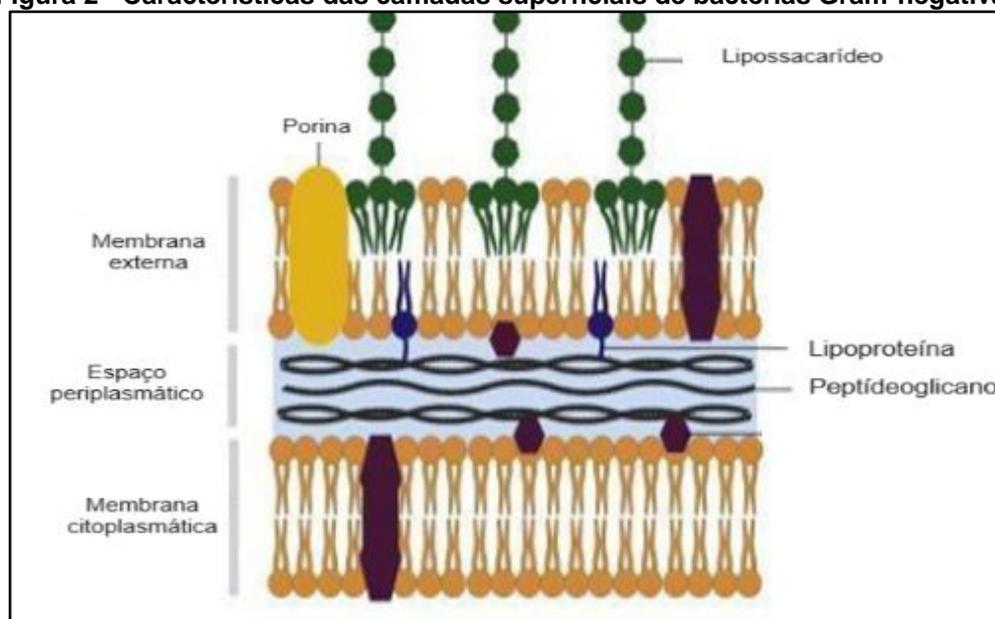
Começando por fora e prosseguindo para dentro, as BGNs possuem um envelope que é formado por três camadas principais (Figura 2) (EPAND *et al.*, 2016):

- Membrana externa (primeira camada): uma bicamada lipídica, onde a membrana tem o folheto interno composto por fosfolipídios e o externo, por LPS. Contém proteínas da membrana externa (*outer membrane proteins* - OMPs), como as porinas, que permitem a passagem de pequenas moléculas.

- Parede celular (segunda camada): formada por PGN que fica imerso no espaço periplasmático; o PGN é um exoesqueleto rígido formado por dois açúcares aminados, o ácido N-acetil glicosamina e o ácido N-acetil murâmico, e por um tetrapeptídeo. Possui função determinante na forma da célula e proteção contra variações nas pressões osmóticas.

- Membrana citoplasmática/interna (terceira camada): uma bicamada fosfolipídica, que delimita o meio externo do interno, responsável por funções essenciais como estrutura, transporte e funções biossintéticas.

Figura 2 - Características das camadas superficiais de bactérias Gram-negativas



Fonte: Adaptado de EPAND *et al.*, 2016.

Definido como “forte, resistente e elástico” o complexo envelope celular das BGNs é uma notável estrutura de proteção celular que foi determinante para a dominância dessas bactérias nos ecossistemas (BEVERIDGE, 1999).

A membrana externa é um dos principais fatores que contribuem para a resistência intrínseca aos antimicrobianos, que lhes confere resistência a uma ampla gama de antimicrobianos. Qualquer perturbação nessa bicamada desencadeia mecanismos nas BGNs que podem desenvolver resistência (BREIJYEH; JUBEH; KARAMAN, 2020).

3.1.3 Bactéria Gram-negativa e sua gravidade

Em razão da combinação entre a RA e a elevada capacidade patogênica, as BGNs vêm ganhando, nos últimos anos, cada vez mais atenção dos pesquisadores (CEPAS; SOTO, 2020). As BGNs figuram como a causa mais frequente de infecções graves em humanos, especialmente em indivíduos imunocomprometidos. As infecções nosocomiais causadas por BGNs tornaram-se grandes desafios para as instituições de saúde globais devido às opções limitadas de antimicrobianos e às altas taxas de mortalidade (JEAN; HARNOD; HSUEH, 2022).

O aumento na frequência e letalidade associado às infecções causadas por BGNs tem se tornado mais dramático pela estagnação e escassez de medicamentos capazes de combatê-las. A maioria dos novos antimicrobianos desenvolvidos se restringem a atividade contra BGPs, forçando os pesquisadores a "redescobrir" antimicrobianos antigos, com potencial tóxico, para o combate às BGNs, como por exemplo, as colistinas (polimixinas) (KARVOUNIARIS et al, 2023). A principal razão para essa falta de atividade do antimicrobiano é a eficácia de sua membrana externa, como barreiras seletivas de moléculas (MACNAIR; BROWN, 2020).

3.2 Mecanismos de RA

Algumas bactérias são naturalmente resistentes a antimicrobianos (resistência intrínseca), um exemplo conhecido de resistência intrínseca é a deficiência na captação de um agente devido às características estruturais ou fisiológicas específicas das bactérias, como a resistência das BGN à vancomicina. As bactérias intrinsecamente não suscetíveis também podem ser resistentes devido à aquisição de mecanismos de resistência (resistência adquirida), por vias de transferência horizontal de genes (HGT) ou mutações no cromossomo (YEKANI *et al.*, 2023).

As bactérias podem desenvolver diversos mecanismos de resistência a um ou múltiplos antimicrobianos. Esses mecanismos de RA são codificados por genes (Tabela 1), com isso, a adaptabilidade bacteriana a diversidade de habitat impõe a necessidade de um amplo repertório genético. O conjunto de genes envolvidos em mecanismos de RA são denominados “resistoma” (BRAUNER et al., 2016).

Tabela 1- Resumo dos mecanismos de ação de antimicrobianos e genes de resistência mais frequentemente encontrados em BGNs

| Classe de Antibiótico (exemplos) | Mecanismo de ação do antimicrobiano | Mecanismo de RA | Genes de resistência (exemplos) |
|--|---|---|---|
| Aminoglicosídeos (gentamicina e estreptomicina) | Inibição da síntese proteica | Modificação enzimática Diminuição da permeabilidade Resistência ao alvo (ribossomo) Bombas de efluxo | <i>aac(3)</i> , <i>strA</i> , <i>aph</i> , <i>aada</i> , |
| beta-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos) | Inibição da formação da parede celular | Permeabilidade reduzida PBPs alteradas ESBL carbapenemase Bombas de efluxo | <i>tem</i> , <i>shv</i> , <i>ctx</i> , <i>kpc</i> , <i>oxa</i> , <i>ampc</i> , <i>vim</i> , <i>per</i> |
| Fenicóis (Cloranfenicol) | Inibição da síntese proteica | Modificação enzimática Diminuição da permeabilidade Diminuição da ligação ribossômica Bombas de efluxo | <i>cat1</i> , <i>cat2</i> , <i>cmlA</i> , <i>flor</i> |
| Quinolonas e fluoroquinolonas (Ciprofloxacina) | Inibição da Topoisomerase | Resistência ao alvo Bombas de efluxo Diminuição da permeabilidade | <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>parC</i> |
| Tetraciclina (tigeciclina, tetraciclina) | Inibição da síntese proteica | Resistência ao alvo (ribossomo) Desintoxicação de drogas Bombas de efluxo | <i>TetA</i> , <i>tetB</i> , <i>tetX</i> |
| Inibidor do folato (Sulfonamidas) | Inibição da síntese do ácido tetrahidrofólico | Diminuição da permeabilidade Produção de enzimas insensíveis a medicamentos | <i>sul1</i> , <i>sul2</i> , <i>sul3</i> |
| Pirimidinas (trimetoprim) | Inibição da síntese do ácido tetrahidrofólico | Modificação do alvo | <i>dhfr1</i> , <i>dhfr12</i> , <i>dhfr12</i> |
| Peptídeos catiônicos (colistina) | Ligação ao lipídio A no lipopolissacarídeo | Modificação ou remoção do lipídeo A | <i>mcr-1</i> |

Nota: Os exemplos expostos têm como foco este estudo. ESBL: Beta-lactamase de Espectro Estendido. Fontes: (KAKOULLIS et al., 2021; BREIJYEH; JUBEH; KARAMAN, 2020; BLAIR; RICHMOND; PIDDOCK, 2014)

Para além da transferência vertical de genes e mutações, as bactérias de diferentes espécies podem realizar troca genética por conjugação/mobilização (mediada por plasmídeos e elementos conjugativos integrativos), transdução (mediada por bacteriófagos) e transformação (captação de DNA extracelular). Os três

mecanismos são denominados transferência horizontal de genes, e os elementos genéticos móveis (EGMs) assumem papel importante neste processo (BREIJYEH; JUBEH; KARAMAN, 2020).

A resistência adquirida desperta maior preocupação, pois populações bacterianas de diferentes espécies, inicialmente sensíveis, tornam-se cada vez mais resistentes e proliferam sob a pressão seletiva antimicrobiana. O uso de antimicrobianos, sobretudo de forma excessiva e incorreta, somado a fatores ambientais, como poluição e a presença de fontes residuais de antimicrobianos na água contribuem para a seleção e proliferação de bactérias resistentes. As BAs prosseguem sob pressão seletiva e adquirem mecanismos de resistência que parecem ser inexauríveis; e se espalham por todo o mundo com infindáveis possibilidades de novas mutações espontâneas ou formas de transferência horizontal de GRA (AJAYI, *et al.*, 2024 & AHMED *et al.*, 2023).

3.3 Elementos genéticos móveis (EGMs)

A transferência horizontal de genes é a via mais importante e rápida de troca de materiais genéticos na disseminação de RA. Através dos EGMs, como plasmídeos, sequências de inserção, transposons, e integrons, a disseminação de GRAs conferem a bactéria capacidade de adquirir diferentes meios de RA de forma simultânea e combinada (BREIJYEH; JUBEH; KARAMAN, 2020). O conjunto de genes e EGMs envolvidos em mecanismos de RA são denominados resistoma (BRAUNER *et al.*, 2016).

Os plasmídeos são estruturas de DNA circular extracromossomal, de replicação independentemente, que se transferem verticalmente, via divisão celular, para um número cada vez maior de células hospedeiras, que apesar de não codificar características essenciais da bactéria, conferem as células bacterianas diversas vantagens adaptativas (NEWBURY *et al.*, 2022).

Por meio de conjugação/mobilização, a propagação dos plasmídeos é facilitada por transmissão horizontal para outras células bacterianas. Os plasmídeos são veículos importantes para o transporte de outros EGMs e de GRAs adquiridos associados a esses elementos. Devido à sua capacidade de carregar múltiplos GRAs e de se transferir entre diferentes espécies bacterianas, os plasmídeos são

considerados os principais responsáveis pela disseminação global de ARGs (PETERSON; KAUR, 2018).

Nos plasmídeos existem as regiões acessórias, que são caracteristicamente constituídas por um ou mais GRAs e EMGs associados (como sequências de inserção, *transposons* e *integrans*), podem promover mobilidade intracelular (por exemplo, do cromossomo para um plasmídeo ou entre plasmídeos) quanto intercelular do DNA. Sequências de inserção e *transposons* são discretos segmentos de DNA, que se movem, frequentemente de forma aleatória, nas mesmas ou em diferentes moléculas de DNA dentro de uma única célula. Os *integrans* utilizam recombinação específica para mover GRAs entre sítios definidos (BOBATE et al., 2023).

Os *transposons* são elementos genéticos transponíveis, capazes de modificar de posição dentro do genoma ou fora dele (*transposons* conjugativos). Sua estrutura contém sequências de inserção nas extremidades flanqueado a outros genes, como os GRAs e podem carregar EMGs. Diferentemente de plasmídeos conjugativos, não possuem uma forma extracomossomal replicativa autônoma, e por isso, integram-se no cromossomo e quase sempre se replicarem e se movimentarem dentro das células de um mesmo hospedeiro (PARTRIDGE *et al.*, 2018; LIEBERT; HALL; SUMMERS, 1999).

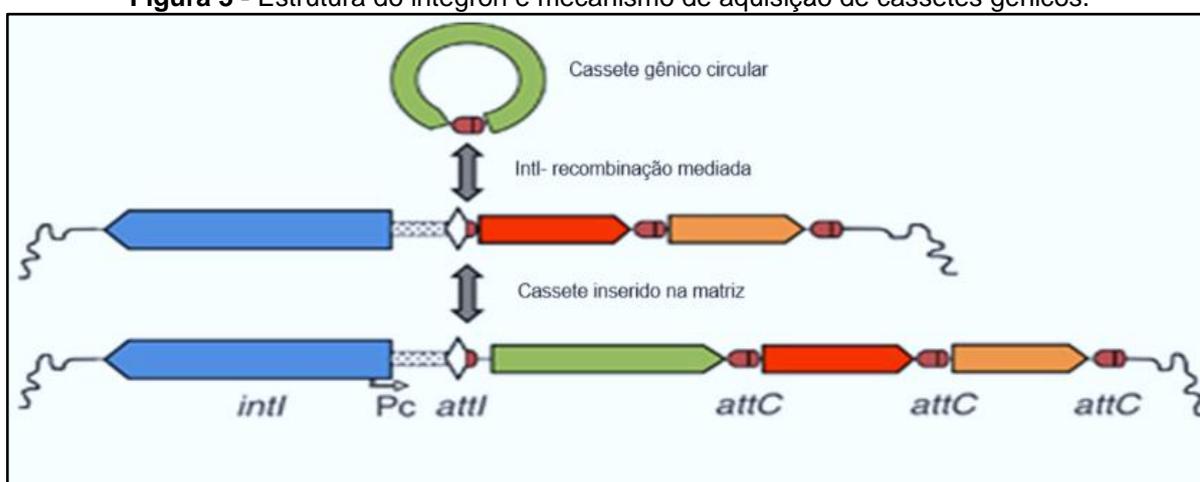
Transposons da família *Tn3* são frequentemente associados aos GRAs. Os membros dessa família são plataformas modulares que permitem a montagem, a diversificação e a redistribuição de um arsenal cada vez maior de GRAs. Possuem uma característica essencial no seu modo de replicação da transposição, usando um mecanismo de “copiar” (ou “colar e copiar”) no qual a replicação do transposon ocorre durante a integração no alvo (NICOLAS et al., 2015).

Os *integrans* são elementos genéticos que permitem a aquisição, expressão e disseminação de GRAs. São onipresentes e estão presentes em aproximadamente 17% dos cromossomos bacterianos. São capazes de se mover entre espécies e linhagens bacterianas, atuando como a principal razão para a resistência múltipla em bactérias Gram-negativas. A mobilidade dos *integrans* é considerada uma grande preocupação em patógenos clínicos de disseminação de RA, e essa mobilidade está relacionada a elementos móveis de DNA (*transposon* e plasmídeo) (SABBAGH *et al.*, 2021; KAUSHIK *et al.*, 2018).

O sistema genético dos *integrans* é composto por três elementos principais: o gene que codifica a integrase (*IntI*), uma proteína que catalisa a recombinação entre

os genes adquiridos; o sítio de recombinação (*attI*), onde ocorre a inserção de novos genes; e o promotor (*Pc*), que permite que os genes incorporados sejam expressos. Os *integrons* capturam e incorporam cassetes gênicos para o alcance de leitura de novos genes. Os cassetes gênicos são elementos móveis que codificam múltiplos genes, compostos normalmente por um gene com uma fase de leitura aberta (*Open Reading Frames* - ORF), e uma região de recombinação (*attC*). Os cassetes gênicos podem estar livres na forma circular, ou integrados no sítio *att* do integron (GILLINGS, 2017) (Figura 3).

Figura 3 - Estrutura do integron e mecanismo de aquisição de cassetes gênicos.



Legenda: *intI* - Região codificadora da integrase; *attI* - sítio de recombinação do *integron*; *attC* - área de recombinação dos cassetes gênicos. Fonte: Adaptada de GILLINGS, 2017.

Diversos cassetes gênicos podem ser inseridos ou excisados, de forma reversível, em um único *integron*, pela recombinação entre a região *attC* e *attI* do *integron*, mediada pela enzima integrase (PARTRIDGE *et al.*, 2018). A capacidade do sistema integron de adquirir novos e recombinar fileiras de cassetes sublinha a adaptação de sua diversidade em bactérias. Primeiro, a inserção dos genes no genoma bacteriano é num local de recombinação específico (*attI*) e, portanto, não altera os genes existentes, e a dinâmica de incorporação e excisão dos genes, permitem ainda um rearranjo na estrutura do *integron*. A inserção adjacente ao *attI* permite a expressão do gene com o auxílio do promotor, possibilitando a seleção de bactérias com diferentes GRAs mais próximos ao promotor, e conseqüentemente, a maior chance de expressão destes genes. Este pode ser um mecanismo importante para aquisição de genes em plasmídeos e cromossomos (GILLINGS, 2017).

Em cromossomos bacterianos, os *integrons* garantem proliferação dos clones resistentes, por meio da transferência vertical, mantendo sua persistência na população bacteriana. Combinada à transferência horizontal, facilita a disseminação da RA entre diferentes nichos ecológicos, e expandem a diversidade de mecanismos de defesa entre principalmente entre espécies BGNs. Baseados no gene *intl*, os *integrons* podem ser classificados em várias classes, sendo os *integrons* de classe 1, 2 e 3 os mais associados aos GRAs. Entre as classes de integron, a classe 1 é a mais importante na disseminação de GRAs entre patógenos e comensais (BIAN *et al.*, 2023; ZHANG *et al.*, 2023).

Metais pesados e biocidas (por exemplo, compostos de amônio quaternário) representam importantes determinantes de RA por co-seleção (CHEN *et al.*, 2023). Pelo alimento, esses elementos de RA são capazes de disseminar horizontalmente na microbiota humana (FUGA *et al.*, 2022). Os compostos de amônio quaternário são biocidas utilizados para controle não específico de microrganismos em diversas condições ambientais, desde a produção de alimentos até o saneamento (SABBAGH *et al.*, 2021). Os genes de virulência e biofilmes também são fatores agravantes da infecção e RA e estão difundidos na cadeia alimentar (FUGA *et al.*, 2022).

Os mecanismos de virulência e a formação de biofilme são utilizados pelas bactérias para causar agravamento de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs). Esses elementos somados aos compostos químicos (como metais e biocidas) são frequentemente co-abundantes na cadeia produtiva do alimento e transportados nos cassetes genéticos de *integrons* juntos aos GRAs, que podem tornar-se uma força motriz para a abundância, diversidade e potencial de adaptação das BGNs patogênicas (CEPAS; SOTO, 2020).

3.4 Infecções hospitalares

Segundo a Portaria n.º 2.616/98, publicada pelo Ministério da Saúde, a infecção hospitalar pode ser definida como aquela adquirida após a admissão do paciente e que se manifeste durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares (BRASIL, 2018).

No entanto, a fim de abranger não só a infecção adquirida no ambiente hospitalar, mas também aquela relacionada a procedimentos ambulatoriais, cuidados domiciliares e infecção ocupacional adquirida por profissionais de saúde, o termo

infecção hospitalar tem sido substituído por IRAS (HORAN; ANDRUS; DUDECK, 2008).

Dentro do contexto hospitalar, diversos fatores tornam o paciente mais suscetível às infecções, dentre os quais se destacam: o sistema imunológico debilitado; uso abusivo de antimicrobianos; procedimentos médicos e cirúrgicos, principalmente os invasivos; imunossupressão (em casos de transplante de medula óssea); e, falhas nos procedimentos de controle de infecção (JENKINS, 2017). A exposição a uma ampla variedade de microrganismos patogênicos presente no ambiente hospitalar e a RA também são citados como causas da grande incidência de infecções em unidades de saúde (ZHUO *et al.*, 2023). As taxas de colonização e incidência de infecções dependem da epidemiologia local, de fatores do hospedeiro e da pressão seletiva da exposição a antimicrobianos (TIEDJE *et al.*, 2023).

De acordo com dados da OMS, aproximadamente 10 milhões de casos de IRAS têm sido anualmente notificadas, em consequência do uso indiscriminado e inadequado de antimicrobianos de amplo espectro, falta de prevenção da RA e da pressão seletiva microbiana, principalmente em países em desenvolvimento e com baixa ou média renda (WHO, 2023).

No Brasil, o Boletim Informativo de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) divulgou que as BGNs, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter spp.* (resistentes a carbapenêmicos), *Stenotrophomonas maltophilia* (resistente à fluoroquinolona), *Escherichia coli* (resistente a cefalosporinas da terceira geração e aos carbapenêmicos) e *Klebsiella pneumoniae* (resistente às cefalosporinas de terceira geração), são os principais microrganismos associados às infecções de corrente sanguínea em pacientes hospitalizados (BRASIL, 2020).

O conceito “resistências de difícil tratamento” foi designado para identificar BGNs que apresentam resistência a todas as fluoroquinolonas e a todas as categorias de beta-lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos. O retrocesso na terapia apropriada tem sido associado a piores resultados, como aumento de aproximadamente 20% no risco de mortalidade hospitalar (BASSETTI *et al.*, 2022). À medida que as bactérias se tornam mais resistentes a um maior número de antimicrobianos, as alternativas terapêuticas tornam-se cada vez mais limitadas. Atualmente, já foram identificadas bactérias multirresistentes a quaisquer dos antimicrobianos disponíveis para

tratamento, levando pacientes hospitalizados rapidamente à morte (CASPAR *et al.*, 2017).

As estratégias mais utilizadas para o combate às bactérias multirresistentes incluem o controle do uso de antimicrobianos, a fim de evitar seu uso desnecessário, e a conscientização e vigilância de condições adequadas para a prevenção e controle das IRAS. Diante do cenário atual, a OMS além de reconhecer a infecção hospitalar como uma crise de saúde pública global, preconiza que as autoridades no âmbito nacional e regional desenvolvam ações com vistas à redução do risco de aquisição das infecções, em razão do elevado custo social e econômico que representam (WHO, 2023).

Neste contexto, a Assembleia Mundial de Saúde, realizada em 2015, aprovou um Plano de Ação Global em Resistência Microbiana, cujo objetivo geral foi garantir a segurança e eficácia de medicamentos, assim como a acessibilidade a todos que deles necessitam. Um marco na política brasileira relacionada a RA, ocorreu em 2018, com a criação do Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos na perspectiva de Saúde Única. Mais recentemente, em 2019, o Grupo da Coordenação Interagências para a Resistência Antimicrobiana, criado pelo Secretário Geral das Nações Unidas, divulgou um relatório em que exige ações imediatas de diversos setores para impedir uma crise potencialmente catastrófica de RA. Neste documento, o grupo reconhece que a saúde humana, animal, ambiental e alimentar estão estreitamente interligadas, demandando uma abordagem coordenada e multisetorial de Saúde Única. Em razão da multiplicidade de fatores envolvidos, a comunidade científica vem buscando tratar o problema da resistência aos antimicrobianos pela abordagem da Saúde Única, integrando o homem-animal-ambiente (AGUIAR *et al.*, 2023).

O projeto “Fortalecimento do Sistema Brasileiro de Vigilância à Resistência Antimicrobiana” foi iniciado em 2021, e após 2 anos já contava com uma rede de 25 hospitais-sentinelas e 10 Laboratórios Centrais de Saúde Pública (Lacens) distribuídos em diferentes regiões pelo país. Treinamentos constantes são feitos para aumentar o controle de qualidade e padronizar a operação para, então, seguir ampliar a rede. As amostras (bactérias e fungos multirresistentes) de pacientes são escolhidas e enviadas para todos os Lacens. Quando os surtos são detectados alertas são feitas aos hospitais, todos os dados são lançados no sistema de vigilância brasileiro BR-GLASS (*Global Antimicrobial Resistance Surveillance System - BR-Brasil*), integrado

à OMS, para que possa ser feito um acompanhamento em tempo real. A iniciativa é liderada pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), em parceria com outras instituições como Ministério da Saúde e Anvisa. O projeto conta com o financiamento do Centros de Prevenção e Controle de Doenças dos Estados Unidos (CDC - *Centers for Diseases Control and Prevention*), e tem como objetivo principal apoiar a estruturação da Rede de Monitoramento de Resistência aos Antimicrobianos no Brasil (Fiocruz, 2023).

3.5 Segurança do alimento na cadeia alimentar

É extensa a produção científica que comprova a importância da demanda de medidas urgentes e eficazes na prevenção de RA na cadeia alimentar (WHO, 2021). Os alimentos, em especial os consumidos crus ou *in natura*, são capazes de transportar microrganismos prejudiciais à saúde, representando uma causa relevante de morbidade e mortalidade humana (CDC, 2023).

Nas últimas décadas, os sistemas de produção alimentícia mundiais se expandiram significativamente em decorrência do aumento populacional global. Neste contexto, o crescimento na disponibilidade de alimentos veio acompanhado de um emprego massivo de antimicrobianos, utilizados como agentes promotores de rendimento e produtividade (DE SOUZA *et al.*, 2023). Em que pesem as restrições impostas por governos ao redor do mundo, o consumo mundial de antimicrobianos aumentou expressivamente entre os anos 2000 e 2015 e deverá dobrar até 2030 (KLEIN *et al.*, 2018).

Já foi confirmada a associação entre o desenvolvimento de RA de agentes patogênicos humanos e o emprego de antimicrobianos na produção agropecuária, na qual os alimentos derivados de animais e plantas podem funcionar como vetores importantes para a migração de RA para microbiota humana (TIEDJE *et al.*, 2023). Assim, o uso extensivo de antimicrobianos na agricultura e na produção de animais destinados à alimentação humana, ao tornar-se uma prática comum, passou a ter grande repercussão na segurança dos alimentos e na saúde humana (AHMAD; JOJI; SHAHID, 2023).

A pecuária é considerada um dos vetores mais relevantes na propagação e desenvolvimento de RA. A administração de antimicrobianos como promotores de crescimento é particularmente preocupante porque geralmente ocorre em nível

subterapêutico, insuficiente para eliminar todas as bactérias, e se estende por longos períodos, favorecendo o desenvolvimento de bactérias resistentes. Considerando o emprego terapêutico, grande parte dos antimicrobianos comercializados são utilizados tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária, e a disseminação de bactérias entre populações humana e animal já foi comprovado (MA *et al.*, 2016).

Em alimentos de origem animal, a transmissão de RA geralmente é associada ao consumo da carne, leite e derivados; entretanto, resíduos de antimicrobianos gerados podem deslocar-se por caminhos intrincados, possibilitando que genes associados à RA entrem na cadeia alimentar a partir do solo (biofertilizantes), ar (bioaerossóis), água (irrigação, efluentes, esgotos e recursos naturais) e/ou contaminação fecal direta (BENLABIDI *et al.*, 2023; WU *et al.*, 2023). Além disso, o uso de antimicrobianos em produtos de origem animal que também são empregados na medicina humana pode levar ao desenvolvimento de resistência cruzada (TIEDJE *et al.*, 2023).

3.6 Queijos

O queijo pode ser descrito como um concentrado protéico-gorduroso obtido a partir da separação do soro do leite pela coagulação promovida por enzimas específicas. Em função de suas características sensoriais e nutritivas, trata-se de um derivado lácteo bastante tradicional, mundialmente consumido em diversas variedades de tipo, sabor, cor, forma e aroma, obtidas de diferentes tipos de leite e processos de produção. A produção de queijos representa uma das atividades mais relevantes das indústrias de laticínios no Brasil, sendo o país o quinto maior produtor mundial, com uma produção de cerca de 790 mil toneladas em 2022 (LEITE, 2021).

Rico em nutrientes como cálcio, fósforo, vitaminas B12 e A, iodo e zinco, o queijo também constitui uma importante fonte proteica, sendo bastante consumido pela população brasileira (KAMIMURA *et al.*, 2019). O queijo é bastante disseminado nos costumes alimentares da população brasileira, compondo parcela relevante dos hábitos e da cultura nacional. Dentre os queijos brasileiros mais produzidos, destacam-se o muçarela, prato, minas e os queijos artesanais, elaborados a partir de diversas variedades regionais. O consumo anual de queijo no Brasil, segundo dados da Associação Brasileira das Indústrias de Queijo (ABIQ) totalizou cerca de 5,6 kg per capita em 2021, e vem crescendo longo dos anos (ABIQ, 2022).

Recomendado nas diretrizes alimentares nacionais para a população brasileira, diversos tipos de queijo compõem cardápios hospitalares no país, diversificando conforme o estado de saúde, as necessidades nutricionais e preferências alimentares dos pacientes internados (BRASIL, 2014). Embora os serviços de alimentação de hospitais assegurem a oferta de queijos produzidos com leite pasteurizado e com selos de segurança, é importante salientar que o processo térmico de pasteurização em leites utilizado para produção de laticínios não garante a completa erradicação de toda microbiota de BGNs patogênica (MACHADO *et al.*, 2023).

Embora existam regras que preveem que o leite usado na elaboração dos queijos industrializados seja pasteurizado, é comum a comercialização de queijos que não cumpram estas exigências, ou mesmo o façam de forma incorreta. Fatores como condições inadequadas de manufatura e conservação; temperaturas impróprias e eventual contaminação ocorrida depois da pasteurização também podem comprometer a qualidade dos queijos produzidos (SALOTTI *et al.*, 2022).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil de resistência aos antimicrobianos em microbiota Gram-negativa cultivável, principalmente Enterobacterales, de queijos servidos a pacientes internados em um hospital público do município Rio de Janeiro.

4.2 Objetivos específicos

- Recuperar microbiota Gram-negativa cultivável proveniente das amostras coletadas;
- Determinar as características fenotípicas de resistência antimicrobiana da microbiota Gram-negativa;
- Comparar os resultados da interpretação dos diâmetros do halo de inibição conforme os pontos de corte estabelecidos pelo CLSI e BrCAST;
- Verificar a presença de genes de resistência aos antimicrobianos nas BGNs isoladas.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Amostra

As amostras de queijo foram fornecidas pelo serviço de nutrição de um hospital público especializado em oncologia localizado na cidade do Rio de Janeiro–RJ. Os queijos fazem parte do cardápio habitual da Unidade de Alimentação e Nutrição (UAN) e seriam fornecidos aos pacientes internados, sem tratamento térmico, antes de ser servido. Foram coletados os 4 tipos de queijos, sendo que para cada tipo de queijo foram coletadas duas amostras, totalizando oito amostras. As coletas foram feitas em períodos diferentes a fim de obter marcas ou, ao menos, lotes diferentes. Os tipos de queijo disponíveis para coleta foram: *cottage*, ricota, minas frescal e minas padrão. As amostras obtidas apresentavam as seguintes características, por tipo de queijo: mesma marca comercial e lotes distintos; mesma quantidade nas embalagens originais (250g e 500g); produzidas a partir de leite pasteurizado por empresas de laticínios do estado de Minas Gerais.

Todas as amostras estavam em câmaras refrigeradas de armazenamento de produtos de pronto uso, as quais possuíam registros de temperatura dentro do recomendado; sem alterações visíveis e sinais de deterioração; dentro do prazo da validade; em embalagens originais e lacradas. Após coleta, as amostras foram acondicionadas e transportadas para o laboratório em recipiente térmico, mantendo temperatura de superfície menor ou igual a 8 °C (verificadas no início e final do transporte), sendo transportadas em período inferior a 2 horas. As análises foram realizadas no Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos da Escola de Nutrição (LACOMEN) pertencente e localizado na Escola de Nutrição da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO).

5.2 Preparo das amostras

As embalagens das amostras de queijos foram previamente desinfetadas com álcool 70%. As amostras foram homogeneizadas dentro da embalagem original com auxílio de espátula estéril. Os queijos mais “duros” foram retirados partes do centro e das laterais para homogeneização.

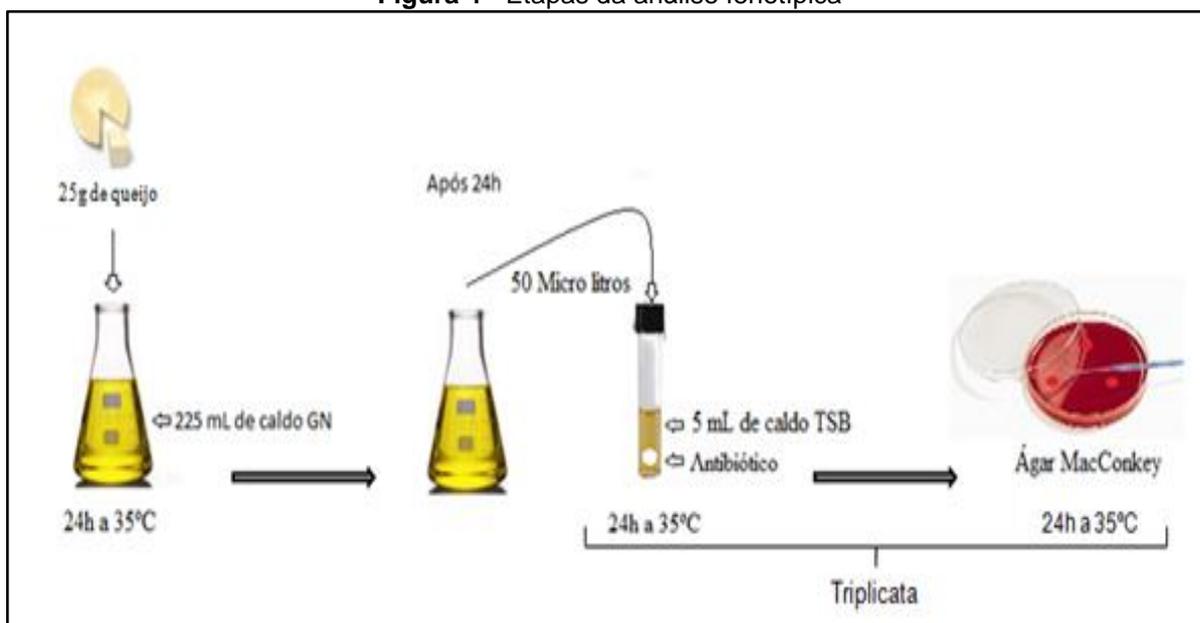
5.3 Etapa de cultivo e pré-seleção de MGNs resistentes

As análises foram realizadas conforme a metodologia descrita por Silva *et al.* (2020) que se baseou no método preconizado pelo CDC (2009) (Figura 4). Foram colocados 25,0g \pm 0,2g de amostra em 225 mL de caldo Gram-negativo, que tem por finalidade o enriquecimento seletivo de BGNs (HIMEDIA, 2011). Posteriormente, foram incubados à 35 °C \pm 2 °C para pré-enriquecimento por 24 horas. Após este período, seguiu-se para a etapa de pré-seleção da MGN resistente, na qual o disco de antimicrobiano (Oxoid, Reino Unido) foi adicionado em tubos contendo 50 microlitros do caldo enriquecido com MGN e 5 mL de caldo tripton de soja – TSB. Foram definidos onze tipos de antimicrobianos, considerando a alta importância clínica e a ampla utilização na medicina veterinária e produção animal (BASSETTI; GARAU, 2021). Os antimicrobianos testados foram: ampicilina (10 μ g), ampicilina-sulbactam (10/10 μ g), ceftazidima (30 μ g), cefepima (30 μ g), ertapenem (10 μ g), aztreonam (30 μ g), gentamicina (10 μ g), cloranfenicol (30 μ g), tetraciclina (30 μ g), ciprofloxacina (5 μ g) e sulfametoxazol-trimetoprima (1.25/23.75 μ g). Toda a etapa de pré-seleção foi realizada em triplicata para cada antimicrobiano testado.

5.4 Seleção de MGNs resistentes

Após o intervalo de 24 horas para o esperado crescimento da MGN, os tubos que indicaram turbidez (indicando crescimento) foram qualificados para próxima avaliação da resistência antimicrobiana. Em placa de ágar MacConkey foi inoculada uma alçada (10 microlitros) do inóculo da MGN, de maneira a formar superfície homogênea, um meio diferencial e seletivo para microbiota GN fermentadora de lactose. O disco de antimicrobiano, respectivos aos utilizados nos tubos na fase de pré-seleção, foram novamente aplicados na superfície da placa recém-semeada; em seguida, a placa foi levada à estufa a 35 °C \pm 2 °C por 16-18 horas (SILVA *et al.*, 2020; CDC, 2019; CLSI, 2018). Essa etapa foi realizada para todas as MGNs qualificadas.

Figura 4 - Etapas da análise fenotípica



Fonte: Silva *et al.* (2020)

5.5 Caracterização da resistência fenotípica

Após o período de incubação, os diâmetros dos halos de inibição das MGNs foram medidos para cada antimicrobiano testado. Apesar da metodologia descrita neste estudo não seguir os padrões publicados pelo CLSI, para a categorização de sensibilidade das MGNs foram utilizados como referência os pontos de corte do CLSI para a ordem Enterobacterales. As MGNs foram categorizadas em: sensível (S), intermediária (I) ou resistente (R) ao antimicrobiano (CLSI, 2022). Após etapa de medição dos halos, as culturas das MGNs qualificadas foram transferidas para microtubos utilizando alça de inoculação, contendo uma mistura de glicerol estéril e TSB (cultura estoque). Após devidamente identificadas por tipo de amostra e antimicrobiano, foram homogeneizadas em vórtex e mantidas e então congelados.

Os resultados das categorizações obtidas pelo CLSI (2022) foram comparados com a interpretações dos pontos de corte das categorizações obtidas pelo BrCAST (BRCAST, 2022) (Tabela 2). Para esta comparação foram excluídos os antimicrobianos que não tinham pontos de corte estabelecidos por ambos os comitês (n=1-tetraciclina) e os que foram suscetíveis no pré-teste (n=5).

Tabela 2 - Pontos de corte interpretativos da ordem Enterobacterales – CLSI E BRCAST

| Antimicrobiano | Conteúdo disco (µg) | Pontos de corte para halo de inibição (mm) | | | | | |
|----------------------------------|---------------------|--|--------------------|------|--------|-------|------|
| | | CLSI | | | BrCAST | | |
| | | R | I | S | R | I | S |
| Ertapenem | 10 | ≤ 18 | 19-21 | ≥ 22 | < 25 | - | ≥ 25 |
| Cefepima | 30 | ≤ 18 | 19-24 ¹ | ≥ 25 | < 24 | 24-26 | ≥ 27 |
| Ceftazidima | 30 ² | ≤ 17 | 18-20 | ≥ 21 | < 19 | 19-21 | ≥ 22 |
| Ampicilina-Sulbactam | 10/10 | ≤ 11 | 12-14 | ≥ 15 | < 14 | - | ≥ 14 |
| Ampicilina | 10 | ≤ 13 | 14-16 | ≥ 17 | <14 | - | ≥ 14 |
| Aztreonam | 30 | ≤ 17 | 18-20 | ≥ 21 | < 21 | 21-25 | > 26 |
| Gentamicina | 10 | ≤ 12 | 13-14 | ≥ 15 | < 17 | - | ≥ 17 |
| Tetraciclina | 30 | ≤ 11 | 12-14 | ≥ 15 | - | - | - |
| Ciprofloxacina | 5 | ≤ 20 | 21-30 | ≥ 31 | < 22 | 22-24 | ≥ 25 |
| Sulfametoxazol - Trimetoprima | 1,25/ 23,75 | ≤ 10 | 10-15 | ≥ 16 | < 11 | 11 | ≥ 14 |
| Cloranfenicol | 30 | ≤ 12 | 13-17 | ≥ 18 | < 17 | - | ≥ 17 |

Fonte: Dados extraídos de CLSI (2022) e BrCAST (2022). Legenda: (1) cefepima - 30µg – SDD (Dose– Dependente - Susceptível); (2) Ceftazidima - conteúdo do disco é 10µg para BrCAST. Legendas: (Q1 e Q5) Queijo ricota; (Q2 e Q6) Queijo cottage; (Q3 e Q7); Queijo minas padrão e (Q4 e Q8) Queijo minas frescal;(R) Resistente; (I) Intermediário, de acordo com CLSI e Sensível, aumentando exposição, de acordo com BrCAST; (S) – Sensível, dose padrão; “-” ponto de corte não determinado.

5.6 Avaliação da resistência genotípica

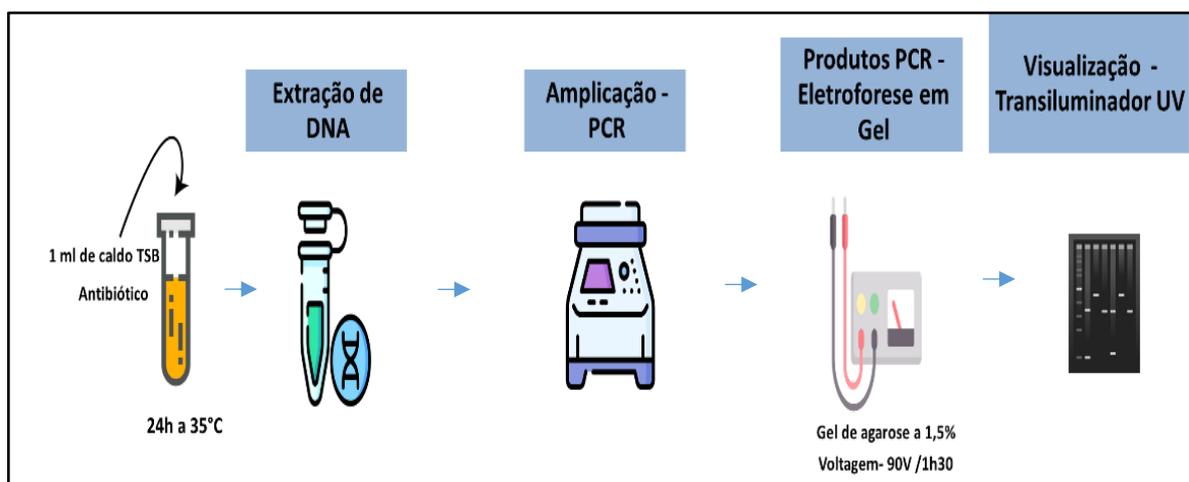
Todas as etapas da fase de análise da avaliação da resistência genotípica encontram-se descritas na figura 5.

5.6.1 Extração de material genético - DNA

Para esta etapa 100 µL da cultura estoque foram transferidos para um microtubo contendo 1 mL de TSB acrescido do disco do antimicrobiano correspondente. Os microtubos foram incubados em estufa a 35 °C ± 2 °C por 16-18

horas (SILVA et al., 2020). Após este período foi realizado a extração do DNA utilizando 1mL da cultura.

Figura 5 – Análise da avaliação da resistência genotípica



Fonte imagens: site Flaticob (<https://www.flaticon.com/br/>).

A extração de DNA genômico das MGNs, classificadas como resistentes e/ou intermediárias na análise fenotípica, seguindo as instruções do fabricante do kit comercial para extração de DNA genômico de bactérias Gram-negativas EasyPure® Genomic DNA Kit (TransGEN, Pequim, China). Na tabela 3 estão descritos os componentes e conteúdo utilizados em cada etapa da extração.

Tabela 3 - Componentes e conteúdo do kit comercial utilizados em cada extração.

| Componente | Conteúdo/extração |
|--|-------------------|
| Tampão de Lise (LB2) | 100 µL |
| Proteinase K | 20 µL |
| RNase A | 20 µL |
| Tampão de ligação 2 (BB2) | 500 µL |
| Limpe o tampão 2 (CB2) | 500 µL |
| Tampão de Lavagem 2 (WB2) | 500 µL |
| Tampão de eluição (EB) | 200 µL |
| Coluna de rotação genômica com tubos de coleta | 1 unidade |

Legenda: Após adição de cada componente seguia um processo de centrifugação ou inoculação; µL (microlitros).

5.6.2 Identificação de gene por reação em cadeia da polimerase - PCR

Foi realizada a amplificação de fragmentos do DNA por PCR (do inglês: *Polymerase Chain Reaction*), a partir de primers específicos sintetizados pela *Eurofins Genomics* (Ebersberg, Alemanha) e *Invitrogen Thermo Fisher Scientific* (Califórnia,

Estados Unidos), com base nos respectivos protocolos das sequências de nucleotídeos publicados previamente (Tabela 4). O volume final estabelecido para cada reação foi de 25 µL, contendo tampão de PCR 10x adicionado de MgCl₂, Taq DNA polimerase recombinante, conjunto de deoxinucleotídeo trifosfato (dNTP), um par de iniciadores (primer), DNA extraído da amostra e água ultra-pura.

Treze elementos de resistência a antimicrobianos foram selecionados e separados em: codificadores de resistência beta-lactâmicos (*shv*, *tem*, *ctx* e *oxa*), tetraciclinas (*tetA* e *tetB*), carbapenêmicos (*oxa-48* e *kpc*), resistência plasmidial a colistina (*mcr-1*) e resistência aos quaternários de amônio (*qacΔE1*) e *integrons* (*int-1*, *int-2* e *int-3*). O rastreio por PCR foi feito em todas MGNs resistentes e/ou intermediárias selecionadas, exceto para os genes *tetA* e *tetB*, rastreados somente em MGNs categorizadas como resistentes e/ou intermediárias ao antimicrobiano tetraciclina. O rastreio dos genes *shv*, *tem* e *oxa* foram feitas por PCR multiplex.

As MGNs BGNs utilizadas como controles positivos foram obtidas de amostras de diferentes tipos de queijo comercializados no Rio de Janeiro (SILVA, 2022; SILVA et al, 2020) e de amostras de cepas de BGNs de análises clínicas do Hospital Universitário Gaffrée e Guinle (HUGG-Unirio). Para o controle negativo foi utilizado água estéril. As amplificações de DNA foram realizadas no termociclador *LifeTouch Thermal Cycler* (BIOER, China).

1.1.1 Visualização dos fragmentos de DNA

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, em tampão Tris-borato EDTA (Promega, EUA), com uso de corante Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia, Brasil) e marcadores de peso molecular (100 pb DNA Ladder – Invitrogen, EUA) a uma voltagem de 90V Gel, por, em média, 1h30min. A visualização das bandas no gel foi realizada em transiluminador de ultravioleta (Forlab, Brasil).

Tabela 4 - Sequência de nucleotídeos, ciclos, tamanho dos genes e referências.

| Primer | Sequência dos iniciadores (5' - 3') | Ciclos | Pb ¹ | Referências |
|---|--|---|-----------------|---------------------------------------|
| tem -1/tem -2 e variantes ² | CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC (R) CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC (F) | 10 min a 94°C; 30 ciclos de 40s a 94°C, 40 s a 60°C, 60 s a 72°C; e 7 min de extensão final a 72°C | 800 | DALLENNE <i>et al.</i> (2010) |
| Shv-1 e variantes ² | AGCCGCTTGAGCAAATTAAC (R) ATCCCGCAGATAAATCACCA (F) | 713 | 713 | |
| oxa1, oxa4 e oxa30 ² | GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG (R) GGCACCAGATTCAACTTTCAAG (F) | 564 | 564 | |
| int - 1 | CTGCGTTCGGTCAAGTTCT (R) GGAATGGCCGAGCAGATCCT(F) | 03min a 94°C; 35 ciclos de 60s a 94°C, 60s a 68°C, 60 s a 72°C; e 7min de extensão final a 72°C. | 882 | |
| int - 2 | CACGGATATGCGACAAAAAGG (R) GTAGCAAACGAGTGACGAAATG (F) | 03 min a 94°C; 35 ciclos de 60s a 94°C, 60s a 68°C, 60 s a 72 °C; e 7 min de extensão final a 72 C. | 788 | LANZ <i>et al.</i> (2003) |
| int - 3 | GCCTCCGGCAGCGACTTTTCAG (R) ACGGATCTGCCAAACCTGACT (R) | 03 min a 94 °C; 35 ciclos de 60s a 94°C, 60 s a 68 °C, 60 s a 72°C; e 7 min de extensão final a 72°C. | 979 | |
| ctx | ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC (R) TGGGTRAARTARSTSACCAGAAYCAGCGG(F) | 15 min a 95°C; 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 60°C, 2 min a 72°C; e 10 min de extensão final a 72°C. | 593 | MONSTEIN <i>et al.</i> (2007) |
| kpc | GTATCGCCGTCTAGTTCTGC (R) GGTCGTGTTTCCCTTTAGCC (F) | 05 min a 95 °C; 30 ciclos de 60 s a 95°C, 60 s a 56 °C, 60 s a 72°C; e 05 min de extensão final a 72°C. | 635 | AZIMI <i>et al.</i> (2013) |
| oxa-48 | GCGTGTTAAGGATGAACAC (R) CATCAAGTTCAACCCAACCG (F) | 10 min a 94 °C; 36 ciclos de 30 s a 94°C, 40 s a 54 °C, 50 s a 72°C; e 05 min de extensão final a 72°C. | 438 | POIREL <i>et al.</i> (2011) |
| tetA | GGCCTCAATTCCTGACG (R) AAGCAGGATGTAGCCTGTGC (F) | 01 min a 94 °C; 30 ciclos de 60 s a 94°C, 60 s a 55°C, 2 min a 72°C; e 10 min de extensão final a 72°C. | 372 | GUILLAUME <i>et al.</i> (2000) |
| tetB | GAGACGCAATCGAATTCGG (R) TTTAGTGGCTATTCTTCCTGCC (F) | 01 min a 94°C; 30 ciclos de 60 s a 94°C, 60 s a 56°C, 2 min a 72°C; e 10 min de extensão final a 72°C | 228 | |
| qacEA1 | AATCCATCCCTGTCCGGTGTT (R) CGCAGCGACTTCCACGATGGGGAT(F) | 05 min - 94 °C; 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 56°C, 30s a 72°C; e 7 min de extensão final a 72°C | 175 | GUO <i>et al.</i> (2015) |
| mcr-1 | ATTATCCGACTTGGGGCAAGG (R) CGCACGATGTGACATTGCTAA (F) | 15 min - 94°C; 25 ciclos de 30s a 94°C, 90s a 58°C, 60s a 72°C; e 10min de extensão final a 72°C | 309 | CAVACO; MORDHORST; HENDRIKSEN, (2016) |

Legenda: (1) pb: pares de base; (2) tem, shv e oxa (PCR multiplex); C. S = g ou c; Y = c ou t; M = a ou c.

6 RESULTADOS

6.1 Resistência Fenotípica

6.1.1 Avaliação da etapa pré-seleção

A partir da coleta de oito amostras de queijo e onze antimicrobianos testados, inicialmente 88 (8×11) combinações foram testadas. A figura 4 ilustra a detecção de turbidez na etapa de pré-seleção.

Figura 6 - Registro fotográfico da etapa de pré-seleção.



Legenda: Tubos da etapa de pré-seleção, exibindo crescimento microbiano (turbidez) após a incubação na presença de tetraciclina. O último tubo (à direita) é um tubo não inoculado, para comparação.

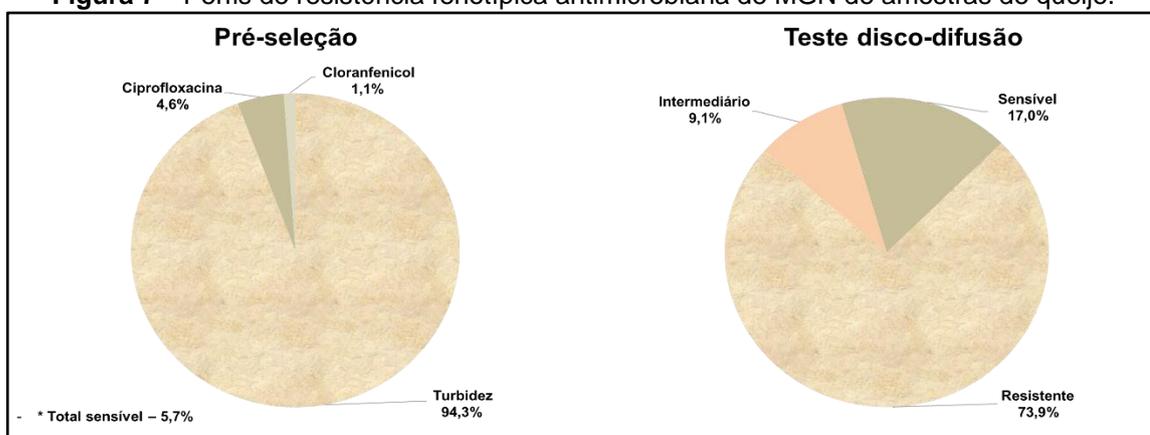
Na etapa de pré-seleção, 83 amostras (94,3%) apresentaram turbidez, indicando o crescimento e a sobrevivência de MGNs mesmo sob influência do antimicrobiano (Figura 6). As cinco microbiotas que não conseguiram se desenvolver mostraram sensíveis à apenas dois tipos de antimicrobiano: cloranfenicol (20%) e ciprofloxacina (80%) (Figura 7).

6.1.2 Avaliação do teste disco-difusão

As MGNs das amostras de queijo mantiveram perfil de resistência elevado quando avaliado por disco-difusão (82,9%) (Figura 8). Somente quinze MGNs foram

categorizadas como sensíveis, sendo dez, na interpretação dos pontos de corte do CLSI, e as outras cinco, na pré-seleção (Figura 7).

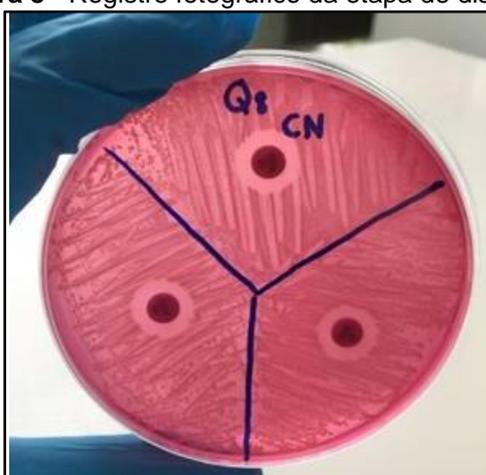
Figura 7 - Perfis de resistência fenotípica antimicrobiana de MGN de amostras de queijo.



Fonte: Este estudo.

Oito (9,1%) das MGNs analisadas foram categorizadas como intermediária. O antimicrobiano cloranfenicol apresentou percentual de categorização intermediário em maior frequência (37,5%) (Tabela 5). A distribuição das categorias fenotípica (88 MGNs) por amostras de queijo e antimicrobiano testado está exposta na tabela 6.

Figura 8 - Registro fotográfico da etapa de disco difusão



Legenda: Amostra Q8 – Gentamicina.

Todas as MGNs testadas foram completamente resistentes (100%) a três antimicrobianos (ampicilina, ampicilina-sulbactam e gentamicina). Ainda foi observada alta frequência de resistência das MGNs aos antimicrobianos ceftazidima e tetraciclina (87,5%), seguidos pelo ertapenem e trimetoprima-sulfametoxazol, com 75%.

Tabela 5 - Perfis de resistência antimicrobiana de MGN de amostras de queijo

| Antimicrobiano | Resistente | Intermediário | Sensível |
|-----------------------------|------------|---------------|----------|
| Ertapenem | 75,0% | 0,0% | 25,0% |
| Cefepima | 50,0% | 12,5% | 37,5% |
| Ceftazidima | 87,5% | 12,5% | 0,0% |
| Ampicilina-Sulbactam | 100,0% | 0,0% | 0,0% |
| Ampicilina | 100,0% | 0,0% | 0,0% |
| Aztreonam | 62,5% | 0,0% | 37,5% |
| Gentamicina | 100,0% | 0,0% | 0,0% |
| Tetraciclina | 87,5% | 0,0% | 12,5% |
| Ciprofloxacina | 25,0% | 12,5% | 62,5% |
| Trimetoprima-Sulfametoxazol | 75,0% | 12,5% | 12,5% |
| Cloranfenicol | 50,0% | 12,5% | 37,5% |

Mais da metade das MGNs (62,5%) apresentaram resistência ao antimicrobiano aztreonam. O antimicrobiano mais eficaz foi a ciprofloxacina, para o qual as MGNs apresentaram 62,5% de sensibilidade.

Tabela 6 - Distribuição das categorias fenotípica por amostras de queijo e antimicrobiano

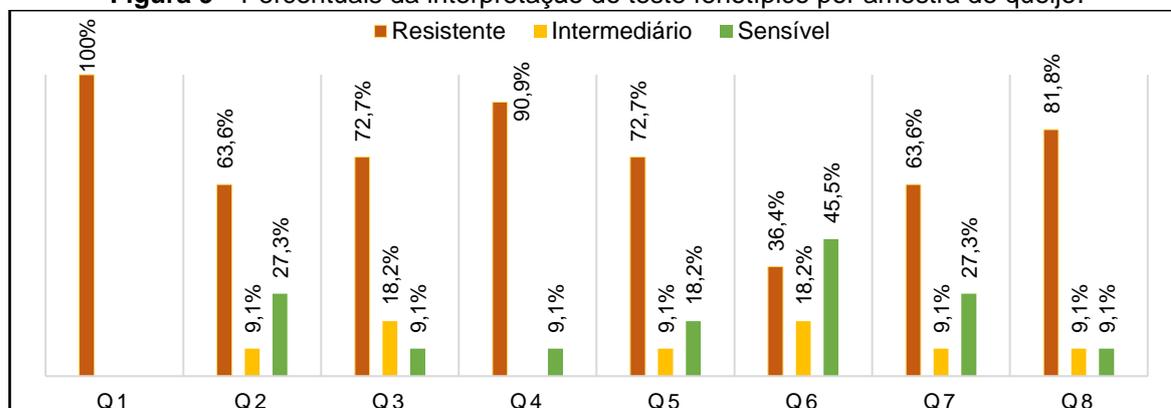
| Antimicrobianos | Amostras | | | | | | | |
|-----------------------------|------------|---------------|---------------|------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | Q1 | Q2 | Q3 | Q4 | Q5 | Q6 | Q7 | Q8 |
| Ertapenem | Resistente | Resistente | Resistente | Resistente | Resistente | Sensível | Sensível | Resistente |
| Cefepima | Resistente | Resistente | Intermediário | Resistente | Resistente | Sensível | Sensível | Sensível |
| Ceftazidima | Resistente | Intermediário | Resistente | Resistente | Resistente | Resistente | Resistente | Resistente |
| Ampicilina-Sulbactam | Resistente | Resistente | Resistente | Resistente | Resistente | Resistente | Resistente | Resistente |
| Ampicilina | Resistente | Resistente | Resistente | Resistente | Resistente | Resistente | Resistente | Resistente |
| Aztreonam | Resistente | Sensível | Resistente | Resistente | Sensível | Sensível | Resistente | Resistente |
| Gentamicina | Resistente | Resistente | Resistente | Resistente | Resistente | Resistente | Resistente | Resistente |
| Tetraciclina | Resistente | Resistente | Resistente | Resistente | Resistente | Sensível | Resistente | Resistente |
| Ciprofloxacina | Resistente | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Sensível | Intermediário |
| Trimetoprima-Sulfametoxazol | Resistente | Resistente | Resistente | Resistente | Intermediário | Intermediário | Resistente | Resistente |
| Cloranfenicol | Resistente | Sensível | Intermediário | Resistente | Resistente | Intermediário | Intermediário | Resistente |

Legenda : Resistente ■ Intermediário ■ Sensível ■ ;
(Q1 e Q5) Queijo ricota; (Q2 e Q6) Queijo cottage; (Q3 e Q7); Queijo minas padrão e (Q4 e Q8) Queijo minas frescal.

O percentual de resistência aos antimicrobianos testados por amostra de queijo variou de 36,4% a 100%. Cada amostra de queijo foi resistente a pelo menos 4 dos

11 antimicrobianos testados. A microbiotas de uma amostra de queijo mostrou resistência a todos os antimicrobianos testados (FIGURA 6).

Figura 9 - Percentuais da interpretação do teste fenotípico por amostra de queijo.



Legenda: (Q1 e Q5) Queijo ricota; (Q2 e Q6) Queijo cottage; (Q3 e Q7); Queijo minas padrão e (Q4 e Q8) Queijo minas frescal.

6.2 Comparação CLSI e BrCAST

O resultado da interpretação dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos obtidas neste estudo por CLSI, foi comparado com resultado dos parâmetros do padrão nacional BrCAST. As variações de categorização clínica decorrentes das diferenças entre os critérios dos comitês estão expostas na tabela 7.

Os percentuais de resistência foram altos para ambos os critérios, mas seriam ainda maiores se fossem adotados os pontos de corte do BrCAST, que categorizou como resistente 84% das MGNs, enquanto o CLSI, 77,3%. As maiores concordâncias foram nas categorias S e R. Todas as discrepâncias entre as interpretações BrCAST e CLSI foram observadas na categoria intermediária.

Tabela 7 - Categorias discrepantes de acordo com a interpretação CLSI e BrCAST.

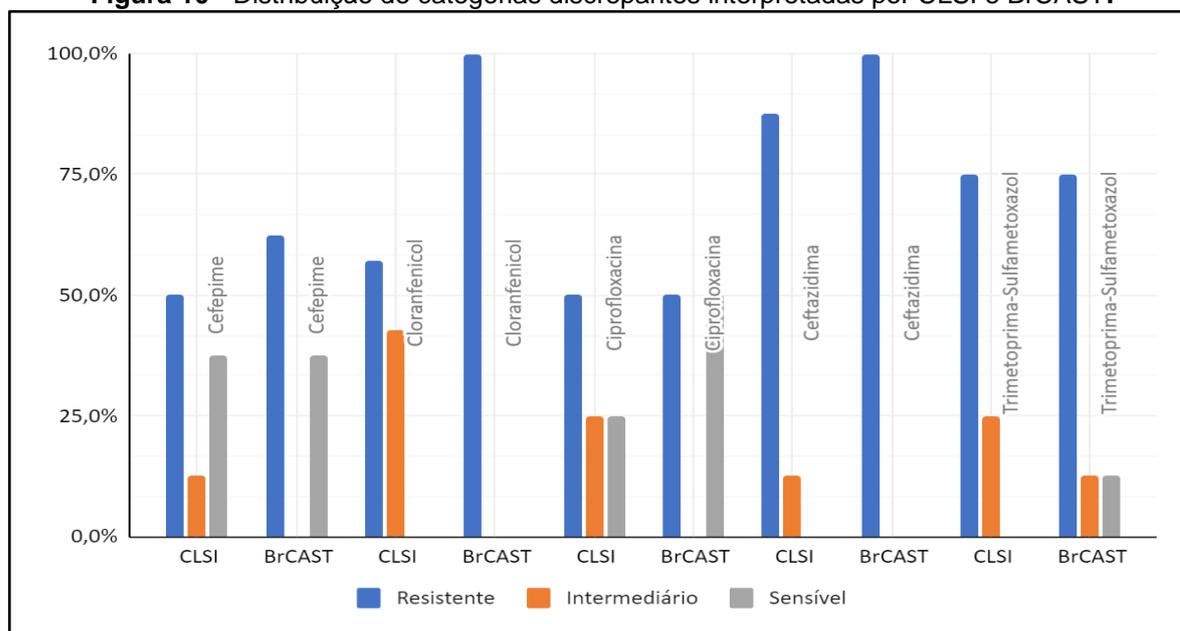
| Amostras | Antimicrobianos | | | | |
|----------|-----------------|-------------|----------------|---------------|-----------------------------|
| | Cefepima | Ceftazidima | Ciproflaxacina | Cloranfenicol | Trimetoprima-sulfametoxazol |
| Q2 | - | I / R | - | - | - |
| Q3 | I / R | - | - | I / R | - |
| Q5 | - | - | - | - | I / S |
| Q6 | - | - | - | I / R | I / R |
| Q7 | - | - | - | I / R | - |
| Q8 | - | - | I / R | - | - |

Legenda: Ordem apresentação CLSI/BRCAST. (R) Resistente; (I) Intermediário; (S) Sensível, dose padrão. (-) não houve discrepância.

Segundo os parâmetros do BrCAST, apenas 1,3% das MGNs seriam classificadas como intermediária, enquanto o CLSI classificou 10,7% das MGNs nesse grupo. Essa discrepância ocorreu em oito MGNs, sendo sete na categoria intermediária no CLSI e resistente no BrCAST. Somente um MGN categorizada como intermediária no CLSI foi considerada sensível pelo BrCAST (em destaque na Tabela 7).

As interpretações baseadas nos valores de pontos de corte foram discrepantes para cinco antimicrobianos, sendo estes ceftazidima, cefepima, cloranfenicol, ciprofloxacina, sulfametoxazol-trimetoprima. A ceftazidima (12,5%), cefepima (12,5%), cloranfenicol (42,9%) e ciprofloxacina (25%) apresentaram modificações da categoria intermediária para categoria resistente no BrCast, enquanto a sulfametoxazol-trimetoprima (12,5%) foi o único antimicrobiano que apresentou modificação de intermediário para sensível (Figura 10).

Figura 10 - Distribuição de categorias discrepantes interpretadas por CLSI e BrCAST.



Fonte: Este estudo.

6.3 Resistência Genotípica

A partir das eliminações das etapas anteriores, foram submetidas a extração de DNA as 73 MGNs que indicaram algum mecanismo de resistência aos antimicrobianos selecionados. Na subsequente etapa de PCR, ocorreu a amplificação de elementos genéticos selecionados em 23 MGNs (31,5%), num total de 44

amplicons. Foram encontrados sete elementos de resistência diferentes, sendo eles: codificadores de resistência (*ctx*, *shv*, *tem*, *tetA* e *tetB*) e *integrans* (*int-1*, *int-2*) (Tabela 8).

Tabela 8 - Percentual e valores absolutos de GRA por amostras de queijo e MGNs.

| Genes | Amostras | MGNs¹ |
|--------------------------|-----------------|-------------------------|
| <i>int-1</i> | 50,0% (4/8) | 11% (8/73) |
| <i>int-2</i> | 50,0% (4/8) | 8,2% (6/73) |
| <i>ctx</i> | 37,5% (3/8) | 5,5% (6/73) |
| <i>shv</i> | 37,5% (3/8) | 6,8% (6/73) |
| <i>tem</i> | 62,5% (5/8) | 9,6% (6/73) |
| <i>tetA</i> ² | 12,5% (1/8) | - |
| <i>tetB</i> ² | 37,5% (3/8) | - |

Legenda: ¹microbiota Gram-negativa; ² somente foi testado para tetraciclina.

Os codificadores de resistência genotípicos relacionados aos antimicrobianos beta-lactâmicos (*ctx*, *shv*, *tem*) e à tetraciclina (*tetA* e *tetB*) estavam distribuídos entre 20 microbiotas que conferiam resistência a diferentes classes de antimicrobianos. Em contrapartida, codificadores de: beta-lactamase (*oxa*), carbapenemases (*kpce* e *oxa-48*), resistência a sais de amônio quaternário (*qacEΔ1*) e resistência plasmidial à colistina (*mcr-1*) não foram amplificados em nenhum genoma das MGNs.

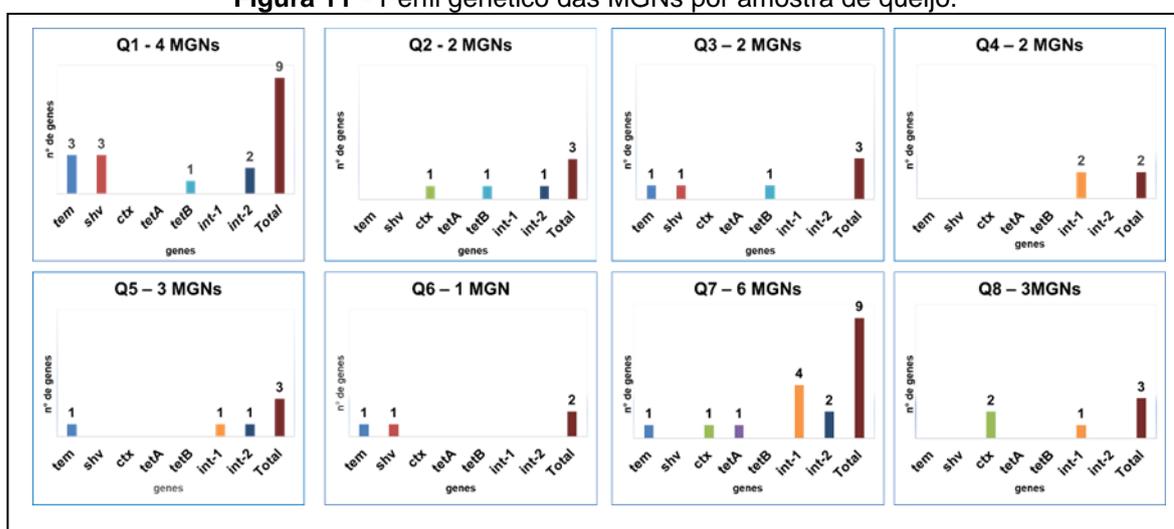
Todas as amostras apresentaram pelo menos um elemento genético de resistência, podendo ser gene codificador de resistência ou *integron*. A maioria das amostras (75%) alojava de dois a quatro elementos genéticos. Uma amostra de queijo se destacou por abrigar cinco elementos genéticos distintos, sendo dois deles *integrans*. Essa amostra também apresentou a maior diversidade de resistência, se mostrando resistente a seis dos 11 antimicrobianos estudados; e a maior quantidade de *integrans* classe 1 (Tabela 9).

A presença do *integron*, um sistema genético crítico, foi avaliada em todos os genomas para as três classes de *integron* documentadas. O total de 14 MGNs continham *integrans* das classes 1 e 2, sendo os mais prevalentes entre os elementos de resistência detectado (41,2%). Somente duas amostras não apresentaram *integrans* e a presença do *integron* de classe 3 não foi detectada.

Os *integrons* não estavam compondo somente o perfil genético de resistência das MGNs com caracterização genética resistentes à tetraciclina. Entre seis antimicrobianos foi observada MGNs com perfil genético de somente *integrons*, com predominância do *integron* de classe 1 em quatro deles (75%), enquanto duas classes de *integrons* (classe 1 e 2) foram detectadas na caracterização do perfil genético de MGNs relacionadas a dois antimicrobianos, ampicilina e sulfametoxazol-trimetoprima.

Entre as MGNs resistentes analisadas por PCR, 21,9% (16/73) apresentaram a presença de ao menos um gene codificador de beta-lactamase. Ocorreu a predominância do gene *tem* (63%), seguido por *ctx* e *shv*, que apresentaram o mesmo percentual (38%).

Figura 11 - Perfil genético das MGNs por amostra de queijo.



Fonte: Este estudo.

Importante ressaltar que uma das MGNs que carregava o gene *tem* apresentou resistência intermediária ao antimicrobiano sulfametoxazol-trimetoprima pelo CLSI. No entanto, na interpretação do ponto de corte do BrCAST, foi classificada como sensível, indicando o uso do antimicrobiano em questão, em dose padrão.

Tabela 9- Perfil genotípico das MGNs de amostras de queijo por antimicrobiano.

| Amostras | Ertapenem | Cefepima | Ceftazidima | Ampicilina-sulbactam | Ampicilina | Aztreonama | Gentamicina | Tetraciclina | Ciprofloxacina | Trimetoprima-Sulfametoxazo | Cloranfenicol |
|----------|--------------|--------------|--------------|--------------------------|--|------------|--------------|---------------------------|----------------|--|---------------|
| Q1 | - | - | - | <i>shv</i> <i>tem</i> | <i>int-2</i> <i>shv</i> <i>tem</i> | - | - | <i>tetB</i> | - | <i>int-2</i> <i>shv</i> <i>tem</i> | - |
| Q2 | - | <i>int-2</i> | - | - | - | * | - | <i>ctx</i> <i>tetB</i> | * | - | * |
| Q3 | - | - | - | - | <i>shv</i> <i>tem</i> | - | - | <i>tetB</i> | - | - | - |
| Q4 | <i>int-1</i> | - | - | - | - | - | - | - | * | <i>int-1</i> | - |
| Q5 | - | - | - | - | <i>int-2</i> | * | - | - | * | <i>tem</i> | <i>int-1</i> |
| Q6 | * | * | - | <i>shv</i> <i>tem</i> | - | * | - | * | * | - | - |
| Q7 | * | * | <i>int-1</i> | <i>int-2</i> | <i>int-1</i> <i>int-2</i> | - | <i>int-1</i> | <i>ctx</i> <i>tetA</i> | * | <i>int-1</i> <i>tem</i> | - |
| Q8 | <i>int-1</i> | * | - | <i>ctx</i> | <i>ctx</i> | - | - | - | - | - | - |

Legenda: (Q) queijo; (*) MGNs classificadas como sensíveis na etapa de caracterização fenotípica; (-) Ausência dos genes investigados.

Das sete diferentes MGNs em que o gene *tem* foi detectado, cinco apresentavam coexistência com o gene *shv*, sendo três de uma única amostra de queijo. Outro ponto de destaque, foi a detecção do gene em MGN resistente ao antimicrobiano não beta-lactâmico sulfametoxazol-trimetoprima, assim como o gene *ctx* foi principalmente detectado em MGNs resistentes à tetraciclina. Do total de amostras analisadas, 13% e 38%, abrigavam os genes *tetA* e *tetB*, respectivamente.

7 DISCUSSÃO

7.1 Caracterização fenotípica

Para além dos problemas relacionados aos perigos microbianos, como a deterioração dos alimentos e doença infecciosa primária, a presença de microrganismos com características de RA em alimentos está fortemente associada à segurança dos alimentos. O consumo de alimentos contaminados por BGNs resistentes a antimicrobianos pode representar riscos adverso à saúde, como a disseminação de determinantes de resistência a antimicrobianos em comensais, sobretudo entre população vulnerável (NELSON; MOORE; RAO, 2019).

A disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos tem levado a uma diminuição na eficácia terapêutica antimicrobiana e a uma maior incidência de infecções bacterianas de “resistências de difícil tratamento”. Apesar de não ser limitada ao ambiente hospitalar, a chance de exposição a heterogeneidade de elementos de resistência a antimicrobianos ainda é maior neste ambiente (LIU, JIA-YIA; DICKTER, 2020).

A baixa resposta do sistema imunológico do paciente hospitalizado é uma preocupação clínica e um fator de risco para infecções causadas por bactérias patogênicas resistentes a antimicrobianos, com consequências adversas, incluindo aumento de taxa de morbidade e mortalidade (CIAPPONI *et al.*, 2023; RAJ *et al.*, 2023). Diante deste contexto, diversas práticas de prevenção e controle de infecções vem sendo empregadas nos cuidados ao paciente (HUERTA-GUTIÉRREZ *et al.*, 2019).

Neste estudo, as análises foram realizadas conforme a metodologia descrita por Silva *et al.* (2020). A metodologia utilizada inclui a etapa de enriquecimento em caldo seletivo de BGNs, que permite avaliar o conjunto de BGNs (microbiota). A escolha por não isolar espécies de BGNs foi baseado principalmente na seletividade dos resultados. Além disso, a análise da diversidade microbiana também permite manter as regulações da RA bacteriana que estão diretamente relacionadas ao número de microrganismos existente na comunidade. Essas regulações podem ocorrer por meio de sistemas como o *quorum sensing* (sistema de comunicação célula a célula). A partir da síntese e secreção de moléculas sinalizadoras (também conhecidas como moléculas autoindutoras), as bactérias podem controlar o

comportamento de toda a população bacteriana, e ao atingir um certo limite de concentração dessas moléculas sinalizadoras dependendo da densidade populacional bacteriana, a expressão de certos genes específicos pode ser iniciada para regular a adaptação da população bacteriana, incluindo a RA (ZHAO; YU; DING, 2020).

A etapa de pré-seleção e uso do ágar MacConkey utilizada na metodologia de Silva *et al.* (2020) foi baseada no método preconizado pelo CDC (2009). No documento o CDC sugere a metodologia para agilizar a triagem de pacientes colonizados por Enterobacteriaceae resistentes a carbapenêmicos, a fim de prevenir a transmissão de bactérias resistentes (CDC, 2009).

Apesar deste estudo não seguir o método padronizado nas diretrizes do CLSI (2022) na análise fenotípica, os pontos de corte dos halos de inibição foram utilizados como instrumento de categorização dos resultados obtidos.

A RA detectada nas MGNs das amostras de queijo consumidas por pacientes internados em uma unidade hospitalar foi preocupantemente elevada, demonstrada já na etapa de pré-seleção, com percentual de 94% de crescimento microbiano nas amostras analisadas. Estas descobertas são consistentes com estudos publicados anteriormente, que mostram BGNs provenientes de queijos comercializados resistentes a diferentes classes de antimicrobianos (SILVA *et al.*, 2020; PIRES *et al.*, 2019; DE CAMPOS *et al.*, 2018; DE PAULA *et al.*, 2018).

Os antimicrobianos testados são de amplo espectro e apresentam diferentes tipos de mecanismos de ação, sendo a maioria comumente utilizada no tratamento empírico das infecções hospitalares. O uso excessivo e indevido de antimicrobianos, vistos como escolhas confiáveis de primeira linha, como ampicilina, cloranfenicol e tetraciclina, tem sido um problema persistente ao longo dos anos (VARELA *et al.*, 2021). Essa prática, tanto na medicina, quanto na agropecuária, impulsionada pela facilidade de acesso aos antimicrobianos e interesses econômicos na produção, resultou na diminuição da efetividade dessas drogas no combate às infecções (ASGHAR *et al.*, 2024; FERRINHO; VIVEIROS; FRONTEIRA, 2023; WHO, 2023a).

No tocante aos antimicrobianos de primeira linha, os resultados desta pesquisa apontaram que 100% das amostras apresentaram resistência à ampicilina, 87,5% à tetraciclina e 50% à cloranfenicol. Pesquisa realizada na Eslováquia detectou 59% de resistência antimicrobiana de bactérias isoladas de leite e produtos lácteos, sendo a ampicilina o antimicrobiano mais comum ao qual as bactérias expressaram

resistência. A resistência detectada pelo estudo eslovaco a outros antimicrobianos de primeira linha, quando comparada aos achados desta pesquisa, também foi menor: 17,3% das amostras foram resistentes à tetraciclina e 3,1% eram resistentes ao cloranfenicol (HLEBA *et al.*, 2015).

Assim como nesta pesquisa, Nilsson (2021) observou que isolados de cepas bacterianas de queijos suecos apresentaram resistência à ampicilina e ao cloranfenicol. Graus elevados de resistência a ampicilina também foram identificados nas pesquisas de Loeza-Lara *et al.* (2023), Menezes *et al.* (2023), González *et al.* (2023) e De Souza *et al.* (2023), que avaliaram queijos do México, Espírito Santo, Uruguai e Triângulo Mineiro, respectivamente; enquanto Silva *et al.* (2020) encontraram, em amostras de queijo minas, níveis de resistência fenotípica ao cloranfenicol e a tetraciclina similares aos obtidos nesta pesquisa.

Os beta-lactâmicos constituem o maior grupo de antimicrobianos utilizados clinicamente, que inclui as penicilinas, as cefalosporinas, os monobactâmicos e os carbapenêmicos. Ainda que tenha sua eficácia reduzida, como consequência das mutações e da expansão da gama de substratos, trata-se de uma classe antimicrobiana muito importante, devido à sua baixa toxicidade, facilidade de absorção e alta eficácia terapêutica, sendo os mais utilizados no mundo atualmente (BONOMO, 2017; PAYNE; DU; BATESON, 2000). Tal relevância fez com que os beta-lactâmicos fossem incluídos na relação de antimicrobianos criticamente importantes para medicina humana, organizada pela OMS (WHO, 2023).

Uma pesquisa que avaliou, durante o ano de 2021, o consumo total de antimicrobianos em unidades de terapia intensiva de um hospital brasileiro, mostrou maior consumo de beta-lactâmicos (49,15%), no topo do ranking um carbapenêmico; em contrapartida, a família de tetraciclina ficou em último lugar (0,82%) (DE CASTRO *et al.*, 2023). Esse perfil de consumo é semelhante ao observado em outros países da América Latina, provavelmente devido à alta prevalência de infecções por bactérias com beta-lactamase de espectro estendido (ESBL - do inglês, *Extended spectrum beta-lactamase*) (VERSPORTEN *et al.*, 2018).

Diante da grande importância que os antimicrobianos beta-lactâmicos representam para a saúde humana, os altos níveis de resistência observados para esta classe de medicamentos podem ser considerados preocupantes: apenas três das amostras avaliadas apresentaram resistência em percentuais inferiores à 80% dos antimicrobianos beta-lactâmicos testados; e outras duas amostras resistiram a todos

os compostos beta-lactâmicos a que foram expostas. Todas as MGNs apresentaram resistência à ampicilina e ampicilina-sulbactam. Os achados referentes à resistência dos beta-lactâmicos avaliados nesta pesquisa são consistentes com vários estudos similares, que encontraram em queijos altos níveis de resistência a uma diversidade de compostos beta-lactâmicos, como os de Loeza-Lara *et al.* (2023), Pires *et al.* (2023a), Silva *et al.* (2020) e de Campos *et al.* (2018).

Os antimicrobianos de última geração representam uma linha de defesa vital contra as infecções por patógenos multirresistentes. Seu uso criterioso e racional é fundamental para preservar a efetividade do tratamento das doenças infecciosas. Devido à sua ampla gama de atividade e estabilidade, cefalosporinas de terceira geração e os carbapenêmicos (restrito a uso hospitalar) têm sido a base de tratamento de infecções graves causadas por Enterobacteriaceae resistentes beta-lactâmicos (ABOU-ASSY *et al.*, 2023).

Os resultados obtidos apontaram que apenas duas amostras não apresentaram resistência ao carbapenêmico ertapenem, representando um percentual de resistência de 75%. Este percentual, embora seja inferior ao registrado no estudo de Silva *et al.* (2020) que observou resistência ao ertapenem em 86,7% das amostras avaliadas, é bem maior que o observado nas pesquisas de Tochetto *et al.* (2023), onde todas MGNs das amostras de queijo avaliadas foram suscetíveis à ação do ertapenem. Já Cirino (2017) encontrou resistência em apenas uma dentre 20 cepas de *E. coli* extraídas de leite pasteurizado. Importante ressaltar que a resistência ao ertapenem é uma das prioridades para o desenvolvimento de pesquisas da OMS (WHO, 2023). Assim, são priorizadas estratégias de tratamento poupadoras dessa classe, quando existem agentes alternativos com evidências que apoiem a sua segurança e eficácia (HERRMANN *et al.*, 2024).

A cefepima é um antimicrobiano beta-lactâmico de quarta geração pertencente à classe das cefalosporinas, frequentemente utilizado no tratamento de IRAS. Junto aos carbapenêmicos, incluem os agentes antimicrobianos ativos contra BGNs multirresistentes, com novos inibidores de beta-lactamase atualmente em ensaios clínicos (KARVOUNIARIS *et al.*, 2023).

A avaliação das amostras expostas à ação da cefepima aponta que quatro das oito amostras apresentaram resistência a este antimicrobiano (50%), eficácia ligeiramente superior à observada no ertapenem e nos demais compostos beta-lactâmicos analisados.

Assim como neste estudo, a resistência à cefepima em MGNs obtidas em amostras de queijos também foi constatada em queijos produzidos no Brasil, como nos estudos de Pires *et al.* (2017), Silva *et al.* (2020). No entanto, El Refaey *et al.* (2023) e Takci *et al.* (2020), que analisaram queijos na Romênia, e Hammad *et al.* (2022) que avaliaram amostras de queijo do Egito, não foi identificada resistência à cefepima. Em geral, a análise da literatura indica que a resistência à cefepima em queijos, embora seja detectada em alguns estudos, parece ser menos frequente do que a observada em relação a outros antimicrobianos.

Considerando a relevância e criticidade do ertapenem e cefepima, os índices de resistência observados a essas drogas podem ser consideradas preocupantes, especialmente por serem registrados em MGNs provenientes de alimentos que estão entre os servidos a pacientes hospitalizados. Ademais, essas MGNs podem carrear elementos genéticos codificadores de mecanismos que inativam múltiplos antimicrobianos, e assim podem complicar ainda mais as opções de tratamento, particularmente para pacientes hospitalizados imunocomprometidos (HANAFIAH *et al.*, 2024; PENA; FREITAS; CASTRO, 2021).

A ciprofloxacina é um antimicrobiano pertencente à segunda geração das fluoroquinolonas, é muito empregado no tratamento de infecções sistêmicas causadas por BGNs. Mas também é um antimicrobiano preocupante em relação a sua contaminação ambiental (DIAS *et al.*, 2021; MANDUJANO *et al.*, 2023).

Neste estudo, o percentual de resistência à ciprofloxacina foi um dos mais baixos dentre os antimicrobianos avaliados (37,5%), porém ainda elevado na comparação com os estudos de Silva *et al.* (2020) & Okura & Marin (2014) que também avaliaram amostras de queijo. No estudo de (EL-HALEM *et al.*, 2021) todas as MGNs das amostras forma suscetíveis a ciprofloxacina.

A ciprofloxacina trata-se de um antimicrobiano aplicado na medicina humana, prescrito em função de seu amplo espectro antimicrobiano, rápida absorção, boa penetração nos tecidos e efeitos bactericidas, mesmo em concentrações muito baixas. Entretanto, uma década de estudos (2004 a 2014) vinham indicando aumento nas taxas de resistência à ciprofloxacina em infecções do trato urinário por *E. coli* adquiridas na comunidade e em hospitais, mais evidente nas infecções urinárias hospitalares (FASUGBA *et al.*, 2015). Logo, foram introduzidas fortes recomendações para reduzir sua prescrição a partir de 2015 (Tchesnokova *et al.*, 2023).

Tchesnokova *et al.* (2023) avaliaram amostras fecais de pacientes em Washington, e detectou redução na incidência de BGNs resistentes a ciprofloxacina. Embora os autores reconheçam que os resultados não são conclusivos, é possível que a redução nas prescrições tenha afetado a circulação comunitária de patógenos resistentes à ciprofloxacina e sua exposição à pressão seletiva, resultando percentuais mais baixos da resistência nos estudos avaliados. Tal hipótese se coincidem com os percentuais de resistência reduzidos obtidos nesta pesquisa e em outras similares, apresentadas anteriormente.

7.2 Caracterização genotípica

A PCR é uma técnica molecular, que se tornou uma ferramenta de diagnóstico inestimável em microbiologia clínica, amplamente utilizada na identificação de patógenos e genes de origem alimentar (LIU *et al.*, 2002). Desde 1985, a PCR é o método mais comumente utilizado para amplificação de ácidos nucleicos e tem se mantido como importante ferramenta para vigilância epidemiológica de RA. Os métodos tradicionais, baseados apenas em características fenotípicas, podem gerar interpretações dúbias, que podem ser evitadas quando se utilizam técnicas convencionais de PCR como complemento aos achados obtidos (CARVALHO *et al.*, 2014). No entanto, as tecnologias de análise molecular estão avançando cada vez mais, sendo capazes de analisar o conteúdo genômico bacteriano e, quando estes resultados são correlacionados com estudos de metadados e filogenéticos, é possível compreender com mais precisão as formas como as BGN-RA se disseminam (WHO, 2023b; SILVEIRA *et al.*, 2021).

Neste estudo utilizamos a PCR para traçar o perfil genotípico das amostras de queijo. A partir da caracterização genotípica pode-se observar cinco genes específicos marcadores de resistência a antimicrobianos identificados nas MGNs de queijos analisadas, três codificam resistência a beta-lactâmicos (*tem*, *shv* e *ctx*), e dois codificam resistência a tetraciclinas (*tetA* e *tetB*). Também foi detectada, em grau considerado elevado, a presença dos *integrons* classe 1 e 2, elementos genéticos capazes de integrar e expressar genes de resistência e conferir RA a diversas classes de antimicrobianos. Estes resultados são consistentes com investigações similares em amostras de queijos, como o de Silva *et al.* (2020), que também identificou três genes associados a beta-lactâmicos, dois às tetraciclinas, além de *integrons*, num

total de oito marcadores genéticos diferentes. Resultados similares também foram observados por Loeza-Lara *et al.* (2023) e De Paula *et al.* (2018).

7.3 Genes codificadores de Betalactamase

Os beta-lactâmicos são compostos antimicrobianos caracterizados pela presença de um anel beta-lactâmico, mecanismo capaz de inibir a parede celular das bactérias. Constituem uma classe de medicamentos bastante ampla, que inclui penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos. São frequentemente selecionados como a primeira opção no tratamento de grande diversidade de infecções, em função de sua baixa toxicidade, elevada eficácia e espectro amplo de ação, tornando-os uma classe de antimicrobianos bastante relevante para a saúde humana (NORDMANN; POIREL, 2019; KARAIKOS *et al.*, 2019).

A produção de beta-lactamases é o principal mecanismo relacionado à resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos. As ESBLs são capazes de hidrolisar todas as penicilinas, as cefalosporinas incluindo as de terceira e quarta geração e monobactâmicos, reduzindo a ação antimicrobiana destes medicamentos. A primeira beta-lactamase codificada por elemento genético móvel foi identificada na *Escherichia coli*, isolada de um paciente chamado Temoniera, nome que designou a enzima TEM-1 (SILVA, Da; LINCOPAN, 2012). Atualmente, existem mais de 500 diferentes ESBLs descritas, sendo a maioria relacionada aos genes *ctx*, *tem* e *shv* (BUSH, 2018).

As ESBL se destacam desde o anúncio da "corrida armamentista" de antimicrobianos para superar a resistência bacteriana. Atualmente, conforme a exposição aos antimicrobianos persiste, a identificação de múltiplas sequências de beta-lactamases só aumenta (BUSH; BRADFORD, 2020). Particularmente entre as Enterobacteriaceae patogênicas de importância clínica, estão amplamente distribuídas entre as microbiotas entéricas, sendo causa comum de infecções associada à assistência à saúde (BHANDARI *et al.*, 2024).

Os patógenos de prioridade crítica da OMS, ultrapassaram os limites dos ambientes de saúde e, se destacam entre os registros de causas de IRAS; é crescente a detecção de BGN produtoras de ESBL em hospedeiros não humanos, como animais produtores de alimentos e alimentos, em diferentes cidades brasileiras (MENEZES *et al.*, 2023b; FUGA *et al.*, 2022; OLIVEIRA *et al.*, 2021; PALMEIRA, 2020; PARUSSOLO *et al.*, 2019). Patógenos produtores de beta-lactamases também são prevalentes em

ambiente hospitalar, como sugere o estudo de Chagas *et al.* (2011), que analisou o esgoto de um hospital do Rio de Janeiro e identificou percentuais de incidência de cerca de 40% de BGNs contendo genes associados à resistência a beta-lactâmicos. Amostras clínicas de pacientes internados deste mesmo hospital, realizada em 2018, apresentaram os mesmos genes do estudo de 2011, sugerindo que a resistência pode ter se originado do organismo dos pacientes (ANDRADE *et al.*, 2018).

Os genes codificadores de betalactamases encontrados neste estudo são relatados em leite e outros produtos lácteos (ALKHAF AJE; OLAMA; ALI, 2022). Entre as amostras analisadas neste estudo, 87,5% apresentaram pelo menos a presença de um gene codificador de betalactamase investigado. Ocorreu a predominância do gene *tem*, observado em cerca de 63% das amostras, seguido por *ctx* e *shv*, ambos com o mesmo percentual de incidência (38%). Apesar de poder indicar produção de ESBL, não é possível confirmar, para isto seria necessário o sequenciamento genético.

Estes resultados são consistentes com o estudo De Paula *et al.* (2018), no qual o gene *tem* foi o mais comum, observado em 91,4% das amostras de queijo avaliadas. Este gene também foi o mais frequentemente observado em diversos estudos que avaliaram queijos e produtos lácteos pelo mundo (ALKHAF AJE; OLAMA; ALI, 2022; HAMMAD *et al.*, 2022; SAEI *et al.*, 2022; ZAATOUT *et al.*, 2023), confirmando este gene como um dos marcadores genéticos de RA mais comumente identificado em produtos lácteos.

Apesar disso, alguns estudos obtiveram resultados diferentes, com a prevalência de outros genes produtores de ESBL, como de Silva *et al.* (2020), que observaram o gene *shv* como o mais frequente, presente em 73,3% das amostras de queijo analisadas. Este gene também foi o mais prevalente no estudo de Trocado *et al.* (2021), que analisaram sucos de frutas coletados em ambiente hospitalar; estes autores utilizaram a mesma metodologia deste trabalho.

O *tem-1* é a variante do gene *tem* mais comum em BGNs e atua, via hidrólise, inativando penicilina e cefalosporinas de primeira geração (BUSH; BRADFORD, 2020). A presença deste gene, combinado ao *shv* e *ctx* em Enterobacteriaceae teve um impacto significativo na RA, incentivando mutações e variantes que aumentaram o uso de carbapenêmicos em instituições de saúde e resultaram em aumento da resistência a estes medicamentos (BUSH; BRADFORD, 2020). A análise de esgoto bruto de hospitais no Brasil mostrou maior frequência dos genes *tem* e *kpc* entre

codificadores de beta-lactamase, além de vários genes de resistência de tetraciclinas, entre eles *tetA*. Esse achado sublinha a possível propagação desses genes de importância clínica entre bactérias do meio ambiente (BATISTA *et al.*, 2023).

Considerando os ambientes genéticos das MGNs avaliadas, em apenas uma MGN o gene *tem* foi identificado de maneira isolada. Nas demais MGNs em que foi observado, apareceu em associação com o *shv* (cinco microbiotas), *int-2* e *shv* (duas microbiotas) e *int-1* (uma microbiota).

Outra constatação relevante foi que o gene *tem* apresentou a maior frequência em MGNs resistentes ao sulfametoxazol-trimetoprima, antimicrobiano não beta-lactâmico, seja combinado a outros marcadores de resistência (em duas MGNs) ou isoladamente (em uma MGN). Discordâncias entre ensaios fenotípicos e genotípicos são relativamente frequentes e indicam a possibilidade de que a resistência fenotípica seja causada por outros genes não pesquisados (PARUSSOLO *et al.*, 2019; TABARAN *et al.*, 2022). Neste caso em específico, os resultados sugerem que as MGNs analisadas possuem elementos genéticos codificadores de resistência à sulfametoxazol-trimetoprima, não investigados neste estudo, como o gene *sul*, possivelmente em cassetes gênicos alojado em *integrons*, demandando uma caracterização genética mais exaustiva para comprovação destes dados.

Assim como o gene *tem*, o gene *shv* é um marcador genético codificador de ESBL bastante difundido, sendo associado a disseminação de infecções em todo o mundo (TSENG; LIU; LIU, 2023). Os genes *shv* são especialmente importantes na propagação de resistência em isolados clínicos na Europa e América, sendo os genes *shv-5* e *shv-12* as mais comuns deste grupo (JACOBY; MUNOZ-PRICE, 2005).

As beta-lactamases *shv* tem sua provável origem de penicilases cromossômicas de *Klebsiella pneumoniae*, abrangendo hoje numerosas variantes alélicas e compreendendo ESBL e não-ESBL, além de outras não categorizadas. Embora não tenham observado uma expansão significativa como a das variantes *ctx*, o *shv* tem sido relatado em diversas famílias BGN, e em grande variedade de nichos ambientais. Cerca de 127 variantes do *shv* foram identificadas que, em função de mutações adquiridas ao longo do tempo, permitiram o desenvolvimento de resistência às cefalosporinas de terceira geração e monobactâmicos (BUSH, 2010).

Neste estudo, o gene *shv* foi observado em três amostras e cinco MGNs, sempre em combinação com o gene *tem*. A coexistência dos genes *tem* e *shv* também foi observada em frequência elevada em outros estudos sobre queijos, como os de

Silva *et al.* (2020) e Alemu *et al.* (2023). Os antimicrobianos beta-lactâmicos onde a coexistência foi identificada também foram os que apresentaram maior percentual de resistência (ampicilina e ampicilina-sulbactam, com 100% das amostras resistentes para ambos), sugerindo que a combinação dos genes possa ter contribuído para reforçar o perfil de resistência. Neste contexto, salienta-se que a coexistência de *shv* e *ctx* não foi observada em nenhuma das MGNs avaliadas neste estudo, diferentemente dos achados de Silva *et al.* (2020) e Ombarak *et al.* (2018).

Bello & Dingle (2018) reforçam que, embora inibidores como clavulanato, sulbactam e tazobactam sejam capazes de neutralizar beta-lactamases, reforçando a capacidade bactericida de alguns compostos antimicrobianos, foram identificadas variantes dos genes *tem* e *shv* capazes de resistir a estes inibidores. A identificação de genes *shv* em duas MGNs resistentes a ampicilina-sulbactam parece suportar tal afirmação, indicando que o *shv* conseguiu contornar a ação do inibidor sulbactam, assim como observado na pesquisa de Silva *et al.* (2020). Estudo brasileiro que investigou isolados de BGNs de corrente sanguínea e da ponta de cateter recuperadas de diferentes regiões do país, observou o gene *shv* como um dos mais prevalentes (97,8%), entre os isolados de *Klebsiella* spp; o gene codificador de fluoroquinolonas (*oqxAB*) também apresentou o mesmo percentual (SILVEIRA *et al.*, 2021).

Assim como ocorrido com o gene *tem*, porém, com incidência inferior, o *shv* foi observado em MGNs que apresentaram resistência ao sulfametoxazol-trimetoprima, antimicrobiano não beta-lactâmico, sugerindo que a MGNs analisada contenha genes de resistência cuja investigação vai além deste estudo. Mesmo sem a presença de genes ESBL, isolados de *Klebsiella* spp. com perfil de resistência à penicilina, ceftazidima e aztreonam, além de sulfametoxazol-trimetoprim e tetraciclina, foram fenotipicamente confirmados como produtores de ESBL, devido à presença do gene *oxy*, codificador de uma enzima capaz de acusar falsos resultados de detecção fenotípica (GONZÁLEZ-LÓPEZ *et al.*, 2009). Achados similares constam dos estudos de Kürekci *et al.*, (2016), que também identificaram genes codificadores de beta-lactamases apresentando resistência a compostos não beta-lactâmicos.

Considerando uma das MGNs resistentes ao sulfametoxazol-trimetoprima em que o *shv* estava presente possui também marcador genético do *int-2*, é possível sugerir que genes de resistência associados a sulfametoxazol-trimetoprima estejam sendo carregados por estes elementos.

Em meados da década de 1980, as ESBL emergiram na Europa em decorrência de mutações ocorridas em genes *tem* e *shv*, concomitantemente à introdução das cefalosporinas de terceira geração na rotina clínica (BUSH, 2018). Nos anos 1990, quando passaram a ser prevalentes, a maioria dos casos de ESBLs se referiam a *tem* e *shv*, sendo o genótipo *ctx* frequente apenas na América do Sul, com níveis variáveis de resistência às cefalosporinas de quarta geração (LIVERMORE, D. M., 2008).

Atualmente, os genes *ctx* são os mais diversificados geneticamente, e vêm se tornando o genótipo mais prevalente na maioria dos países, substituindo os genes *tem* e *shv* (BUSH; BRADFORD, 2020). Embora genes *ctx* sejam mais frequentemente observadas em ambiente hospitalar, são onipresentes no ambiente entre BGNs (ALVES DE FRANÇA *et al.*, 2023; CASTANHEIRA; SIMNER; BRADFORD, 2021). Atualmente, dentre os genes codificadores de ESBLs, o *ctx* é um dos mais preocupantes para a saúde global, devido à sua ampla expansão e resistência a múltiplas classes de antimicrobianos comumente utilizados na prática clínica (IKUTA *et al.*, 2022). Genes do tipo *ctx* estão entre os codificadores de ESBL mais prevalentes no Brasil, sendo *ctx-m-15* e *ctx-m-2* os mais detectados (ROCHA; PINTO; BARBOSA, 2016).

Neste estudo, o gene *ctx* foi identificado em três amostras e quatro microbiotas distintas, frequência levemente inferior às dos demais codificadores de ESBL investigados, resultado que contrasta com a emergência deste genótipo relatada na literatura (AHMED, IHSAN M., 2021; ROCHA; PINTO; BARBOSA, 2016).

Ao analisar outros estudos sobre RA em queijos, Loeza-Lara *et al.* (2023) afirmam que o perfil de incidência de *tem*, *shv* e *ctx* costuma variar muito. Assim como nesta pesquisa, a baixa incidência de *ctx*, em relação a outros marcadores genéticos, também fez parte dos achados de outros estudos que avaliaram resistência em queijos, como os de Vrabec *et al.* (2015), na Eslováquia; e Alemu *et al.* (2023); enquanto Ombrak *et al.* (2018), Husan, Çadirci (2019) e Loeza-Lara *et al.* (2023) encontraram maiores incidências de *ctx* em amostras de queijo do Egito, Turquia e México, respectivamente.

O gene *ctx* não foi observado nas MGNs que apresentaram resistência à ceftazidima e cefepima, embora a detecção destes genes em isolados produtores de ESBL seja consistente com o perfil de resistência à cefotaxima e outras cefalosporinas de amplo espectro (AHMED., 2021). A não identificação do gene *ctx* pode estar

relacionada à presença de *integrans*, que foram encontrados em uma MGNs resistente a cada um destes antimicrobianos.

Não foi identificado o gene *ctx* em combinação com outros genes codificadores de ESBL no presente estudo. Loeza-Lara *et al.* (2023) e Husan & Çadirci (2019) identificaram o mesmo percentual (3,3%) de combinação desses três marcadores genéticos em isolados de BGN-RA de amostras de queijo. De maneira similar, Silva *et al.* (2020) encontrou esta combinação em apenas 6,6% das MGNs de queijos avaliadas, indicando que a presença destes três marcadores juntos é relativamente incomum em queijos. Já a combinação de genes *ctx-tem* é mais comum, e foi detectada em 23,3% por Loeza-Lara *et al.* (2023) e em 17,7% por Husan & Çadirci (2019). Yu *et al.* (2020) que analisaram amostras de leite cru, identificaram percentuais mais altos para a combinação de *ctx* e *tem*, em cerca de 40% dos isolados de *E. coli* avaliados.

Considerando que duas MGNs que continham o *ctx* apresentaram resistência a ampicilina-sulbactam e a ampicilina, compostos beta-lactâmicos, este resultado sugere que o *ctx* é capaz de resistir, sem a presença de outros codificadores de ESBL, à ação do anel beta-lactâmico destes medicamentos, contornando inclusive a ação do inibidor sulbactam.

Destaca-se, também, a ocorrência do *ctx* em ambientes genéticos de MGN resistentes a tetraciclina, em combinação com genes *tetA* e *tetB*. BGNs produtoras de ESBL muitas vezes apresentam outros mecanismos que conferem resistência a variados antimicrobianos, como tetraciclinas e aminoglicosídeos (CANTÓN *et al.*, 2012). Plasmídeos contendo genes *ctx* são frequentemente observados carregando genes de resistência a diferentes antimicrobianos, como aminoglicosídeos, tetraciclina, sulfonamida e quinolona (ROGERS; SIDJABAT; PATERSON, 2011). A coexistência de *ctx* e genes *tet* também foi relatada no trabalho de Loeza-Lara *et al.* (2023), apresentando níveis elevados de resistência à tetraciclina. Este resultado sugere a possibilidade de que as BGNs destas amostras estejam utilizando a combinação de diferentes genes, e mecanismos de resistência, como forma de defesa contra a ação dos antimicrobianos.

O gene *oxa* não foi encontrado nas amostras analisadas neste estudo. Os genes *oxa* estão entre as primeiras beta-lactamases detectadas mediadas por plasmídeos. O co-transporte do gene *oxa* está relacionado com a restrição de opções de aminoglicosídeos e redução do efeito de inibidores (LIVERMORE, DAVID M *et al.*,

2019). Este grupo é difundido e geralmente confere resistência às penicilinas (BUSH; BRADFORD, 2020). Embora tenha sido encontrado por Krahulcová *et al.* (2022) como gene predominante especialmente em *E. coli* de amostra de leite cru (25%) na Eslováquia, a maioria dos estudos com amostras de produtos lácteos não investigam esse gene, e quando investigado não foi encontrado (PIRES *et al.*, 2019; PARUSSOLO *et al.*, 2019; SAEI *et al.*, 2022; HUANG *et al.*, 2022).

7.4 Genes de resistência à tetraciclina

Dentre os diversos marcadores genéticos associados à resistência à tetraciclina, os genes *tetA* e *tetB* se destacam o como os mais comumente observados. Para estes genes somente foi testado a resistência ao antimicrobiano tetraciclina. Um estudo que avaliou a presença genes de resistência em isolados de *E. coli* patogênicas provenientes de bovinos em dois países europeus, identificou os genes *tetA* e *tetB* como os mais prevalentes, em mais da metade das cepas analisadas, destacando potenciais riscos à saúde associados ao consumo de alimentos de origem animal (TABARAN *et al.*, 2022).

A tetraciclina é um fármaco frequentemente utilizado em animais criados para produção de alimentos e, no Brasil, a venda desse antimicrobiano para uso animal não é controlada (BARROS, 2021). Frequências elevadas de resistência à tetraciclina entre enterococos isolados de alimentos de origem animal tem sido imputada ao seu uso extensivo na prática veterinária (HAMMAD *et al.*, 2015). Nos últimos anos, novas variantes de genes de resistência à tetraciclina têm sido descobertas em agentes patogênicos, e acredita-se que esses genes se origemem de bactérias ambientais e comensais capazes de se transferir para ambientes clínicos (BERGLUND *et al.*, 2020).

Os genes *tetA* e *tetB* são bem reconhecidos por codificarem proteínas de bombas de efluxo e possuir cobertura mais ampla entre as BGNs (ROBERTS; SCHWARZ, 2016). Um estudo recente analisou amostras de queijos mais vendidos na China e encontrou uma grande diversidade de genes *tet* em bactérias lácticas; detectando 27 genes *tet* em 45 amostras de queijos (YAO *et al.*, 2022). Em diversas partes do mundo, altas prevalências de BGNs resistentes à tetraciclina em alimentos fermentados, incluindo produtos lácteos, tem sido relatada (FLÓREZ; VÁZQUEZ; MAYO, 2017).

Do total de MGNs analisadas, 13% e 38%, abrigavam os genes *tetA* e *tetB*, respectivamente. Estes marcadores foram detectados em metade das amostras neste estudo, com predominância de *tetB* (37,5%), corroborando a literatura que destaca os genes *tetB* como os de cobertura mais ampla entre as BGNs no meio ambiente e em humanos (ROBERTS; SCHWARZ, 2016).

Os resultados encontrados também são consistentes com os achados de outras pesquisas com queijos brasileiros, como o de De Paula *et al.* (2018), que identificaram os marcadores de resistência à tetraciclina como os mais prevalentes em amostras de queijo minas, com predominância do *tetB*; e os de Pires *et al.* (2019) e Silva *et al.* (2022), que também detectaram percentuais maiores *tetB*.

Em contrapartida, em estudo realizado no Egito, o *tetA* foi detectado com maior frequência (86,9%) dentre os genes de resistência à tetraciclina em isolados de *E. coli* de leite cru e queijo de leite cru (OMBARAK *et al.*, 2018), resultado similar ao obtido na pesquisa de Loeza-Lara *et al.* (2023). Outro estudo semelhante, mas somente com amostras de queijo produzido com leite cru, também detectou predominância do gene *tetA* comparado a *tetB*, mas com frequências bem menores: 2,1% e 0,71%, respectivamente (HAMMAD *et al.*, 2022), enquanto pesquisa conduzida com queijos na Espanha não identificou o *tetB* (FLÓREZ; VÁZQUEZ; MAYO, 2017). Embora não tenham aparecido como os mais prevalentes nas amostras analisadas, estes genes merecem atenção, principalmente em função da importância da tetraciclina que são classificadas como “altamente importantes” e de uso prudente pela OMS (BRUNN *et al.*, 2022).

Os isolados produtores de ESBL comumente exibem co-resistência a tetraciclina (KÜREKCI *et al.*, 2016). Em nossas análises, duas amostras apresentaram características genótípicas com os genes *tetA* e *tetB* em combinação com *ctx*, corroborando a hipótese de ocorrência de sobreposição destes genes como mecanismo de defesa.

Um estudo realizado no Panamá analisou a RA em *E. coli* de amostras ambientais, animais e humanas e verificou que quase 100% dos isolados mostraram resistência à tetraciclina, com 42,9% apresentando genes *tetA* e *tetB* associados a plasmídeos, sugerindo que a resistência à tetraciclina poderia ser um indicador conveniente de transferência genética horizontal em uma comunidade (RAMÍREZ-BAYARD *et al.*, 2023).

Trazendo para o foco deste trabalho, uma análise metagenômica da prevalência e evolução dos determinantes da resistência à tetraciclina em queijo de leite cru detectou evolução de genes de resistência à tetraciclina, que estavam em plasmídeos ou elementos associados à mobilização e conjugação, durante a maturação do queijo, indicando que queijos de leite cru podem ser considerados reservatórios de genes de resistência à tetraciclina, que podem ser transferidos horizontalmente (FLÓREZ; VÁZQUEZ; MAYO, 2017). Embora a presença de plasmídeos não tenha sido investigada neste estudo, a hipótese de ocorrência de transferência horizontal nos queijos analisados, em razão da detecção de resistência à tetraciclina em queijos, não pode ser descartada.

7.5 Genes codificadores de Carbapenemases

Os carbapenêmicos são os antimicrobianos beta-lactâmicos de maior espectro de ação e resistência a enzimas beta-lactamases, características que os tornam fundamentais na clínica hospitalar. Em função de sua grande potência e amplo espectro de atividade, são considerados medicamentos de reserva, indicados como último recurso para o tratamento de infecções hospitalares graves, principalmente provocadas por BGNs multirresistentes (ABOU-ASSY *et al.*, 2023). Nos últimos anos, o aumento da resistência às cefalosporinas de terceira e quarta geração tem ocasionado elevação no emprego de beta-lactâmicos mais potentes, como os carbapenêmicos, o que pode ocasionar, em função da pressão seletiva, o surgimento de cepas resistentes à ação destes medicamentos (BORGHI; PEREIRA; SCHUENCK, 2023).

O principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos é a produção de enzimas carbapenemases. Estas enzimas, antes restritas a isolados de *Klebsiella pneumoniae* e ambientes hospitalares, atualmente são rotineiramente relatadas entre outras bactérias da família *Enterobacteriaceae* em todo o mundo. Esta constatação sublinha a importância da aplicação do método deste estudo, que utiliza a avaliação das MGNs em detrimento ao isolamento de uma única bactéria (HARDING-CROOKS *et al.*, 2023).

Os genes codificadores carbapenemases investigados neste estudo, de Classe A (KPC), e Classe D (*oxa-48*) não foram detectados nas amostras de queijo avaliadas. As infecções causadas por BGNs contendo estes genes de resistência

representam uma ameaça crescente à segurança dos pacientes e aos sistemas de saúde em todo o mundo (YAO *et al.*, 2022).

O gene *kpc* se caracteriza por ser capaz de expressar uma enzima com hidrólise de amplo espectro de todos os antimicrobianos beta-lactâmicos e por sua fácil propagação (BUSH, 2018). BGNs carreadoras de gene *kpc* são resistentes a todos os beta-lactâmicos e as infecções associadas a estes BGNs normalmente são as “resistências de difícil tratamento”, em função das limitadas alternativas terapêuticas. Além disso, BGNs carreando genes *kpc* frequentemente apresentam resistência a antimicrobianos não-beta-lactâmicos. Os relatos de infecções causadas por bactérias da família *K. pneumoniae*, contendo genes *kpc*, vem crescendo no Brasil, em especial pela elevada ocorrência em unidades de terapia intensiva (GONÇALVES *et al.*, 2017; SILVEIRA *et al.*, 2021).

Ainda que seja rara a investigação desses genes em produtos lácteos, sua identificação já foi registrada em alguns estudos como os de Silva *et al.* (2020), onde foi encontrado o gene *oxa-48*; Uyanik *et al.* (2022), onde *kpc* e *oxa-48* foram identificados em isolados de amostras de leite cru na Turquia; e Hammad; Ishida e Shimamoto (2009), realizado com amostras de queijo no Egito.

Apesar de não ter apresentado caracterização genética de codificadores de carbapênemico, uma amostra de queijo apresentou microbiota com características fenotípicas resistentes ao único antimicrobiano testado dessa classe (ertapenem). Apesar da não detecção de carbapenemase na MGN em questão, essa carregava um *int-1*. A presença de *integron* associado à resistência ao ertapenem também foi relatada na pesquisa de Silva *et al.* (2020), porém com a identificação de *int-2*.

Os genes *kpc* e *oxa-48* são frequentemente carregados em plasmídeos e codificados em um *integron*, permitindo sua ampla disseminação. Em especial, o gene *oxa-48* tem sido relatado em plasmídeos isolados de BGNs entéricas (HARDING-CROOKS *et al.*, 2023).

Por mais que não tenha sido confirmado o tipo de mecanismo de inativação do antimicrobiano, o fato de a microbiota do queijo veicular elemento de resistência a medicamentos de última escolha para infecções graves, inca que o consumo deste queijo pode ser um risco potencial para a saúde do paciente.

7.6 Gene plasmidial resistente à colistina

Diante da redução das opções terapêuticas e apesar do efeito adverso de nefrotoxicidade, o antimicrobiano colistina foi reintroduzido na clínica, e atualmente é considerado de alta prioridade no tratamento de infecções por BGNs resistentes a carbapenêmicos; porém vem sendo utilizado de forma imprudente em atividades pecuárias e avícolas, o que tem levado a relatos de casos de resistência (FURLAN; SELLERA; STEHLING, 2023). Desde a primeira identificação do gene *mcr* (gene plasmidial resistente à colistina - *mobilized colistin resistance*) na China, no final de 2015, um aumento importante da resistência bacteriana à colistina, mediada por plasmídeos e, portanto, transferível, entre cepas de humanos e animais, foi observado a nível mundial (FURLAN; SELLERA; STEHLING, 2023; LIU, Yi-Yun *et al.*, 2016).

No Brasil a identificação foi no ano de 2016, em cepas de *E. coli* isoladas de animais de produção, fato que foi considerado uma urgência epidemiológica e motivo de preocupação para o agronegócio (COSTA-JÚNIOR *et al.*, 2023; DALMOLIN *et al.*, 2018). O surgimento e a rápida propagação do gene *mcr-1*, principalmente em cepas de *E. coli*, geraram uma necessidade urgente de reforçar a vigilância. No Brasil, parece haver uma diminuição dos genes *mcr* no meio ambiente, que pode estar relacionada com a proibição derivados de polimixina para fins veterinários. Com exceção da Argentina, outros países da América do Sul mantêm liberado seu uso para animais (FURLAN; SELLERA; STEHLING, 2023).

Neste estudo, o gene *mcr-1* não foi detectado, como ocorrido no estudo de Silva *et al.* (2020). Apesar disso, cepas que carregam gene *mcr-1* estão estabelecidas na América do Sul, e a ocorrência desse gene na pecuária brasileira ainda é motivo de preocupação e necessita de vigilância constante (FURLAN; SELLERA; STEHLING, 2023; RAU *et al.*, 2020).

Por outro lado, no Egito, onde não existem regulamentações de controle do uso de antimicrobianos na pecuária, foi encontrado em amostra de queijo um isolado de *E. coli* resistente à colistina, potencialmente virulento, pertencente a uma linhagem dominante de infecção do trato urinário. O gene *mcr-1* estava em plasmídeos flanqueado por *int-1* e *transposon* que mediavam a resistência a ampicilina, aminoglicosídeos, sulfonamidas, tetraciclina e compostos de amônio quaternário (HAMMAD *et al.*, 2019). Um outro estudo mais recente, também no Egito, com amostras de leite de vacas com mastite e do leite cru não pasteurizado encontrou o

gene *mcr-1* e outras variantes desse gene em outras espécies de BGNs multirresistentes (TARTOR *et al.*, 2021).

7.7 Integrans

Diferenciando-se de outros elementos genéticos, os *integrans* são capazes de se adaptar a diferentes “meios de transporte” (*transposons*, plasmídeos, cromossomos). Essa flexibilidade de vetores permite que os *integrans* se movam com facilidade entre espécies bacterianas e, até mesmo, transponham os limites entre espécies, expandindo significativamente seu alcance (BHAT *et al.*, 2023).

As classes de *integrans* mais prevalentes e estudadas em BGNs foram investigadas nesse estudo. Observados nas MGNs de 75% das amostras, os *integrans* de classes 1 e 2 (*int-1* e *int-2*) destacaram-se como os principais elementos de resistência investigados, apresentando a maior frequência e distribuição dentre as amostras avaliadas. Silva *et al.* (2020) encontraram resultados ainda maiores em análise de amostras de queijo minas frescal, que mostraram a presença do *int-1* em 93,3% das amostras, enquanto o *int-2* foi detectado em 73% das amostras. De Paula *et al.* (2018) também observaram valores preocupantes, de *int-1* em 77%, e *int-2* em 97% das amostras.

Assim como neste estudo, o *int-3* não foi detectado nos dois trabalhos citados. Este resultado parece coerente com a literatura, que menciona que, embora haja escassez de trabalhos que analisem a presença do *int-3* em alimentos, os resultados das análises realizadas geralmente são negativos (SILVA *et al.*, 2020). Ainda assim, existem exceções, como o estudo de Pires e *et al.* (2019), que encontrou *int-3* em 13,33% das amostras de queijo minas frescal analisadas.

Ao se observar a incidência de *integrans* por amostra, verificou-se que 50% (4/8) das amostras continham, ao menos, uma classe de *integron* distinta; e 25% apontaram a coexistência de *int-1* e *int-2* (2/8). A igualdade nos percentuais observados entre as classes de *integrans* diverge da literatura, que aponta o *int-1* como o mais prevalente, em especial quando relacionado à BGN (KHOSRAVI; MOTAHAR; ABBASI MONTAZERI, 2017).

Na análise do padrão de distribuição dos elementos genéticos de resistência amplificados na PCR frente aos antimicrobianos selecionados, pode-se observar que os *integrans* foram os principais elementos de resistência. Além disso, houve detecção

de um único elemento genético, o *int-1*, na caracterização genética de resistência a quatro antimicrobianos (ceftazidima, ertapenem, gentamicina e cloranfenicol). O mesmo ocorreu com o *int-2* para apenas um antimicrobiano, a cefepima. Estes achados podem estar relacionados à eficácia dos antimicrobianos mencionados, sendo três deles pertencentes às classes das cefalosporinas e carbapenêmicos, tidas com maior capacidade de sensibilizar BGNs resistentes; e à capacidade dos *integrons* de capturar, integrar e codificar genes de resistência em seu genoma, dificultando sua detecção (ABATCHA; EFFARIZAH; RUSUL, 2018).

Diversos estudos, como os de Mohamed, Hassan & Ahmed (2016), Pires *et al.* (2019) e Spindler *et al.* (2012) identificaram a presença de *int-1* em isolados bacterianos de amostras ambientais resistentes aos antimicrobianos carbapenêmicos, resultados consistentes com o achado deste trabalho, no qual o *int-1* foi detectado em uma MGN resistente ao ertapenem, como elemento genético único. Esta amostra em questão carregava genes codificadores capazes de produzir mecanismos que inativassem todos os antimicrobianos testados, sendo a única que a ciprofloxacina não foi efetiva. É provável que o *int-1* carregado pela MGN dessa amostra possua um amplo arsenal genético e/ou capacidade de recombinação. Como presumisse que ocorreu nestas amostras, *integrons* têm sido frequentemente relacionados ao cotransporte de genes de resistência aos carbapenêmicos e outras classes, como fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e tetraciclina, o que pode acelerar o desenvolvimento de cepas resistentes a múltiplos antimicrobianos (ZHANG *et al.*, 2023).

A contaminação ambiental com fluoroquinolonas é considerada preocupante, em função da capacidade destes compostos permanecerem nos rios e no solo e gerar pressão seletiva sobre bactérias portadoras de *int-1*, em especial os que transportam cassetes de resistência contendo genes *qnr* e *ctx* (DIAS *et al.*, 2021; MANDUJANO *et al.*, 2023). Apesar do percentual de resistência à ciprofloxacina ter sido mais baixos dentre os antimicrobianos avaliados, diversos mecanismos favorecem a resistência às fluoroquinolonas. Estudos mais recentes têm sugerido uma estreita relação entre genes *qnr* e genes codificadores de ESBL e carbapenemases, que pode gerar as chamadas “resistências de difícil tratamento” (TCHESNOKOVA *et al.*, 2023; BASSETTI *et al.*, 2022). A ausência de genes de resistência em MGNs resistentes à ciprofloxacina também foi observada na pesquisa de Silva *et al.* (2020), com a diferença de que, neste estudo, embora não tenham sido encontrados genes, houve a identificação de *integrons*.

Embora relevantes sob a ótica clínica, os *int-2* são frequentemente menos estudados em pesquisas sobre alimentos, quando comparados aos *int-1*. Neste trabalho, o *int-2* destacou-se principalmente na resistência a ampicilina, aparecendo em três amostras que apresentaram resistência àquele antimicrobiano. Normalmente, a resistência a este tipo de antimicrobiano é associada à presença de beta-lactamases, frequentemente transportadas por meio de *int-1* (PIRES *et al.*, 2019; HADIZADEH *et al.*, 2017). Este resultado também contrasta com outros estudos envolvendo a identificação desta classe de *integron*, onde *int-2* foi associado à resistência à sulfonamidas e tetraciclinas, mas não às ampicilinas (SILVA *et al.*, 2020; RIBEIRO, VINICIUS B *et al.*, 2011). Mesmo outros estudos que identificaram *int-2* resistentes à ampicilina encontraram percentuais de incidência mais baixos que o deste estudo, como o de Hammad, Ishida & Shimamoto (2009), onde apenas um isolado de *E. coli*, dentre 215 avaliados, apresentou resistência associada à *int-2*.

Uma observação interessante é que em amostras que não foi detectado o *integron*, os halos de inibição eram maiores ou, no caso dos antimicrobianos ampicilina e ampicilina-sulbactam, os halos foram formados; nas outras amostras não houve formação de halos de inibição para estes dois antimicrobianos.

Neste estudo, os *integrons*, em especial *int-1*, parecem ser capazes de inativar as classes mais potentes de antimicrobianos beta-lactâmicos, como as cefalosporinas de quarta geração (cefepima) e os carbapenêmicos (ertapenem). Este resultado também foi evidenciado em outros estudos com amostra de queijo (MOHAMED *et al.*, 2023; SILVA *et al.*, 2020; PIRES *et al.*, 2019). O perfil de resistência com a caracterização genotípica de *integrons* nas MGNs pressupõe um potencial do mecanismo de disseminação que pode ser veiculado pelos queijos consumidos por pacientes hospitalizados.

Apesar de não conferirem resistência diretamente às bactérias, os *integrons* se tornaram um dos vetores clinicamente mais importantes de RA na medicina moderna, por serem capazes de capturar e expressar diversos genes de resistência. Dados atuais indicam que o *int-1* está espalhado por espécies bacterianas diferentes, a maioria das quais de importância médica (SABBAGH *et al.*, 2021).

Transportado por diversas espécies hospedeiras, o *int-1* tornou-se um componente quase universal da microbiota intestinal humana. A microbiota dos humanos podem ser colonizados com *int-1* logo após o nascimento e na fase idosa podem adquirir uma taxa mais elevada de *integrons* devido à pressão seletiva dos

antimicrobianos consumidos durante a vida (SEPP *et al.*, 2009). Migração e viagens internacionais também impulsionam a disseminação destes *integrons* entre humanos. Outra questão é que a microbiota de humanos e animais agrícolas carregam *int-1* em alta abundância, o que equivale a enormes quantidades de *integrons* sendo eliminados nas fezes todos os dias (MA *et al.*, 2016). E a partir do entendimento do conceito Saude Única os efeitos desses fatores são interligados podem eclodir na contaminação do alimento.

7.8 Possível transferência de genes para a microbiota humana a partir dos alimentos.

Ainda não é comprovado que os GRAs veiculados por alimentos causam diretamente a resistência a antimicrobianos em humanos e animais, mas é cada vez maior o número de estudos que confirmam GRAs compartilhados entre bactérias ambientais e patógenos humanos (ZHANG *et al.*, 2023; FORSBERG *et al.*, 2012; SCHJØRRING; KROGFELT, 2011). O estudo de Zhou *et al.* (2022) constatou, a partir da simulação da digestão humana *in vitro*, que BGNs, GRAs e *int-1* podem atingir com sucesso o intestino delgado, apesar do ambiente ácido no trato gastrointestinal (pH 1,0 - 4,0) e principalmente quando a secreção ácida gástrica era insuficiente, embasando a suposição de transferência de GRAs de alimentos para a microbiota intestinal humana.

Neste mesmo sentido, Lopes *et al.* (2021) constatou tolerância ao pH ácido de Enterobacteriaceae endofíticas produtoras de CTX-M-15 em vegetais de origem nacional, que conjecturando que essas BGNs poderiam colonizar hospedeiros que utilizam vegetais na dieta. Estes alimentos, que normalmente são consumidos crus, são capazes de resistir aos tratamentos convencionais utilizados para a desinfecção. No contexto deste estudo, a população em que o alimento analisado é oferecido, a maioria dos indivíduos apresentam sistema imunológico debilitado ou a imunossupressão. Este estado, pode levar a redução da homeostase intestinal da microbiota simbiótica e, em seguida, aumentar a capacidade de colonização e invasão de bactérias patogênicas intestinais (doadoras), sobretudo as exógenas (CAMPOS-MADUENO *et al.*, 2023; WANG *et al.*, 2017; ZINNO; PEROZZI; DEVIRGILIIS, 2023).

No contexto hospitalar, a evidência de mais de 80% de bactérias de origem alimentar resistentes a antimicrobianos pode atingir com sucesso (intactas) o intestino

delgado sob condições de acidez gástrica inferior a 3,0, é alarmante (LOPES *et al.*, 2021). O pH é firmemente mantido nos níveis celular, tecidual e sistêmico. A condição de pH aumentado, particularmente no estômago, está associada a infecções e uso de medicamentos, os quais são fatores comuns na população hospitalizada. No entanto, como o pH é detectado, regulado e como ele influencia as respostas imunológicas permanecem pouco compreendidos no nível do tecido (ZHOU *et al.*, 2022).

Estudos recentes reforçam a necessidade de atenção especial a pacientes imunocomprometidos em ambiente hospitalar, uma vez que o consumo de alimentos contaminados por BGNs pode causar infecções graves e disseminar RA (QUINTIERI; FANELLI; CAPUTO, 2019; WHEATLEY; VALLE; MCNAMARA, 2022).

A correlação entre hábitos alimentares (onívoros, ovolactovegetarianos e vegetarianos estritos) e a ocorrência de GRAs na microbiota intestinal de indivíduos saudáveis foi avaliada por Da Silva *et al.* (2021) e não foi elucidada relação clara entre dietas e ocorrência de GRAs. Mas, os autores observaram que os vegetais e os alimentos minimamente processados parecem ser a principal fonte de GRAs para a microbiota intestinal humana.

Diante destas evidências, fica cada vez claro que BGN-RA de origem alimentar podem representar um grande risco de transferência horizontal de GRAs para microbiota intestinal, principalmente de pacientes hospitalizados (DUNN *et al.*, 2022). O intestino possui uma comunidade microbiana extremamente densa e complexa, responsável pela manutenção da homeostase intestinal. Comumente, a microbiota simbiótica intestinal saudável e estável conduz a um mecanismo relacionado à resistência à colonização da flora simbiótica intestinal e à invasão de bactérias patogênicas, inibindo assim a colonização de patógenos; conseqüentemente, uma ameaça potencial à saúde humana estaria associada a futuras infecções endógenas, principalmente em pacientes imunossuprimidos, onde poderia ocorrer falha terapêutica (CAMPOS-MADUENO *et al.*, 2023; CHENG *et al.*, 2019).

Além da possível acidez gástrica reduzida, a população hospitalizada, devido ao uso de antimicrobianos, também pode ter a composição da microbiota intestinal afetada, inibindo as bactérias que atuam na simbiose intestinal, resultando em um aumento na população patogênica, principalmente Enterobacteriaceae, que estão prontas para receber GRAs de bactérias doadoras, aumentando a eficiência de transmissão de GRAs no trato gastrointestinal. O uso dos antimicrobianos também

pode acelerar diretamente o desenvolvimento de RA através da seleção de pressão da microbiota intestinal da população em questão. Ainda, a RA e as respostas imunológicas do hospedeiro podem ser exacerbadas pela formação de biofilmes, que fornece uma plataforma estável para patógenos residentes (LIU *et al.*, 2023).

7.9 Divergência na categorização das MGNs (CLSI - BrCAST)

A avaliação fenotípica do efeito de um antimicrobiano no crescimento bacteriano ainda é rotineiramente utilizada para orientação de decisões críticas da terapia para doenças infecciosas. Além disso, é de suma importância para vigilância epidemiológica e desenvolvimento novos antimicrobianos. O Teste de sensibilidade antimicrobiana (TSA) realizado por técnica de difusão em disco é o teste mais utilizado, recomendado e acessível para esta avaliação em diversos países do mundo (WENZLER *et al.*, 2023).

No Brasil, em 2013, foi criado o BrCAST, e por seguimentos desde comitê, em 2019, foi padronizado o uso nacional baseado nas das diretrizes do EUCAST, com acesso livre aos documentos da versão brasileira (BRCAST, 2022).

Este estudo foi fundamentado nos parâmetros estabelecidos pelo CLSI, uma vez que na época das análises experimentais, a implementação do BrCAST era muito recente e a maioria dos estudos como base comparativa para os resultados levava em consideração os parâmetros do CLSI.

O TSA a partir de critérios interpretativos de pontos de corte clínico, permite categorizar a sensibilidade, específicos para cada táxon (ordem/ família/ espécie/ gêneros) e antimicrobianos. As diferentes de interpretações para as categorias de acordo com CLSI e BrCAST são: “S” (sensível e sensível dose padrão, respectivamente); “I” (intermediário e sensível, aumentando a exposição, respectivamente); e “R” (resistente, para ambos). A categoria “SDD” (sensível dose dependente) é existente apenas no CLSI, e a “AIT” (área de incerteza técnica) é exclusiva do BrCAST (BRCAST, 2022; CLSI, 2022). Essas duas não foram consideradas para este estudo.

A partir da análise comparativa da interpretação da susceptibilidade aos antimicrobianos utilizando CLSI e BrCAST foi possível observar que, mesmo apresentando pontos de cortes diferentes para todos os antimicrobianos

selecionados, os dois critérios apresentaram concordância na maior parte das MGNs das amostras analisadas (89,3%).

As interpretações divergentes entre os critérios indicaram tendência de categorização intermediária pelo padrão americano, e resistente, pelo nacional, indicando que os valores do BrCAST são mais conservadores. Estes resultados estão em acordo com estudos que fizeram a comparação entre os critérios CLSI e EUCAST ou BrCAST, que encontraram taxas de suscetibilidade ligeiramente mais baixas do BrCAST/EUCAST (SURAVARAM; HADA; AHMED SIDDIQUI, 2021; TROCADO *et al.*, 2021; SILVA *et al.*, 2020). Porém, essa tendência na discrepância não ocorre para todos os antimicrobianos, pois uma MGN que foi categorizada como intermediária pelo CLSI e sensível pelo BrCAST.

A maior sensibilidade dos limites dos pontos de corte do BRCASST acarretou a modificação de cinco antimicrobianos da categorização inicialmente como intermediária para CLSI para resistente. Apesar de especulações de tendências de harmonização das normas entre as BRCASST e CLSI, mesmo que baixa para os antimicrobianos testado, as divergências permanecem entre as padronizações do CLSI e do BrCAST (SURAVARAM; HADA; AHMED SIDDIQUI, 2021).

Além disto, como ocorreu com a tetraciclina neste estudo, existem mais antimicrobianos do comitê brasileiro não determinado; abonados pelo fato do agente em questão ser inadequado para o tratamento de infecções sistêmicas, assim é recomendado que o agente não seja incluído nos laudos de TSA (BRCASST, 2022; CLSI, 2022).

Outra diferença na comparação dos comitês que pode gerar inconsistência no resultado do TSA é a alteração da definição da categoria “I” feita pelo BrCAST, antes análoga para ambos os comitês. A partir 2019, com alegando a falta de clareza na definição, o BrCAST definiu a categoria “I” como “sensível aumentando exposição”, logo com base neste comitê o microrganismo pode ser resistente ou sensível (com dose padrão ou com ajuste na dosagem) a determinado antimicrobiano (BRCASST, 2022; CLSI, 2022). Já o CLSI não alterou a nomenclatura da categoria “I” como “intermediária”, que é definida diâmetros de zona dentro da faixa intermediária que se aproximam dos níveis sanguíneos e teciduais normalmente atingíveis e/ou para os quais as taxas de resposta podem ser mais baixas do que para isolados suscetíveis (WEINSTEIN; CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE., 2020).

Comumente, na prática clínica, quando o resultado laboratorial do teste fenotípico é clinicamente categorizado como intermediário, o profissional de saúde responsável pela terapêutica, decide seguir a terapia com um antimicrobiano categorizado como sensível, tendo em vista a elevada probabilidade de sucesso terapêutico. O BrCast abrange que, ao regenerar a credibilidade da categoria “I”, irá garantir maior segurança e acerto da terapêutica antimicrobiana, a ampliação de opções terapêuticas, além de poupar fármacos de maior espectro (BrCAST, 2021).

As diferenças encontradas na comparação da interpretação do ponto de corte do teste fenotípico dos comitês CLSI e BrCAST para os antimicrobianos beta-lactâmicos (ceftazidima e cefepima), ciprofloxacina e cloranfenicol possivelmente não teria tanto impacto nas estratégias terapêuticas. De acordo com BrCAST estes antimicrobianos foram categorizados como resistentes, já no CLSI, como intermediário. Apesar da discrepância da interpretação entre os comitês que levou a categoria diferentes, considerando a conduta médica frente a categoria “I” do CLSI, a provável decisão terapêutica seria escolher um antimicrobiano categorizado como sensível, o mesmo aconteceria com o resultado clínico resistente obtido pelo BrCAST.

A mesma situação, provavelmente, não aconteceria com a diferença de categoria frente ao antimicrobiano sulfametoxazol-trimetoprima. Pelo efeito intermediário interpretado pelo CLSI, o antimicrobiano em questão não seria a primeira opção terapêutica, por motivo mencionado anteriormente; já pelo BrCast, como o antimicrobiano foi interpretado como sensível, a sulfametoxazol-trimetoprima estaria entre os antimicrobianos de primeira opção de tratamento.

Aliando aos resultados do perfil genético das amostras analisadas, é importante alertar que na MGN sensível ao antimicrobiano sulfametoxazol-trimetoprima conforme o BrCAST foi identificado um marcador genético (gene *tem*), que está associado a perfis de resistência antimicrobiana altamente diversificados (RAMOS *et al.*, 2020). E dependendo do contexto clínico, poderia gerar uma falha terapêutica, se fosse levado em conta somente as características fenotípicas. Esse erro também reforça a necessidade de complementação de testes genotípicos em estudos de vigilância da segurança do alimento com foco em RA.

No entanto, não é possível avaliar a possibilidade de ocorrência de caracterização genética em MGNs categorizadas como sensíveis pelo parâmetro de CLSI, já que as MGNs categorizadas como sensíveis não foram incluídas para a análise genotípica, o que limitou uma visão mais ampla desta ocorrência.

Estes achados reforçam a necessidade de um sistema TSA globalmente harmonizado, que seja acessível e disponível mundialmente. Com relação aos critérios, os dados do BrCAST são representativos das práticas internacionais e estudos epidemiológicos, além de fazer determinadas adaptações para realidade brasileira. É urgente a necessidade de projetos para implementação padronizada de testes genotípicos confirmatórios de mecanismos de resistência, em laboratórios clínicos, que garantam a segurança do humano, animal e ambiente, assim como a inocuidade do alimento. As diferentes interpretações dos critérios, além de poder influenciar na escolha da terapia antimicrobiana, podem também alterar os perfis epidemiológicos e assim dificultar iniciativas mais amplas de vigilância da RAM.

8 CONCLUSÕES

A partir da metodologia utilizada foi possível recuperar a MGN-RA, permitindo manter alguma dinâmica de integração do conjunto de bactérias presente em queijos ofertados a pacientes hospitalizados.

Os queijos analisados apresentaram MGNs com elevado potencial de resistência fenotípica a diferentes classes de antimicrobianos em uso clínico; assim, os queijos analisados podem desempenhar um papel importante como reservatórios e veiculadores de BGNs portadoras de diferentes fenótipos de resistência.

O BrCAST mostrou valores mais conservadores para pontos de corte dos halos de inibição com interpretação maior de categorias resistente, quando comparado com CLSI, que mostrou maior número de categorias intermediária.

A diversidade e ocorrência dos elementos de resistência de relevância clínica detectado em queijos foi elevada, sendo cinco codificadores de resistência e dois *integrons*. A detecção de genes de resistência e *integrons* sugere um reservatório de determinantes de resistência na microbiota do queijo que pode ter adaptação e transferência horizontal de genes facilitada por elementos genéticos móveis.

Os resultados mostraram alto nível de resistência fenotípica e genotípica a diferentes classes de antimicrobianos utilizados no tratamento empírico IRAS. Os queijos ofertados a pacientes internados em hospital na cidade do Rio de Janeiro podem atuar como um reservatório genético para que as bactérias ganhem novos genes de resistência aos antimicrobianos e, portanto, contribuam indiretamente para o problema da resistência aos antimicrobianos em ambiente hospitalar.

Concluí-se que queijos servidos em unidade hospitalar podem ser reservatórios de amplo conteúdo genético associado a resistência de diversas classes de antimicrobianos. Este estudo confirmou a presença de genes associados a resistência de beta-lactâmicos (genes *ctx*, *tem* e *shv*) e tetraciclina (*tetA* e *tetB*). A detecção dos *integrons* (classe 1 e 2) nestes queijos podem revelar a capacidade de disseminação e adaptação de BGNs comensais patogênicas.

Como perspectivas de trabalhos futuros, para a garantir a oferta de alimentos seguros em ambiente hospitalar, sugere-se investigações da ocorrência de resistência aos antimicrobianos a partir de outros alimentos servidos aos pacientes internados, como também a vigilância de rotina da análise, inclusive molecular, de amostras de alimentos com foco em RA. Também seria recomendado a padronização de processo

térmico prévio dos alimentos de elevado risco, como queijos, servidos a pacientes hospitalizados, que assegurem a qualidade microbiológica do alimento.

REFERÊNCIAS

- ABATCHA, Mustapha Goni; EFFARIZAH, Mohd Esah; RUSUL, Gulam. Prevalence, antimicrobial resistance, resistance genes and class 1 integrons of Salmonella serovars in leafy vegetables, chicken carcasses and related processing environments in Malaysian fresh food markets. **Food Control**, v. 91, p. 170–180, 2018.
- ABIQ. **ABIQ - Associação Brasileira das Indústrias de Queijo**. Disponível em: <https://www.abiq.com.br/queijos_ler.asp?codigo=1911&codigo_categoria=6&codigo_subcategoria=31>. Acesso em: 5 set. 2022.
- ABOU-ASSY, Rawan; ALY, Magda; AMASHA, Reda; *et al.* Carbapenem Resistance Mechanisms, Carbapenemase Genes Dissemination, and Laboratory Detection Methods: A Review. **International Journal of Pharmaceutical Research And Allied Sciences**, v. 12, p. 123–138, 2023.
- AFZAL, Prof Saira; JUNAID, Khunsa; AZIZ, Faiza. A Hospital-Acquired Infection: A Public Health Problem. **Annals of King Edward Medical University**, v. 27, n. 2, 2021. Disponível em: <<https://annalskemu.org/journal/index.php/annals/article/view/4440>>. Acesso em: 27 jan. 2024.
- AHMAD, Nayeem; JOJI, Ronni Mol; SHAHID, Mohammad. Evolution and implementation of One Health to control the dissemination of antibiotic-resistant bacteria and resistance genes: A review. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 1065796, 2023.
- AHMED, Ihsan M. Detection of CTX-M gene in extended spectrum β -lactamases producing Enterobacteriaceae isolated from bovine milk. **Iraqi Journal of Veterinary Sciences**, v. 35, n. 2, p. 397–402, 2021.
- AHMED, Sarfraz; AHMED, Muhammad Zeeshan; RAFIQUE, Safa; *et al.* Recent Approaches for Downplaying Antibiotic Resistance: Molecular Mechanisms. **BioMed Research International**, v. 2023, p. e5250040, 2023.
- AJAYI, A. O. *et al.* Review of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic resistance genes within the one health framework. *Infection Ecology & Epidemiology*, v. 14, n. 1, p. 2312953, 31 dez. 2024.
- AL DABBAGH, Mona; ALGHOUNAIM, Mohammad; ALMAGHRABI, Rana H.; *et al.* A Narrative Review of Healthcare-Associated Gram-Negative Infections Among Pediatric Patients in Middle Eastern Countries. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 12, n. 5, p. 1217–1235, 2023.
- AL HAMDAN, Aisha S; ALGHAMDI, Amal A; ALYOUSIF, Ghada F; *et al.* Evaluating the Prevalence and the Risk Factors of Gram-Negative Multi-Drug Resistant Bacteria in Eastern Saudi Arabia. **Infection and Drug Resistance**, v. 15, p. 475–490, 2022.
- ALEMU, Ashenafi; GIRMA, Selfu; MARIAM, Solomon H. An Arsenal of Multiple Antimicrobial Resistance, Toxins, and Virulence Factors in Gram-Negative Bacterial

Isolates from Food – A Formidable Combination! **Infection and Drug Resistance**, v. 16, p. 1029–1037, 2023.

ALKHAFAJE, Waleed K.; OLAMA, Zakia A.; ALI, Safaa M. Molecular characterization and microbial resistance of different bacterial isolates in some dairy products. **Iraqi Journal of Veterinary Sciences**, v. 36, n. 2, p. 333–339, 2022.

ALVES DE FRANÇA, Danilo; CAROLINE FERREIRA SANTAREN, Karen; SOUZA LIMA SANT'ANNA, Gustavo; *et al.* Bacterial diversity and detection of resistance genes to broad-spectrum betalactams in dairy family farm soils. **Acta Veterinaria Brasílica**, v. 17, n. 2, p. 49–54, 2023.

ASGHAR, Ayesha; KHALID, Aneesa; BAQAR, Zulqarnain; *et al.* An insights into emerging trends to control the threats of antimicrobial resistance (AMR): an address to public health risks. **Archives of Microbiology**, v. 206, n. 2, p. 72, 2024.

AZIMI, Leila; RASTEGAR-LARI, Abdolaziz; TALEBI, Malihe; *et al.* Evaluation of phenotypic methods for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* in Tehran. **Journal of Medical Bacteriology**, v. 2, n. 3–4, p. 26–31, 2013.

BACANLI, Merve; BAŞARAN, Nurşen. Importance of antibiotic residues in animal food. **Food and Chemical Toxicology**, v. 125, p. 462–466, 2019.

BASSETTI, Matteo; KANJ, Souha S; KIRATISIN, Pattarachai; *et al.* Early appropriate diagnostics and treatment of MDR Gram-negative infections. **JAC-Antimicrobial Resistance**, v. 4, n. 5, p. dlac089, 2022.

BATISTA, Marcos Paulo Barbosa; CAVALCANTE, Fernanda Sampaio; ALVES CASSINI, Sérgio Túlio; *et al.* Diversity of bacteria carrying antibiotic resistance genes in hospital raw sewage in Southeastern Brazil. **Water Science and Technology**, v. 87, n. 1, p. 239–250, 2023.

BELLO, Alexander; DINGLE, Tanis C. What's that resistance mechanism? Understanding genetic determinants of gram-negative bacterial resistance. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 40, n. 20, p. 165–174, 2018.

BENLABIDI, Saloua; RADDAOUI, Anis; LENGILIZ, Sana; *et al.* Occurrence of High-Risk Clonal Lineages ST58, ST69, ST224, and ST410 among Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Healthy Free-Range Chickens (*Gallus gallus domesticus*) in a Rural Region in Tunisia. **Genes**, v. 14, n. 4, p. 875, 2023.

BEVERIDGE, Terry J. Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 16, p. 4725–4733, 1999.

BHANDARI, Anita; KHATIWADA, Saroj; SHARMA, Aashish; *et al.* Prevalence of drug resistant Enterobacteriaceae in a Nepalese tertiary care hospital. **PLOS Global Public Health**, v. 4, n. 1, p. e0000858, 2024.

- BHAT, Basharat Ahmad; MIR, Rakeeb Ahmad; QADRI, Hafsa; *et al.* Integrons in the development of antimicrobial resistance: critical review and perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1231938, 2023.
- BLAIR, Jessica MA; RICHMOND, Grace E; PIDDOCK, Laura JV. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. **Future Microbiology**, v. 9, n. 10, p. 1165–1177, 2014.
- BOBATE, S. *et al.* Emergence of environmental antibiotic resistance: Mechanism, monitoring and management. **Environmental Advances**, v. 13, p. 100409, 2023.
- BONOMO, Robert A. β -Lactamases: A Focus on Current Challenges. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 7, n. 1, p. a025239, 2017.
- BOORA, Sanjit; SHARMA, Vikrant; KAUSHIK, Sulochana; *et al.* Hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma: a persistent global problem. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 679–689, 2023.
- BORGHI, Mirla; PEREIRA, Monalessa Fábila; SCHUENCK, Ricardo Pinto. The Presence of Virulent and Multidrug-Resistant Clones of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Southeastern Brazil. **Current Microbiology**, v. 80, n. 9, p. 286, 2023.
- BRASIL. Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde n° 20: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2018.
- BRASIL. Guia alimentar para população brasileira. Disponível em: <file:///C:/Users/Fabiane%20Montovanele/Downloads/guia_alimentar_populacao_brasileira_2ed.pdf>. Acesso em: 19 dez. 2023.
- BRASIL. Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos, no âmbito da Agropecuária 2018-2022. Disponível em: <chrome-extension://efaidnbnmnnibpcajpcglclefindmkaj/https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/resistencia-aos-antimicrobianos/pan-br-agro/PANBRAGROv.1.0maio2018.pdf>. Acesso em: 19 dez. 2023.
- BRAUNER, Asher; FRIDMAN, Ofer; GEFEN, Orit; *et al.* Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 320–330, 2016.
- BRCAS. **Tabela pontos de corte clínicos BrCAST 14-abr-2022**. Disponível em: <http://brcast.org.br/tabela-pontos-de-corte-clinicos-BrCAST-2017-final.pdf>. Acesso em: 23 ago. 2022.
- BREIJYEH, Zeinab; JUBEH, Buthaina; KARAMAN, Rafik. Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. **Molecules**, v. 25, n. 6, p. 1340, 2020.

BRUNN, Ariel; KADRI-ALABI, Zaharat; MOODLEY, Arshnee; *et al.* Characteristics and Global Occurrence of Human Pathogens Harboring Antimicrobial Resistance in Food Crops: A Scoping Review. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 6, 2022. Disponível em:

<<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fsufs.2022.824714>>. Acesso em: 21 out. 2023.

BUSH, Karen. Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 558–564, 2010. (Antimicrobials/Genomics).

BUSH, Karen. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 10, p. 10.1128/aac.01076-18, 2018.

BUSH, Karen; BRADFORD, Patricia A. Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 2, p. 10.1128/cmr.00047-19, 2020.

CAMPOS-MADUENO, Edgar I.; MORADI, Melika; EDDOUBAJI, Yasmine; *et al.* Intestinal colonization with multidrug-resistant Enterobacterales: screening, epidemiology, clinical impact, and strategies to decolonize carriers. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 42, n. 3, p. 229–254, 2023.

CARVALHO, Rosangela Nunes; OLIVEIRA, Antonio Nonato de; MESQUITA, Albenones José de; *et al.* PCR and ELISA (VIDAS ECO O157®) Escherichia coli O157:H7 identification in Minas Frescal cheese commercialized in Goiânia, GO. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 07–10, 2014.

CASPAR, Yvan; MAILLET, Mylène; PAVESE, Patricia; *et al.* mcr-1 Colistin Resistance in ESBL-Producing Klebsiella pneumoniae, France. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 5, p. 874–876, 2017.

CASTANHEIRA, Mariana; SIMNER, Patricia J; BRADFORD, Patricia A. Extended-spectrum β -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. **JAC-Antimicrobial Resistance**, v. 3, n. 3, p. dlab092, 2021.

CAVACO, L; MORDHORST, H; HENDRIKSEN, R. Laboratory protocol: PCR for plasmid-mediated colistin resistance genes. **Lyngby, Denmark: National Food Institute**, 2016.

CDC. **Fast Facts About Food Poisoning**. Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/foodsafety/food-poisoning.html>>. Acesso em: 28 nov. 2023.

CEPAS, Virginio; SOTO, Sara M. Relationship between Virulence and Resistance among Gram-Negative Bacteria. **Antibiotics**, v. 9, n. 10, p. 719, 2020.

CHAGAS, T. P. G.; SEKI, L. M.; CURY, J. C.; *et al.* Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 111, n. 3, p. 572–581, 2011.

CHAPA GONZÁLEZ, C.; GONZÁLEZ GARCÍA, L. I.; BURCIAGA JURADO, L. G.; *et al.* Bactericidal activity of silver nanoparticles in drug-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 691–701, 2023.

CHEN, Shujuan; FU, Jingxia; ZHAO, Ke; *et al.* Integron de classe 1 carregando o gene *qacED1* confere resistência a desinfetantes e antibióticos em *Salmonella*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 404, p. 110319, 2023.

CHENG, Hong-Yu; NING, Meng-Xia; CHEN, De-Kun; *et al.* Interactions between the gut microbiota and the host innate immune response against pathogens. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 439915, 2019.

CIAPPONI, Agustin; BARDACH, Ariel; MACARENA, Sandoval; *et al.* Mortality Attributable to Antimicrobial Resistance in Latin America: A Systematic Review and Meta-Analysis. 2023. Disponível em: <<https://papers.ssrn.com/abstract=4436010>>. Acesso em: 22 jan. 2024.

CIRINO, Fabiane Paula Soares da Costa. Caracterização da resistência aos antimicrobianos em enterobactérias isoladas de leite pasteurizado comercializado no município do estado do Rio de Janeiro. 2017.

CLSI. **EM100 Connect - CLSI M100 ED32:2022**. Disponível em: <[http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20ED32:2022&s](http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20ED32:2022&scope=user)>. Acesso em: 15 ago. 2022.

COICO, Richard. Gram staining. **Current protocols in microbiology**, n. 1, p. A. 3C. 1-A. 3C. 2, 2006.

COOPER, Ashley L.; LOW, Andrew; WONG, Alex; *et al.* Modeling the limits of detection for antimicrobial resistance genes in agri-food samples: a comparative analysis of bioinformatics tools. **BMC Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 31, 2024.

COSTA-JÚNIOR, Sérgio Dias; FERREIRA, Ylanna Larissa Alves; AGRELES, Maria Anndressa Alves; *et al.* Gram-negative bacilli carrying mcr gene in Brazil: a pathogen on the rise. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 1009–1020, 2023.

DA SILVA, Suzane Fernandes; REIS, Isabela Brito; MONTEIRO, Melina Gabriela; *et al.* Influence of Human Eating Habits on Antimicrobial Resistance Phenomenon: Aspects of Clinical Resistome of Gut Microbiota in Omnivores, Ovolactovegetarians, and Strict Vegetarians. **Antibiotics**, v. 10, n. 3, p. 276, 2021.

DALLENNE, Caroline; DA COSTA, Anaelle; DECREÉ, Dominique; *et al.* Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 3, p. 490–495, 2010.

DALMOLIN, Tanise Vendruscolo; MARTINS, Andreza Francisco; ZAVASCKI, Alexandre Prehn; *et al.* Aquisição do gene *mcr-1* por um clone de alto risco de *Klebsiella pneumoniae* ST437/CC258 produtora de KPC-2, Brasil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 90, n. 2, p. 132–133, 2018.

DE ALCÂNTARA RODRIGUES, Isadora; FERRARI, Rafaela Gomes; PANZENHAGEN, Pedro Henrique Nunes; *et al.* Antimicrobial resistance genes in bacteria from animal-based foods. *In: Advances in Applied Microbiology*. [s.l.]: Elsevier, 2020, v. 112, p. 143–183. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065216420300083>>. Acesso em: 23 out. 2023.

DE CAMPOS, Anna C.L.P.; PUÑO-SARMIENTO, Juan J.; MEDEIROS, Leonardo P.; *et al.* Virulence Genes and Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* from Cheese Made from Unpasteurized Milk in Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 15, n. 2, p. 94–100, 2018.

DE CASTRO, Tázia Lopes; CAMBIAIS, Amanda Magalhães Vilas Boas; SFORSIN, Andrea Cassia Pereira; *et al.* Characterization of consumption and costs of antimicrobials in intensive care units in a Brazilian tertiary hospital. **Exploratory Research in Clinical and Social Pharmacy**, v. 11, p. 100289, 2023.

DE PAULA, Ana Caroline L.; MEDEIROS, Julliane D.; DE AZEVEDO, Analice C.; *et al.* Antibiotic Resistance Genetic Markers and Integrons in White Soft Cheese: Aspects of Clinical Resistome and Potentiality of Horizontal Gene Transfer. **Genes**, v. 9, n. 2, p. 106, 2018.

DE PAULA, Victor Gomes; QUINTANILHA, Laiza Vaz; E SILVA, Francisco De Assis Coutinho; *et al.* Enterobactérias produtoras de carbapenemase: reflexão sobre o surgimento de superbactérias em UTI's. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 14, n. 2, 2016. Disponível em: <<https://www.publicacoes.uniceub.br/cienciasaude/article/view/3847>>. Acesso em: 18 out. 2023.

DE SOUZA, Zion Nascimento; DE MOURA, Danielle Feijó; DE ALMEIDA CAMPOS, Luís André; *et al.* Antibiotic resistance profiles on pathogenic bacteria in the Brazilian environments. **Archives of Microbiology**, v. 205, n. 5, p. 185, 2023.

DIAS, Marcela França; DE CASTRO, Giovanni Marques; DE PAIVA, Magna Cristina; *et al.* Exploring antibiotic resistance in environmental integron-cassettes through int1-attC amplicons deep sequencing. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 363–372, 2021.

DIDELOT, Xavier; BOWDEN, Rory; WILSON, Daniel J; *et al.* Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 9, p. 601–612, 2012.

DUNN, Katherine A.; MACDONALD, Tamara; RODRIGUES, Gloria J.; *et al.* Antibiotic and antifungal use in pediatric leukemia and lymphoma patients are associated with increasing opportunistic pathogens and decreasing bacteria

responsible for activities that enhance colonic defense. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 2022. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.924707>>. Acesso em: 7 mar. 2024.

ECONOMOU, Vangelis; GOUSIA, Panagiota. Agriculture and food animals as a source of antimicrobial-resistant bacteria. **Infection and Drug Resistance**, v. 8, p. 49–61, 2015.

EL REFAEY, Asmaa I; HUSSEIN, Heba; OMBARAK, Rabee A; *et al.* Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of Ceftiofur-Resistant Enterobacteriaceae in Raw Cow's Milk and Kareish Cheese: Implications for Public Health. **Journal of Current Veterinary Research**, v. 5, n. 2, p. 10–26, 2023.

EL-HALEM, Abd; SAHAR, GA; ATTIA, IAA; *et al.* Antibiotic resistance and extended-spectrum b-lactamases producing escherichia coli in raw milk and dairy products collected from Alexandria, Egypt. **Egyptian Journal of Dairy Science**, v. 49, n. 1, 2021.

EPAND, Richard M.; WALKER, Chelsea; EPAND, Raquel F.; *et al.* Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1858, n. 5, p. 980–987, 2016. (Antimicrobial peptides, cell membrane and microbial surface interaction).

EUCAST. **Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0.** Disponível em: <<http://www.eucast.org>>. Acesso em: 31 ago. 2022.

EXNER, Martin; BHATTACHARYA, Sanjay; CHRISTIANSEN, Bärbel; *et al.* Antibiotic resistance: What is so special about multidrug-resistant Gram-negative bacteria? **GMS Hygiene and Infection Control**, v. 12, p. Doc05, 2017.

FAO; WHO. Joint FAO/WHO Expert Meeting in collaboration with OIE on Foodborne Antimicrobial Resistance: Role of the Environment, Crops and Biocides – Meeting report. Microbiological Risk Assessment. **Joint FAO/WHO Expert Meeting in collaboration with OIE on Foodborne Antimicrobial Resistance: Role of the Environment, Crops and Biocides – Meeting report.**, 2019. (34).

FASUGBA, Oyebola; GARDNER, Anne; MITCHELL, Brett G.; *et al.* Ciprofloxacin resistance in community- and hospital-acquired Escherichia coli urinary tract infections: a systematic review and meta-analysis of observational studies. **BMC Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 545, 2015.

FERRINHO, Paulo; VIVEIROS, Miguel; FRONTEIRA, Inês. Antimicrobial resistance, society and environment: A global syndemic. **One Health**, v. 16, p. 100512, 2023.

FONG, I. W. New Cephalosporins: Fifth and Sixth Generations. *In*: FONG, I.W. (Org.). **New Antimicrobials: For the Present and the Future**. Cham: Springer International Publishing, 2023, p. 25–38. (Doenças Infecciosas Emergentes do Século 21). Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-031-26078-0_2>. Acesso em: 10 fev. 2024.

- FORSBERG, Kevin J.; REYES, Alejandro; WANG, Bin; *et al.* The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. **Science (New York, N.Y.)**, v. 337, n. 6098, p. 1107–1111, 2012.
- FUGA, Bruna; SELLERA, Fábio P.; CERDEIRA, Louise; *et al.* WHO Critical Priority *Escherichia coli* as One Health Challenge for a Post-Pandemic Scenario: Genomic Surveillance and Analysis of Current Trends in Brazil. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 2, p. e01256-21, 2022.
- FURLAN, João Pedro Rueda; SELLERA, Fábio P.; STEHLING, Eliana Guedes. Trends of the environmental spread of *mcr* genes in Latin America. **The Lancet Microbe**, v. 4, n. 8, p. e571, 2023.
- GARDE, Shambhavi; CHODISETTI, Pavan Kumar; REDDY, Manjula. Peptidoglycan: Structure, Synthesis, and Regulation. **EcoSal Plus**, v. 9, n. 2, 2021. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/ecosalplus.esp-0010-2020>>. Acesso em: 18 jan. 2024.
- GILLINGS, Michael R. Class 1 integrons as invasive species. **Current Opinion in Microbiology**, v. 38, p. 10–15, 2017.
- GONÇALVES, Guilherme Bartolomeu; FURLAN, João Pedro Rueda; VESPERO, Eliana Carolina; *et al.* Disseminação de clones de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes e de alto risco em um hospital terciário do sul do Brasil. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 56, p. 1–7, 2017.
- GONZÁLEZ-LÓPEZ, JJ; COELHO, A.; LARROSA, MN; *et al.* First Detection of Plasmid-Encoded bla_{OXY} β-Lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 7, p. 3143–3146, 2009.
- GUILLAUME, Gilliane; VERBRUGGE, Dirk; CHASSEUR-LIBOTTE, Marie-Louise; *et al.* PCR typing of tetracycline resistance determinants (Tet A–E) in *Salmonella enterica* serotype Hadar and in the microbial community of activated sludges from hospital and urban wastewater treatment facilities in Belgium. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 32, n. 1, p. 77–85, 2000.
- GUO, L; LONG, M; HUANG, Y; *et al.* Antimicrobial and disinfectant resistance of *Escherichia coli* isolated from giant pandas. **Journal of Applied Microbiology**, v. 119, n. 1, p. 55–64, 2015.
- HADIZADEH, Morteza; NOROUZI, Amin; TAGHADOSI, Rohollah; *et al.* Prevalence of *qnr*, *intl1*, and *intl2* genes in extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from clinical samples in Iran. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 1, p. 141, 2017.
- HAMMAD, Ahmed M.; ELTAHAN, Amira; HASSAN, Hamdy A.; *et al.* Loads of Coliforms and Fecal Coliforms and Characterization of Thermotolerant *Escherichia coli* in Fresh Raw Milk Cheese. **Foods**, v. 11, n. 3, p. 332, 2022.

HAMMAD, Ahmed M.; HOFFMANN, Maria; GONZALEZ-ESCALONA, Narjol; *et al.* Genomic features of colistin resistant *Escherichia coli* ST69 strain harboring *mcr-1* on IncHI2 plasmid from raw milk cheese in Egypt. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 73, p. 126–131, 2019.

HAMMAD, Ahmed M.; ISHIDA, Yojiro; SHIMAMOTO, Tadashi. Prevalence and molecular characterization of ampicillin-resistant Enterobacteriaceae isolated from traditional Egyptian Domiati cheese. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 3, p. 624–630, 2009.

HANAFIAH, Alfizah; SUKRI, Asif; YUSOFF, Hamidah; *et al.* Insights into the Microbiome and Antibiotic Resistance Genes from Hospital Environmental Surfaces: A Prime Source of Antimicrobial Resistance. **Antibiotics**, v. 13, n. 2, p. 127, 2024.

HARDING-CROOKS, Richard; SMITH, Darren; FANNING, Séamus; *et al.* Dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and associated resistance determinants through global food systems. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 22, n. 4, p. 2706–2727, 2023.

HAYASHI, Wataru; YOSHIDA, Satoshi; IZUMI, Katsutoshi; *et al.* Genomic characterisation and epidemiology of nosocomial *Serratia marcescens* isolates resistant to ceftazidime and their plasmids mediating rare blaTEM-61. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 25, p. 124–131, 2021.

HERRMANN, Julia; BURGNER-GASSER, Anne-Valérie; GOLDENBERGER, Daniel; *et al.* Cefepime versus carbapenems for treatment of AmpC beta-lactamase-producing Enterobacteriales bloodstream infections. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 43, n. 2, p. 213–221, 2024.

HLEBA, Lukáš; PETROVÁ, Jana; KÁNTOR, Attila; *et al.* Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae strains isolated from chicken and milk samples. **Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v. 2015, p. 19–22, 2015.

HÖLZEL, Christina Susanne; TETENS, Julia Louisa; SCHWAIGER, Karin. Unraveling the Role of Vegetables in Spreading Antimicrobial-Resistant Bacteria: A Need for Quantitative Risk Assessment. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 15, n. 11, p. 671–688, 2018.

HORAN, Teresa C.; ANDRUS, Mary; DUDECK, Margaret A. CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. **American Journal of Infection Control**, v. 36, n. 5, p. 309–332, 2008.

HUANG, Shudi; TIAN, Peng; KOU, Xiaomeng; *et al.* A prevalência e características da β -lactamase de espectro estendido *Escherichia coli* em leite cru e fazendas leiteiras no norte de Xinjiang, China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 381, p. 109908, 2022.

HUERTA-GUTIÉRREZ, R.; BRAGA, L.; CAMACHO-ORTIZ, A.; *et al.* One-day point prevalence of healthcare-associated infections and antimicrobial use in four countries

in Latin America. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 86, p. 157–166, 2019.

HUSAN, Omar; ÇADIRCI, Özgür. Determination of extended spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae from cheese samples sold in public bazaars. **Journal of Food Safety**, v. 39, n. 5, p. e12680, 2019.

IKUTA, Kevin S.; SWETSCHINSKI, Lucien R.; AGUILAR, Gisela Robles; *et al.* Global mortality associated with 33 bacterial pathogens in 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet**, v. 400, n. 10369, p. 2221–2248, 2022.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ. FORTALECIMENTO DA VIGILÂNCIA CONTRA RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA. Disponível em: <https://www.ioc.fiocruz.br/noticias/fortalecimento-da-vigilancia-contra-resistencia-antimicrobiana>. Acesso em: 13 mar. 2024.

JACOBY, George A.; MUNOZ-PRICE, Luisa Silvia. The New β -Lactamases. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 4, p. 380–391, 2005.

JEAN, Shio-Shin; HARNOD, Dorji; HSUEH, Po-Ren. Global Threat of Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 2022. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.823684>. Acesso em: 19 jan. 2024.

JENKINS, David R. Nosocomial infections and infection control. **Medicine**, v. 45, n. 10, p. 629–633, 2017.

KAKOULLIS, Loukas; PAPACHRISTODOULOU, Eleni; CHRA, Paraskevi; *et al.* Mechanisms of Antibiotic Resistance in Important Gram-Positive and Gram-Negative Pathogens and Novel Antibiotic Solutions. **Antibiotics**, v. 10, n. 4, p. 415, 2021.

KAMIMURA, Bruna A.; MAGNANI, Marciane; LUCIANO, Winnie A.; *et al.* Brazilian Artisanal Cheeses: An Overview of their Characteristics, Main Types and Regulatory Aspects. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 5, p. 1636–1657, 2019.

KARAIKOS, Ilias; LAGOU, Styliani; PONTIKIS, Konstantinos; *et al.* The “Old” and the “New” Antibiotics for MDR Gram-Negative Pathogens: For Whom, When, and How. **Frontiers in Public Health**, v. 7, 2019. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpubh.2019.00151>. Acesso em: 26 out. 2023.

KARVOUNIARIS, Marios; ALMYROUDI, Maria Panagiota; ABDUL-AZIZ, Mohd Hafiz; *et al.* Novel Antimicrobial Agents for Gram-Negative Pathogens. **Antibiotics**, v. 12, n. 4, p. 761, 2023.

KAUSHIK, M. *et al.* Integrins in Enterobacteriaceae: diversity, distribution and epidemiology. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 2, p. 167–176, 1 fev. 2018.

KHOSRAVI, Azar Dokht; MOTAHAR, Moloudsadat; ABBASI MONTAZERI, Effat. The frequency of class 1 and 2 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in a burn center of Ahvaz, Iran. **PloS one**, v. 12, n. 8, p. e0183061, 2017.

KLEIN, Eili Y.; VAN BOECKEL, Thomas P.; MARTINEZ, Elena M.; *et al.* Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 15, p. E3463–E3470, 2018.

KOCH, Benjamin J; HUNGATE, Bruce A; PRICE, Lance B. Food-animal production and the spread of antibiotic resistance: the role of ecology. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 15, n. 6, p. 309–318, 2017.

KRAHULCOVÁ, Monika; CVERENKÁROVÁ, Klára; OLEJNÍKOVÁ, Petra; *et al.* Characterization of Antibiotic Resistant Coliform Bacteria and Resistance Genes Isolated from Samples of Smoothie Drinks and Raw Milk. **Foods**, v. 11, n. 9, p. 1324, 2022.

KÜREKCI, Cemil; ARKADAŞ, Müge; AVŞAR, Yahya Kemal. Occurrence, genetic characterization and antimicrobial resistance of extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* isolated from Sürk samples, a traditional Turkish cheese. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 10, n. 3, p. 709–714, 2016.

LANZ, Roland; KUHNERT, Peter; BOERLIN, Patrick. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. **Veterinary microbiology**, v. 91, n. 1, p. 73–84, 2003.

LIEBERT, C. A.; HALL, R. M.; SUMMERS, A. O. Transposon Tn 21, Flagship of the Floating Genome. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 63, n. 3, p. 507–522, 1999.

LITHGOW, Trevor; STUBENRAUCH, Christopher J.; STUMPF, Michael P. H. Surveying membrane landscapes: a new look at the bacterial cell surface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 8, p. 502–518, 2023.

LIU, Jia-Yia; DICKTER, Jana K. Nosocomial infections: a history of hospital-acquired infections. **Gastrointestinal Endoscopy Clinics**, v. 30, n. 4, p. 637–652, 2020.

LIU, Tongrui; LILJEBJELKE, Karen; BARTLETT, Elizabeth; *et al.* Application of Nested Polymerase Chain Reaction to Detection of *Salmonella* in Poultry Environment. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 8, p. 1227–1232, 2002.

LIU, Wei; HUANG, Yanhu; ZHANG, Han; *et al.* Factors and Mechanisms Influencing Conjugation In Vivo in the Gastrointestinal Tract Environment: A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 6, p. 5919, 2023.

LIU, Yi-Yun; WANG, Yang; WALSH, Timothy R.; *et al.* Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in

China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 161–168, 2016.

LIVERMORE, D. M. Defining an extended-spectrum β -lactamase. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, n. s1, p. 3–10, 2008.

LIVERMORE, David M; DAY, Michaela; CLEARY, Paul; *et al.* OXA-1 β -lactamase and non-susceptibility to penicillin/ β -lactamase inhibitor combinations among ESBL-producing *Escherichia coli*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 2, p. 326–333, 2019.

LOEZA-LARA, Pedro Damián; MEDINA-ESTRADA, Ricardo Iván; BRAVO-MONZÓN, Ángel Eliezer; *et al.* Frequency and characteristics of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from Mexican fresh cheese. **Food Science and Technology**, v. 43, p. e108222, 2023.

LOPES, Ralf; FUENTES-CASTILLO, Danny; FONTANA, Herrison; *et al.* Endophytic Lifestyle of Global Clones of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Priority Pathogens in Fresh Vegetables: a Trojan Horse Strategy Favoring Human Colonization? **mSystems**, v. 6, n. 1, p. 10.1128/msystems.01125-20, 2021.

LUND, Barbara M.; O'BRIEN, Sarah J. The Occurrence and Prevention of Foodborne Disease in Vulnerable People. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 8, n. 9, p. 961–973, 2011.

MA, Liping; XIA, Yu; LI, Bing; *et al.* Metagenomic Assembly Reveals Hosts of Antibiotic Resistance Genes and the Shared Resistome in Pig, Chicken, and Human Feces. **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 1, p. 420–427, 2016.

MACHADO, Maxsueli Aparecida Moura; CASTRO, Vinicius Silva; DA CUNHA-NETO, Adelino; *et al.* Heat-resistant and biofilm-forming *Escherichia coli* in pasteurized milk from Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 1035–1046, 2023.

MACNAIR, Craig R.; BROWN, Eric D. Outer Membrane Disruption Overcomes Intrinsic, Acquired, and Spontaneous Antibiotic Resistance. **mBio**, v. 11, n. 5, p. 10.1128/mbio.01615-20, 2020.

MALANOVIC, Nermina; LOHNER, Karl. Gram-positive bacterial cell envelopes: The impact on the activity of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1858, n. 5, p. 936–946, 2016. (Antimicrobial peptides, cell membrane and microbial surface interaction).

MANDUJANO, Antonio; CORTÉS-ESPINOSA, Diana Verónica; VÁSQUEZ-VILLANUEVA, José; *et al.* Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Food-Producing Animals in Tamaulipas, Mexico. **Antibiotics**, v. 12, n. 6, p. 1010, 2023.

MATHELIÉ-GUINLET, Marion; ASMAR, Abir T.; COLLET, Jean-François; *et al.* Lipoprotein Lpp regulates the mechanical properties of the E. coli cell envelope. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1789, 2020.

MENEZES, Kássia Vidal; PIMENTEL, Bruna Maria Fia; DA COSTA, Joyce Aparecida Corrêa; *et al.* Virulence factors and antimicrobial resistance of Escherichia coli isolated from commercialized fresh cheese in the south of Espírito Santo. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 2063–2071, 2023.

MILLER, Samuel I.; SALAMA, Nina R. The gram-negative bacterial periplasm: Size matters. **PLOS Biology**, v. 16, n. 1, p. e2004935, 2018.

MITCHELL, Angela M.; SILHAVY, Thomas J. Envelope stress responses: balancing damage repair and toxicity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 7, p. 417–428, 2019.

MOHAMED, Nancy; GHAZAL, Abeer; AHMED, Asmaa Abdel Hameed; *et al.* Prevalence and determinants of antimicrobial resistance of pathogens isolated from cancer patients in an intensive care unit in Alexandria, Egypt. **Journal of the Egyptian Public Health Association**, v. 98, n. 1, p. 9, 2023.

MONSTEIN, H.-J.; OSTHOLM-BALKHED, A.; NILSSON, M. V.; *et al.* Multiplex PCR amplification assay for the detection of bla_{SHV}, bla_{TEM} and bla_{CTX-M} genes in Enterobacteriaceae. **APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 115, n. 12, p. 1400–1408, 2007.

NELSON, David W; MOORE, John E; RAO, Juluri R. Antimicrobial resistance (AMR): significance to food quality and safety. **Food Quality and Safety**, v. 3, n. 1, p. 15–22, 2019.

NEWBURY, A. *et al.* Fitness effects of plasmids shape the structure of bacteria–plasmid interaction networks. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 119, n. 22, p. e2118361119, 31 maio 2022.

NICOLAS, E. *et al.* The Tn 3 -family of Replicative Transposons. **Microbiology Spectrum**, v. 3, n. 4, p. 3.4.14, 2 jul. 2015.

NILSSON, Viktor. The occurrence of antibiotic resistant bacteria in Swedish dairy products—A pilot study. 2021.

NODARI, Carolina Silva; OPAZO-CAPURRO, Andrés; CASTILLO-RAMIREZ, Santiago; *et al.* Editorial: Mobile genetic elements as dissemination drivers of multidrug-resistant Gram-negative bacteria. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, 2023. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2023.1180510>>. Acesso em: 24 jan. 2024.

NORDMANN, Patrice; POIREL, Laurent. Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. **Clinical Infectious Diseases**, v. 69, n. Supplement_7, p. S521–S528, 2019.

OKURA, Mônica Hitomi; MARIN, José Moacir. Survey of Minas frescal cheese from Southwest Minas Gerais for virulence factors and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates. **Ciência Rural**, v. 44, p. 1506–1511, 2014.

OLIVEIRA, Monike da Silva; SANTOS, Isac Gabriel Cunha dos; DIAS, Bianca Pereira; *et al.* Qualidade higiênico-sanitária e perigos microbiológicos de queijos Minas Frescal clandestinos comercializados no norte do Tocantins. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 42, n. 2, p. 679–694, 2021.

OMBARAK, Rabee A.; HINENOYA, Atsushi; ELBAGORY, Abdel-Rahman M.; *et al.* Prevalence and Molecular Characterization of Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Raw Milk and Raw Milk Cheese in Egypt. **Journal of Food Protection**, v. 81, n. 2, p. 226–232, 2018.

O'NEILL, Jim. Review on antimicrobial resistance. **Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations**, v. 2014, n. 4, 2014.

PALMEIRA, Josman Dantas. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in cattle production - a threat around the world. **E. coli**, 2020.
PARTRIDGE, Sally R.; KWONG, Stephen M.; FIRTH, Neville; *et al.* Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. 10.1128/cmr.00088-17, 2018.

PARUSSOLO, Leandro; SFACIOTTE, Ricardo Antônio Pilegi; DALMINA, Karine Andrezza; *et al.* Detection of virulence genes and antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* isolates from raw milk and artisanal cheese in Southern Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 1, p. 163–178, 2019.

PARTRIDGE, S. R. *et al.* Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 31, n. 4, p. e00088-17, 2018.
PRIMAVILLA, Sara; FARNETI, Silvana; PETRUZZELLI, Annalisa; *et al.* Contamination of hospital food with *Clostridium difficile* in Central Italy. **Anaerobe**, v. 55, p. 8–10, 2019.

PAYNE, David J; DU, Wensheng; BATESON, John H. beta-lactamase epidemiology and the utility of established and novel beta-lactamase inhibitors. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 9, n. 2, p. 247–261, 2000.

PENA, Renata Henriques Ragi; FREITAS, Filipe; CASTRO, Bruno Gomes De. Hygienic-sanitary quality and antimicrobial sensitivity profile of *Escherichia coli* in milk and cheese sold illegally in municipalities of northern Mato Grosso, Brazil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 88, p. e0702019, 2021.

PETERSON, E.; KAUR, P. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2928, 30 nov. 2018.

PIRES, Bruna Amatto Duarte; OLIVEIRA, Juliana Wolff Salles De; SILVA, Cristiane Rodrigues; *et al.* Resistência antimicrobiana em cepas de *Escherichia coli* isoladas

de queijo Minas Frescal no município do Rio de Janeiro – Perfil fenotípico e genotípico. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 7, n. 3, p. 86, 2019.

PONTELLO, Mirella; GORI, Maria. Foodborne Diseases. *In*: RAVIGLIONE, Mario C. B.; TEDIOSI, Fabrizio; VILLA, Simone; *et al* (Orgs.). **Global Health Essentials**. Cham: Springer International Publishing, 2023, p. 149–154. (Sustainable Development Goals Series). Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-031-33851-9_23>. Acesso em: 12 dez. 2023.

QUINTIERI; FANELLI; CAPUTO. Antibiotic Resistant Pseudomonas Spp. Spoilers in Fresh Dairy Products: An Underestimated Risk and the Control Strategies. **Foods**, v. 8, n. 9, p. 372, 2019.

RAJ, Nikhil; AGARWAL, Jyotsna; SINGH, Vikramjeet; *et al*. A retrospective analysis of the 5-year trends of antimicrobial resistance in gram-negative bacterial isolates from an intensive care unit at a tertiary care hospital. **International Journal of Critical Illness and Injury Science**, v. 13, n. 4, p. 178, 2023.

RAMÍREZ-BAYARD, I. E.; MEJÍA, F.; MEDINA-SÁNCHEZ, J. R.; *et al*. Prevalence of Plasmid-Associated Tetracycline Resistance Genes in Multidrug-Resistant Escherichia coli Strains Isolated from Environmental, Animal and Human Samples in Panama. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 12, n. 2, p. 280, 2023.

RAMOS, Sónia; SILVA, Vanessa; DAPKEVICIUS, Maria de Lurdes Enes; *et al*. Escherichia coli as Commensal and Pathogenic Bacteria among Food-Producing Animals: Health Implications of Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) Production. **Animals**, v. 10, n. 12, p. 2239, 2020.

RAU, Renata Batista; DE LIMA-MORALES, Daiana; WINK, Priscila Lamb; *et al*. Salmonella enterica mcr-1 Positive from Food in Brazil: Detection and Characterization. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 17, n. 3, p. 202–208, 2020.

RIBEIRO, Laryssa Freitas. Contaminação por bactérias patogênicas na obtenção de leite e produção de queijos tipo minas frescal elaborados a partir de leite cru refrigerado. 2016.

RIBEIRO, Vinicius B; LINCOPAN, Nilton; LANDGRAF, Mariza; *et al*. Characterization of class 1 integrons and antibiotic resistance genes in multidrug-resistant Salmonella enterica isolates from foodstuff and related sources. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 685–692, 2011.

RIPON, Rezaul Karim; MOTAHARA, Umma; AHMED, Ayesha; *et al*. Exploring the prevalence of antibiotic resistance patterns and drivers of antibiotics resistance of Salmonella in livestock and poultry-derived foods: a systematic review and meta-analysis in Bangladesh from 2000 to 2022. **JAC-Antimicrobial Resistance**, v. 5, n. 3, p. dlad059, 2023.

ROBERTS, Marilyn C.; SCHWARZ, Stefan. Tetracycline and Phenicol Resistance Genes and Mechanisms: Importance for Agriculture, the Environment, and Humans. **Journal of Environmental Quality**, v. 45, n. 2, p. 576–592, 2016.

ROCHA, Francisco Ruliglésio; PINTO, Vicente Paulo Teixeira; BARBOSA, Francisco Cesar Barroso. The Spread of CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases in Brazil: A Systematic Review. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 4, p. 301–311, 2016.

SABBAGH, Parisa; RAJABNIA, Mehdi; MAALI, AMirhosein; *et al.* Integron and its role in antimicrobial resistance: A literature review on some bacterial pathogens. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 24, n. 2, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.22038/ijbms.2020.48905.11208>>. Acesso em: 3 nov. 2023.

SAEI, Mina; JAMSHIDI, Abdollah; ZEINALI, Tayebah; *et al.* Phenotypic and genotypic determination of β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from raw milk and clinical mastitis samples, Mashhad, Iran. **International Dairy Journal**, v. 133, p. 105406, 2022.

SALAZAR, Juan Alberto Guevara; DÍAZ, Jessica Rubí Morán; FERRARA, José Guadalupe Trujillo. Who is winning the war: Science or the adaptive molecular mechanisms of bacteria, evolving to survive antibiotic therapy? **Gene Reports**, v. 34, p. 101882, 2024.

SALOTTI, B. M.; CARVALHO, A. C. F. B.; AMARAL, L. A.; *et al.* QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DO QUEIJO MINAS FRESCAL COMERCIALIZADO NO MUNICÍPIO DE JABOTICABAL, SP, BRASIL. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 73, p. 171–175, 2022.

SAN MILLAN, Alvaro. Evolution of plasmid-mediated antibiotic resistance in the clinical context. **Trends in microbiology**, v. 26, n. 12, p. 978–985, 2018.

SCHJØRRING, Susanne; KROGFELT, Karen A. Assessment of Bacterial Antibiotic Resistance Transfer in the Gut. **International Journal of Microbiology**, v. 2011, p. 1–10, 2011.

SEPP, Epp; STSEPETOVA, Jelena; LÕIVUKENE, Krista; *et al.* The occurrence of antimicrobial resistance and class 1 integrons among commensal *Escherichia coli* isolates from infants and elderly persons. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 8, n. 1, p. 34, 2009.

SILHAVY, Thomas J; KAHNE, Daniel; WALKER, Suzanne. The bacterial cell envelope. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 5, p. a000414, 2010.

SILVA, Cristiane Rodrigues; OKUNO, Newton Takeshi; MACEDO, Victor Hugo Lima de Medeiros; *et al.* Resistome in gram-negative bacteria from soft cheese in Brazil. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 19, n. 3, p. 430, 2020.

SILVA, Ketrin Cristina Da; LINCOPAN, Nilton. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 2, p. 91–99, 2012.

SILVEIRA, Melise Chaves; ROCHA-DE-SOUZA, Cláudio Marcos; DE OLIVEIRA SANTOS, Ivson Cassiano; *et al.* Genetic Basis of Antimicrobial Resistant Gram-Negative Bacteria Isolated From Bloodstream in Brazil. **Frontiers in Medicine**, v. 8, 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2021.635206>>. Acesso em: 22 jan. 2024.

SPINDLER, Aline; OTTON, Letícia Müner; FUENTEFRIA, Daiane Bopp; *et al.* Beta-lactams resistance and presence of class 1 integron in *Pseudomonas* spp. isolated from untreated hospital effluents in Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 102, n. 1, p. 73–81, 2012.

SURAVARAM, Swathi; HADA, Vivek; AHMED SIDDIQUI, Imran. Comparison of antimicrobial susceptibility interpretation among Enterobacteriaceae using CLSI and EUCAST breakpoints. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 315–319, 2021.

TABARAN, Alexandra; SOULAGEON, Virginie; CHIRILA, Flore; *et al.* Pathogenic *E. coli* from Cattle as a Reservoir of Resistance Genes to Various Groups of Antibiotics. **Antibiotics**, v. 11, n. 3, p. 404, 2022.

TAKCI, Hatice Aysun Mercimek; BAKIRHAN, Pemra; OZDEMIR, Eda; *et al.* Antibiotic susceptibility patterns of biofilm producing gram negative bacilli isolated from Kilis local cheese (Food-related antibiotic resistance). **Banat's Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 21, p. 58–63, 2020.

TARTOR, Yasmine H.; GHARIEB, Rasha M. A.; ABD EL-AZIZ, Norhan K.; *et al.* Virulence Determinants and Plasmid-Mediated Colistin Resistance *mcr* Genes in Gram-Negative Bacteria Isolated From Bovine Milk. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.761417>>. Acesso em: 25 fev. 2024.

TCHESNOKOVA, Veronika; LARSON, Lydia; BASOVA, Irina; *et al.* Increase in the community circulation of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* despite reduction in antibiotic prescriptions. **Communications Medicine**, v. 3, n. 1, p. 1–8, 2023.

TIEDJE, James M.; FU, Yuhao; MEI, Zhi; *et al.* Antibiotic resistance genes in food production systems support One Health opinions. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, v. 34, p. 100492, 2023.

TOCHETTO, Alessandra; MARIAN, Isadora Caroline; LOBE, Luísa Aimée Schmitt; *et al.* RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE *ESCHERICHIA COLI* ISOLADA DE QUEIJO COLONIAL ARTESANAL PRODUZIDO NO MEIO OESTE CATARINENSE.

**Anais da Mostra de Iniciação Científica do Instituto Federal Catarinense
Campus Concórdia - ISSN 2317-8671**, v. 13, n. 1, p. 14–14, 2023.

TROCADO, Nathalia Diogo; DE MORAES, Marcelo Soares; AVELEDA, Lilian; *et al.* Phenotypic and genotypic detection of antibiotic-resistant bacteria in fresh fruit juices from a public hospital in Rio de Janeiro. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 4, p. 1471–1475, 2021.

TSENG, Chien-Hao; LIU, Chia-Wei; LIU, Po-Yu. Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBL) Producing Bacteria in Animals. **Antibiotics**, v. 12, n. 4, p. 661, 2023.

UYANIK, Tolga; ÇADIRCI, Özgür; GÜCÜKOĞLU, Ali; *et al.* Investigation of major carbapenemase genes in ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from raw milk in Black Sea region of Turkey. **International Dairy Journal**, v. 128, p. 105315, 2022.

VARELA, Manuel F.; STEPHEN, Jerusha; LEKSHMI, Manjusha; *et al.* Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. **Antibiotics**, v. 10, n. 5, p. 593, 2021.

VERSPORTEN, Ann; ZARB, Peter; CANIAUX, Isabelle; *et al.* Antimicrobial consumption and resistance in adult hospital inpatients in 53 countries: results of an internet-based global point prevalence survey. **The Lancet Global Health**, v. 6, n. 6, p. e619–e629, 2018.

VRABEC, Marek; LOVAYOVÁ, Viera; DUDRIKOVÁ, Katarína; *et al.* Antibiotic resistance and prevalence of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* isolated from bryndza cheese. **Italian Journal of Animal Science**, v. 14, n. 4, p. 3968, 2015.

WALSH, Aaron M.; MACORI, Guerrino; KILCAWLEY, Kieran N.; *et al.* Meta-analysis of cheese microbiomes highlights contributions to multiple aspects of quality. **Nature Food**, v. 1, n. 8, p. 500–510, 2020.

WANG, Baohong; YAO, Mingfei; LV, Longxian; *et al.* The Human Microbiota in Health and Disease. **Engineering**, v. 3, n. 1, p. 71–82, 2017.

WENZLER, Eric; MAXIMOS, Mira; ASEMPA, Tomefa E.; *et al.* Antimicrobial susceptibility testing: An updated primer for clinicians in the era of antimicrobial resistance: Insights from the Society of Infectious Diseases Pharmacists. **Pharmacotherapy**, v. 43, n. 4, p. 264–278, 2023.

WEINSTEIN, M. P.; CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: supplement M100. 30th edition. ed. Wayne, Pa.: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020.

WHEATLEY, Roseanna C.; VALLE, Juan W.; MCNAMARA, Mairéad G. The microbiome as a potential diagnostic biomarker for pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC). **Hepatobiliary Surgery and Nutrition**, v. 11, n. 5, p. 752–754, 2022.

WHO. **Global consultation: WHO strategic and operational priorities to address drug-resistant bacterial infections, 2025-2035**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/articles-detail/global-consultation--who-strategic-and-operational-priorities-to-address-drug-resistant-bacterial-infections--2025-2035>>. Acesso em: 6 jan. 2024.

WHO. TESTE_WHO_SEQUENCIAMENTO_VANTAGENS. **Modern Healthcare. [Short-Term Care Ed.]**, v. 4, n. 6, p. 33–36, 2023.

WU, Xuan; YANG, Lu; WU, Yige; *et al.* Spread of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in animal-derived foods in Beijing, China. **International Journal of Food Microbiology**, v. 403, p. 110296, 2023.

YAO, Jinghui; GAO, Jing; GUO, Jianming; *et al.* Characterization of Bacteria and Antibiotic Resistance in Commercially Produced Cheeses Sold in China. **Journal of Food Protection**, v. 85, n. 3, p. 484–493, 2022.

YEKANI, M. *et al.* Collateral sensitivity: An evolutionary trade-off between antibiotic resistance mechanisms, attractive for dealing with drug-resistance crisis. **Health Science Reports**, v. 6, n. 7, p. e1418, 2023.

YU, Z.N.; WANG, J.; HO, H.; *et al.* Prevalence and antimicrobial-resistance phenotypes and genotypes of *Escherichia coli* isolated from raw milk samples from mastitis cases in four regions of China. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 22, p. 94–101, 2020.

ZAATOUT, Nawel; AL-MUSTAPHA, Ahmad I.; BOUAZIZ, Amira; *et al.* Prevalence of AmpC, ESBL, and colistin resistance genes in Enterobacterales isolated from ready-to-eat food in Algeria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 2205–2218, 2023.

ZHANG, Qi; XU, Nuohan; LEI, Chaotang; *et al.* Metagenomic Insight into The Global Dissemination of The Antibiotic Resistome. **Advanced Science**, v. 10, n. 33, p. 2303925, 2023.

ZHAO, X.; YU, Z.; DING, T. Quorum-Sensing Regulation of Antimicrobial Resistance in Bacteria. **Microorganisms**, v. 8, n. 3, p. 425, 17 mar. 2020.

ZHOU, Min; CAI, Qiujie; ZHANG, Chaonan; *et al.* Antibiotic resistance bacteria and antibiotic resistance genes survived from the extremely acidity posing a risk on intestinal bacteria in an in vitro digestion model by horizontal gene transfer. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 247, p. 114247, 2022.

ZHUO, Jiaju; LIANG, Beibei; ZHANG, Huan; *et al.* An overview of gram-negative bacteria with difficult-to-treat resistance: definition, prevalence, and treatment options. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 21, n. 11, p. 1203–1212, 2023.

ZINNO, Paola; PEROZZI, Giuditta; DEVIRGILIIS, Chiara. Foodborne Microbial Communities as Potential Reservoirs of Antimicrobial Resistance Genes for

Pathogens: A Critical Review of the Recent Literature. **Microorganisms**, v. 11, n. 7, p. 1696, 2023.

APÊNDICE A - RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA DA MICROBIOTA DE QUEIJOS SERVIDOS EM HOSPITAL ONCOLÓGICO DO RIO DE JANEIRO-BRASIL

RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT

Research, Society and Development, v. 11, n. 12, e505111234837, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i12.34837>

Resistência antimicrobiana da microbiota de queijos servidos em hospital oncológico do Rio de Janeiro-Brasil

Antimicrobial resistance of the microbiota of cheeses served in an oncology hospital in Rio de Janeiro-Brazil

Resistencia antimicrobiana de la microbiota de quesos atendidos en un hospital oncológico de Río de Janeiro-Brasil

Recebido: 01/09/2022 | Revisado: 15/09/2022 | Aceitado: 16/09/2022 | Publicado: 22/09/2022

Fabiana Montovanele de Melo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4817-7011>

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: fabimontovanele@cda.unirio.br

Cristiane Rodrigues Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6306-4998>

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: cristiane.silva@unirio.br

Gabriel Lopes Carvalho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3224-1303>

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: gabriel.carvalho@cda.unirio.br

Victor Augustus Marin

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9827-6552>

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Brasil

E-mail: victor.marin@unirio.br

Resumo

A resistência bacteriana a antimicrobianos é um dos grandes desafios atuais para saúde pública. Uma importante preocupação é a alimentação fornecida em ambiente hospitalar, por sua capacidade de poder veicular genes de resistência aos antimicrobianos. Esse estudo teve como objetivo avaliar a resistência antimicrobiana, e caracterizar os genes de resistência de bactérias gram-negativas na microbiota de amostras de queijos servidos a pacientes internados em um hospital público do Rio de Janeiro. Esta pesquisa utilizou uma metodologia para captar a microbiota Gram-negativa resistente aos antimicrobianos. O teste de difusão em disco e a reação em cadeia da polimerase (PCR) foram realizados para investigar, respectivamente, a resistência fenotípica e genotípica de bactérias Gram-negativas aos antimicrobianos testados. As microbiotas de todas as amostras de queijo apresentaram alta resistência fenotípica. Em 62,5% das amostras, a resistência atingiu mais de nove antimicrobianos testados. Cinco antimicrobianos não apresentaram suscetibilidade em 100% das amostras analisadas. Com exceção do antimicrobiano ciprofloxacina, foram encontrados percentuais de resistência acima de 62% em todas as amostras, incluindo cefalosporina de quarta geração. Todas as amostras de queijo abrigavam genes de resistência. Foram encontrados sete diferentes genes de resistência, em 34 microbiotas de bactérias Gram-negativas, sendo eles: *int-1*, *int-2*, *ctx*, *shv*, *tem*, *tetA* e *tetB*. Concluímos a presença alarmante de genes potencialmente resistentes a antimicrobianos em queijos servidos a pacientes oncológicos, indicando que esse alimento pode ser um veiculador de bactérias com genes de resistência em ambiente hospitalar.

Palavras-chave: Resistência bacteriana; Alimento; Antimicrobiano; Bactéria Gram-negativa; Infecção hospitalar.

Abstract

Bacterial resistance to antimicrobials is one of the major challenges for public health today. An important concern is food provided in a hospital environment, due to its ability to transmit antimicrobial resistance genes. This study aimed to evaluate antimicrobial resistance, and characterize the resistance genes of gram-negative bacteria in the microbiota of cheese samples served to patients admitted to a public hospital in Rio de Janeiro. This research used a methodology to capture the Gram-negative microbiota resistant to antimicrobials. The disk diffusion test and the polymerase chain reaction (PCR) were performed to investigate, respectively, the phenotypic and genotypic resistance of Gram-negative bacteria to the tested antimicrobials. The microbiota of all cheese samples showed high phenotypic resistance. In 62.5% of the samples, resistance reached more than nine tested antimicrobials. Five antimicrobials did not show susceptibility in 100% of the samples analyzed. With the exception of the antimicrobial ciprofloxacin, resistance

percentages above 62% were found in all samples, including fourth-generation cephalosporin. All cheese samples harbored resistance genes. Seven different resistance genes were found in 34 microbiota of Gram-negative bacteria, namely: *int-1*, *int-2*, *ctx*, *shv*, *tem*, *tetA* and *tetB*. We conclude the alarming presence of potentially antimicrobial-resistant genes in cheeses served to cancer patients, indicating that this food may be a carrier of bacteria with resistance genes in a hospital environment.

Keywords: Bacterial resistance; Food; Antimicrobial; Gram-negative bacteria; Hospital infection.

Resumen

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos es uno de los principales desafíos para la salud pública en la actualidad. Una preocupación importante es la alimentación proporcionada en un ambiente hospitalario, debido a su capacidad para transmitir genes de resistencia a los antimicrobianos. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la resistencia antimicrobiana y caracterizar los genes de resistencia de bacterias gramnegativas en la microbiota de muestras de queso servidas a pacientes ingresados en un hospital público de Río de Janeiro. Esta investigación utilizó una metodología para capturar la microbiota Gram negativa resistente a los antimicrobianos. La prueba de difusión en disco y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron para investigar, respectivamente, la resistencia fenotípica y genotípica de las bacterias Gram negativas a los antimicrobianos probados. La microbiota de todas las muestras de queso mostró una alta resistencia fenotípica. En el 62,5% de las muestras, la resistencia alcanzó a más de nueve antimicrobianos probados. Cinco antimicrobianos no mostraron sensibilidad en el 100% de las muestras analizadas. A excepción del antimicrobiano ciprofloxacino, se encontraron porcentajes de resistencia superiores al 62% en todas las muestras, incluidas las cefalosporinas de cuarta generación. Todas las muestras de queso albergaban genes de resistencia. Se encontraron siete genes de resistencia diferentes en 34 microbiotas de bacterias Gram negativas, a saber: *int-1*, *int-2*, *ctx*, *shv*, *tem*, *tetA* y *tetB*. Concluimos la alarmante presencia de genes potencialmente resistentes a los antimicrobianos en quesos servidos a pacientes con cáncer, lo que indica que este alimento puede ser portador de bacterias con genes de resistencia en un ambiente hospitalario.

Palabras clave: Resistencia bacteriana; Alimento; Antimicrobiano; Bacterias Gram-negativo; Infección hospitalaria.

1. Introdução

A resistência aos antimicrobianos é apontada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma preocupante ameaça para a saúde humana, sendo responsável por aumentos na morbimortalidade, nas internações hospitalares prolongadas e no aumento dos custos nos serviços de saúde (Collignon, 2013; *World Health Organization [WHO]*, 2020). A globalização, o uso inadequado de antimicrobianos na comunidade e no ambiente hospitalar, bem como seu uso excessivo na agricultura e pecuária, podem ser listados como os principais fatores de risco para disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos (Martins & Rabinowitz, 2020; O'Neill, 2014). Em geral, as pesquisas têm constatado um aumento na incidência de bactérias resistentes, inclusive a antimicrobianos de amplo espectro e aos de descoberta mais recente, indicando que os mecanismos de adaptação das bactérias têm avançado numa velocidade superior à capacidade de descoberta de novos medicamentos (Cerco et al., 2016; Kaye & Pogue, 2015). Neste sentido, as bactérias Gram-negativas têm se revelado um importante desafio para os serviços de saúde, pois além de possuírem uma membrana extracelular que lhes conferem maior resistência, possuem características intrínsecas, como a ação das bombas de efluxo, que impedem que agentes antimicrobianos atinjam seu alvo, permitindo sua rápida disseminação (Randall et al., 2013).

Inicialmente, as bactérias resistentes eram mais restritas ao ambiente hospitalar, mas agora podem ser encontradas em todos os lugares, como no meio ambiente, em seres humanos, em animais, na água e nos alimentos (Organização Pan-Americana da Saúde [OPA], 2020). Os alimentos, em especial, têm sido comumente negligenciados como vetores transmissores de genes de resistência para os seres humanos. No entanto, os resíduos do uso indiscriminado de antimicrobianos na produção de animais e alimentos tem contribuído para seleção de bactérias resistentes, e devido às propriedades móveis de resistência, a transferência pode ocorrer através da cadeia alimentar, o que aumenta os riscos à saúde do homem (Bacanli & Başaran, 2019; Koch et al., 2017; Nisha, 2008).

No âmbito hospitalar, o consumo desses alimentos contaminados por bactérias que abrigam genes de resistência antimicrobiana, pode ser particularmente perigoso em função de fatores de risco encontrados na população hospitalizada, como

por exemplo, a fragilidade do sistema imunológico e as modificações da constituição microbiana natural do trato gastrointestinal (Lund & O'Brien, 2011; San Millan, 2018). Pacientes mais frágeis em unidades de terapia intensiva, neonatologia e oncologia, são os mais afetados por infecções hospitalares. Tratamentos no combate ao câncer, como a quimioterapia e realização de cirurgia de grande porte, podem ser comprometidos na ausência de antimicrobianos eficazes (WHO, 2020).

O teste de sensibilidade antimicrobiana é crucial para orientar a escolha terapêutica, o mais difundido entre os laboratórios clínicos, é o teste fenotípico, o qual a partir do teste de disco-difusão, é realizada a medição dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano (Didelot et al., 2012). Os valores obtidos são interpretados de acordo com a escolha dos pontos de corte, definidos por comitês internacionais, tais como o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e/ou o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), e especificamente, para cada espécie e agente antimicrobiano, a sensibilidade é categorizada em sensível, intermediário ou resistente (EUCAST, 2022; CLSI, 2022). No Brasil, em 2013, foi criado o Comitê Brasileiro de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana (BrCAST), e por seguimentos desde comitê, em 2019, foi padronizado o uso nacional das diretrizes do EUCAST, tendo como base os documentos da versão brasileira (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2018; *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* [BrCAST], 2018).

Todavia, com o surgimento de novos mecanismos de resistência bacteriana, nem sempre a caracterização fenotípica pode ser suficiente para confirmar a presença de um mecanismo de resistência, sendo necessário a aplicação de técnicas moleculares, para caracterização genotípica, que são capazes de detectar os genes responsáveis pela codificação dos mecanismos de resistência (Didelot et al., 2012). Apesar de ainda escasso, é crescente o interesse por pesquisa de genes de resistência em alimentos (De Paula et al., 2018; Peirano et al., 2006; Silva et al., 2020; Trocado et al., 2021; Xiong et al., 2019).

Em função da alimentação fornecida ao paciente ser uma possível fonte de contaminação hospitalar, a resistência aos antimicrobianos apresentada por bactérias também é uma questão relacionada à segurança dos alimentos. Desta maneira, essa pesquisa teve por objetivo analisar a resistência aos antimicrobianos em microbiotas Gram-negativas (MGN) de queijos servidos em ambiente hospitalar, a fim de contribuir para a elaboração de mecanismos de prevenção e controle que minimizem os efeitos negativos deste grave problema de saúde pública.

2. Metodologia

Amostragem

As amostras de queijo foram coletadas do serviço de nutrição de um hospital público em oncologia na cidade do Rio de Janeiro-RJ. Para cada tipo de queijo foram coletados dois lotes/marcas diferentes, totalizando oito amostras. As amostras foram transportadas em recipiente térmico, em um prazo máximo de duas horas, para o Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos da Escola de Nutrição (LACOMEN) pertencente a Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO).

Avaliação da Resistência Fenotípica

1 - Pré-seleção

As análises foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Silva et al. (2020). Seguindo a metodologia, foram colocados $25,0g \pm 0,2g$ de amostra em 225 mL de caldo Gram-negativo, que tem por finalidade o enriquecimento seletivo para o cultivo de organismos Gram-negativos (HiMedia, 2011). Posteriormente, foram incubados a $35^{\circ}C \pm 2^{\circ}C$ para

pré-enriquecimento por 24 horas. Após este período, para a pré-seleção de microbiota resistente, foram transferidos 50 microlitros do caldo enriquecido para tubos contendo 5 mL de caldo triptona de soja - TSB (Oxoid, Reino Unido) e disco de antimicrobiano (Oxoid, Reino Unido) (*Centers for Disease Control and Prevention* [CDC], 2009). Foram selecionados onze tipos de antimicrobianos, sendo dez deles distribuídos de forma a representar cada classe da classificação de Ambler (Ambler, 1980) e um antimicrobiano monobactâmico, única classe dentro dos beta-lactâmicos não incluída na classificação. Os antimicrobianos selecionados foram: cefepima (30µg), ertapenem (10µg), gentamicina (10µg), ampicilina (10µg), ampicilina-sulbactam (10/10µg), cloranfenicol (30µg), tetraciclina (30µg), ciprofloxacina (5µg), ceftazidima (30µg), sulfametoxazol-trimetoprima (1.25/23.75µg) e aztreonam (30µg). A etapa de pré-seleção foi realizada em triplicata.

2 - Seleção de resistência

Após 24 horas de crescimento, os tubos que apresentaram turvação foram qualificados para a avaliação da resistência. Para esta avaliação, foi feita uma adaptação da técnica de disco-difusão: em placa de agar MacConkey, uma alçada (10 microlitros) foi inoculada, de maneira a formar superfície homogênea, objetivando um meio diferencial e levemente seletivo para bactérias Gram-negativas. Na superfície da placa recém-semeada, foi colocado um disco de antimicrobiano, da classe selecionada, e em seguida, levada à estufa a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 16-18 horas (CDC, 2019; CLSI, 2018; Silva et al., 2020). Após o período de incubação, os diâmetros das zonas de inibição das MGN foram medidos e interpretados, como sensível, resistentes ou intermediário, de acordo com os parâmetros CLSI para família *Enterobacteriaceae* (CLSI, 2022). Os resultados foram comparados com a interpretação dos pontos de corte definidos pelo BrCAST (BrCAST/EUCAST, 2022).

Avaliação da Resistência Genotípica

1 - Extração de DNA

A extração de DNA das MGN classificadas como resistentes e intermediários foi realizada de acordo com as instruções do fabricante do kit comercial para extração de DNA genômico de bactérias Gram-negativas EasyPure® Genomic DNA Kit (TransGEN, Pequim, China).

2 - Reação em cadeia da polimerase – PCR

A caracterização molecular de genes das MGN foi realizada por PCR. A detecção de genes de resistência foi analisada a partir de *primers* específicos sintetizados pela *Eurofins Genomics* (Ebersberg, Alemanha) e *Invitrogen Thermo Fisher Scientific* (Califórnia, Estados Unidos), com base no perfil de ampliação das sequências de nucleotídeos publicados previamente (Azimi et al., 2013; Cavaco et al., 2016; Dallenne et al., 2010; Guo et al., 2015; Lanz et al., 2003; Leflon-Guibout et al., 2004; Poirel et al., 2011). Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,9% com uso de corante *Blue Green Loading Dye 1* (LGC Biotecnologia, Brasil) e marcadores de peso molecular (100 pb DNA Ladder – Invitrogen, EUA) a uma voltagem de 90V. A visualização do gel foi realizada em transiluminador de ultravioleta (UV) (Forlab, Brasil).

Trzeze genes de resistência a antimicrobianos foram selecionados: β -lactâmicos (*shv*, *tem*, *ctx* e *oxa*), tetraciclina (*tetA* e *tetB*) carbapenêmicos (*oxa-48* e *kpc*), sistema genético de integrons (*int-1*, *int-2* e *int-3*), resistência às polimixinas (*mcr-1*) e resistência aos desinfetantes (*gacA/EI*). A triagem de PCR para os *primers* selecionados foi feita em todas MGN, exceto para os genes *tetA* e *tetB*, rastreados somente em MGN resistentes ao antimicrobiano tetraciclina.

3. Resultados e Discussão

Resistência fenotípica

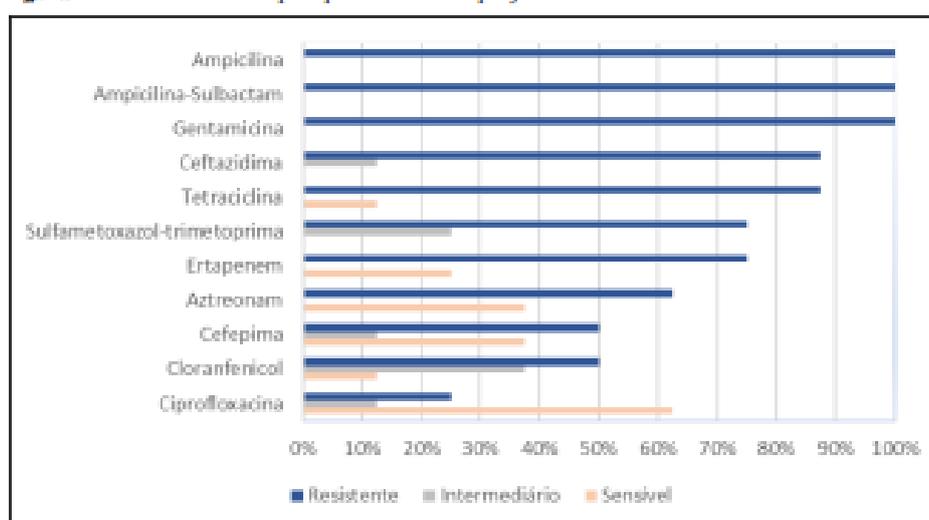
Na etapa de pré-seleção, 94,3% das MGN apresentaram turbidez por crescimento microbiano, indicando um mecanismo de resistência. As MGN apresentaram susceptibilidade a dois tipos de antimicrobianos de amplo espectro, ciprofloxacina (80%) e cloranfenicol (20%).

A análise da susceptibilidade, com a interpretação dos pontos de corte, demonstrou que as MGN de todas as amostras de queijo mantiveram alta resistência fenotípica, variando de 54,5% a 100% (CLSI, 2022). Dentre as quinze amostras que apresentaram resultados suscetíveis, cinco foram suscetíveis na etapa de pré-seleção e dez, na etapa de interpretação do teste disco-difusão.

Oito (9,1%) das MGN analisadas foram classificadas como intermediárias e, de acordo com o CLSI (2022), indica que a concentração de antimicrobiano, capaz de inibir o crescimento bacteriano, alcança níveis sanguíneos e teciduais, porém, as taxas de resposta são menores do que para isolados suscetíveis, significando um certo grau de incerteza na sua eficácia terapêutica. Sendo assim, considerando a resistência intermediária, neste estudo, a categoria intermediária, foi somada a de resistente.

Contemplando os resultados por antimicrobianos, de um total de onze antimicrobianos testados, alarmantemente, cinco não apresentaram susceptibilidade em 100% das amostras de queijo (ampicilina, ampicilina-sulbactam, gentamicina, ceftazidima e sulfametoxazol-trimetoprima). Os antimicrobianos cloranfenicol e tetraciclina, chegaram a totalizar resistência em 87,5% das amostras de queijo, seguido pelo ertapenem, que apresentou 75%. As distribuições dos percentuais por antimicrobiano estão dispostas na Figura 1. Percentuais ainda mais elevados foram encontrados em um estudo que avaliou resistência em queijo minas frescal, onde 100% das amostras apresentaram resistência ao carbapenêmico ertapenem (Silva et al., 2020). Apesar de menor, o percentual encontrado nesta pesquisa também é preocupante, considerando que os carbapenêmicos suscetíveis à família *Enterobacteriaceae* estão incluídos na lista global de patógenos prioritários para o desenvolvimento de pesquisa de novos antimicrobianos (WHO, 2017).

Figura 1 - Resistência fenotípica por amostra de queijo de acordo com os antimicrobianos testados.



Métodos de pré-seleção (turbidez) + teste de disco-difusão. Fonte: Autores.

Um estudo realizado na Eslováquia detectou 59% de resistência antimicrobiana em isolados de bactérias isoladas de leite e produtos lácteos, sendo a ampicilina o antimicrobiano mais comum ao qual as bactérias expressaram resistência. Em nosso estudo a ampicilina não apresentou suscetibilidade em 100% das amostras de queijo. A resistência a outros antimicrobianos testados também foi menor do que em nosso estudo, 17,3% das amostras foram resistentes à tetraciclina e 3,1% eram resistentes ao cloranfenicol (Hleba et al., 2015). Assim como em nosso estudo, Nilsson (2021) observou que isolados de cepas bacterianas de queijos suecos apresentaram resistência à ampicilina e ao cloranfenicol. Em outro estudo, que avaliou presença de *Staphylococcus Aureus Resistentes à Meticilina (MRSA)* em leite e produtos lácteos produzidos no Egito, foi detectado alto nível de resistência (53%) aos antimicrobianos. Penicilina e tetraciclina corresponderam, respectivamente, 87,9% e 65,2% (Al-Ashmawy et al., 2016).

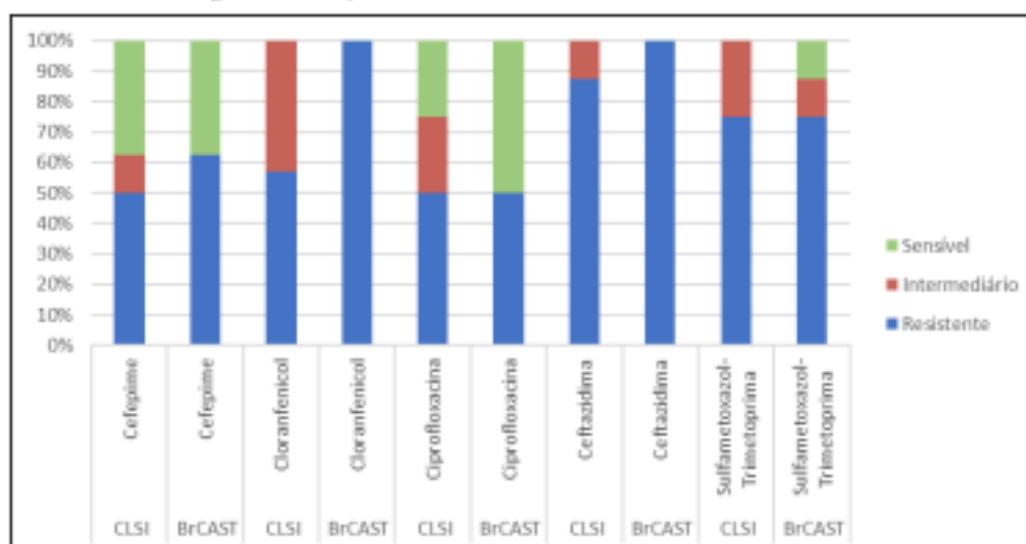
Os antimicrobianos, cefepima e aztreonam, ambos inibidores de β -lactamases, apresentaram resistência de 62,5%. O menor percentual foi de 37,5%, sendo observado na suscetibilidade do antimicrobiano ciprofloxacina. Diferentes classes de antimicrobianos apresentaram resultados intermediários, o agente bacteriostático cloranfenicol apresentou o maior percentual (37,5%). Ressalta-se que, com exceção do ciprofloxacina, foram encontrados percentuais de resistência aos antimicrobianos acima de 62% em todas as amostras, incluindo cefalosporina de quarta geração. Cepas de bactérias Gram-negativas resistentes a antimicrobianos foram isoladas de distintas amostras de queijos que expressaram resistência a diferentes classes de antimicrobianos, demonstrando múltiplas resistências à antimicrobianos entre os isolados (Quintieri et al., 2019).

Comparando critérios de interpretação dos pontos de corte

Foram comparados a interpretação dos pontos de interrupção para suscetibilidade estabelecidos pelas classificações do BrCAST (BrCAST/EUCAST, 2022) e CLSI (CLSI, 2022). Foram excluídos os resultados de suscetibilidade do pré-teste ($n=5$), assim como, os testes de resistência à tetraciclina ($n=8$), pois não há parâmetro para este antimicrobiano no BrCAST para família *Enterobacteriaceae*, sendo considerado o total de 75 MGN.

A utilização da padronização BrCAST é uma nova realidade e pode apresentar diferenças em relação ao CLSI, neste estudo as variações entre os critérios foram observadas entre os antimicrobianos (Figura 2). Apesar das taxas de resistência observadas serem elevadas para ambos os critérios, esse número seria ainda maior se fossem adotados os pontos de corte do BrCAST, representando resistência em 84% das MGN, enquanto o CLSI apresentou 77,3%. A maior discrepância entre os percentuais foi observada na classificação "intermediários", onde baseando-se no BrCAST reduziria bastante, passando de 10,7% no CLSI, para apenas 1,3%. Essa discrepância, se dá principalmente, na diferença da classificação de resistentes entre os dois parâmetros. Os suscetíveis mantiveram-se semelhantes, representando 14,7% no BrCAST em comparação com os 12% microbiotas suscetíveis do CLSI. Resultados semelhantes foram observados no estudo de Silva et al. (2020).

Figura 2 - Variações na suscetibilidade de acordo com CLSI e BrCAST.



Onze antimicrobianos selecionados para este estudo. Fonte: Autores.

Analisando os antimicrobianos selecionados para este estudo, observou-se diferença de percentuais de classificações frente a cinco antimicrobianos. Os antimicrobianos cefepime, cloranfenicol, ciprofloxacina e ceftazidima apresentaram diferenças alterando a classificação de resistente, de acordo a BrCAST, para intermediário, de acordo com os parâmetros de CLSI. O antimicrobiano sulfametoxazol-trimetoprima foi o único que apresentou fenótipo sensível seguindo critérios da CLSI e intermediário, segundo o BrCAST. Uma outra diferença entre os comitês é conceitual, o BrCAST redefiniu o conceito da categoria intermediária, como "Sensível Aumentando Exposição", existindo elevada probabilidade de sucesso terapêutico. Diferente da interpretação do CLSI, já mencionado neste estudo, a categoria "não sensível" no BrCAST abrange apenas bactérias resistentes (BrCAST/EUCAST, 2021).

Em geral, foi possível avaliar que os pontos de corte dos halos dos critérios do BrCAST, demonstraram maior rigor na classificação como resistente, quando comparado aos resultados do CLSI.

Resistência Genotípica

A extração de DNA e PCR foram realizados com 73 microbiotas Gram-negativas, classificadas como resistentes ou intermediários nos testes anteriores. Para cada amostra de DNA extraída, foi testada a presença de 13 genes de resistência. A Tabela 1 mostra o percentual dos genes entre as amostras de queijos e as MGN.

Tabela 1- Percentual de genes por amostras de queijo e microbiotas Gram-negativas (MGN).

| Gene | Amostras | MGN* |
|--------------|-------------|-------------|
| <i>int-1</i> | 50,0% (4/8) | 11% (8/73) |
| <i>int-2</i> | 50,0% (4/8) | 8,2% (6/73) |
| <i>ctx</i> | 37,5% (3/8) | 5,5% (6/73) |
| <i>shv</i> | 37,5% (3/8) | 6,8% (6/73) |
| <i>tem</i> | 62,5% (5/8) | 9,6% (6/73) |
| <i>tetA</i> | 12,5% (1/8) | 12,5% (1/8) |
| <i>tetB</i> | 37,5% (3/8) | 37,5% (3/8) |

MGN- microbiotas Gram-negativas. Fonte: Autores.

Por meio das análises dos resultados da PCR, pode-se observar que todas as amostras de queijos continham pelo menos dois dos genes de resistência pesquisados. De forma preocupante, foram detectados até nove genes de resistência diferentes em 25% das amostras, o restante das amostras variou entre dois a três genes de resistência.

Foram encontrados sete genes de resistência diferentes, sendo eles: *int-1*, *int-2*, *ctx*, *shv*, *tem*, *tetA* e *tetB*, totalizando 34 microbiotas Gram negativas com presença de genes. Os genes *int-3*, *kpc*, *oxa*, *oxa-48*, *qacEΔ1* e *mcr-1* não foram encontrados nas amostras (Tabela 2).

Tabela 2- Distribuição dos genes por antimicrobiano presentes em microbiotas Gram-negativas extraídas das amostras de queijo.

| | Cefepima | Ertapenem | Gentamicina | Ampicilina | Ampicilina-sulbactam | Cloranfenicol | Tetraciclina | Ciprofloxacina | Ceftazidima | Trimetoprima-Sulfametoxazo | Aztreonam |
|----|--------------|--------------|--------------|--|--------------------------|---------------|---------------------------|----------------|--------------|--|-----------|
| Q1 | - | - | - | <i>int-2</i> <i>shv</i> <i>tem</i> | <i>shv</i> <i>tem</i> | - | <i>tetB</i> | - | - | <i>int-2</i> <i>shv</i> <i>tem</i> | - |
| Q2 | <i>int-2</i> | - | - | - | - | * | <i>ctx</i> <i>tetB</i> | * | - | - | * |
| Q3 | - | - | - | <i>shv</i> <i>tem</i> | - | - | <i>tetB</i> | - | - | - | - |
| Q4 | - | <i>int-1</i> | - | - | - | - | - | * | - | <i>int-1</i> | - |
| Q5 | - | - | - | <i>int-2</i> | - | <i>int-1</i> | - | * | - | <i>tem</i> | * |
| Q6 | * | * | - | - | <i>shv</i> <i>tem</i> | - | * | * | - | - | * |
| Q7 | * | * | <i>int-1</i> | <i>int-1</i> <i>int-2</i> | <i>int-2</i> | - | <i>ctx</i> <i>tetA</i> | * | <i>int-1</i> | <i>int-1</i> <i>tem</i> | - |
| Q8 | * | <i>int-1</i> | - | <i>ctx</i> | <i>ctx</i> | - | - | - | - | - | - |

(Q) queijo; (*) Microbiotas Gram-negativas classificadas como sensíveis na etapa de caracterização fenotípica; (-) Ausência dos genes investigados. Fonte: Autores.

Os integrons são definidos como elementos genéticos móveis que abrigam cassetes de genes que podem codificar genes para a resistência antimicrobiana, tendo um papel importante na contribuição para a ampla distribuição e disseminação

da resistência antimicrobiana, encontrados principalmente em bactérias Gram-negativas (Ghaly et al., 2017; Nielsen et al., 2015; Xiong et al., 2019). Em nosso estudo, a prevalência de integrons entre as amostras foi preocupante, *int-1* e *int-2* foram detectados em 50% das amostras de queijos. Silva et al. (2020) encontraram resultados ainda maiores em análise de amostras de queijo minas frescal, em que mostrou a presença do *int-1* em 93,3% das amostras, enquanto o *int-2* foi detectado em 73% das amostras. De Paula et al. (2018) também observaram valores preocupantes, de *int-1* em 77%, e *int-2* em 97% das amostras. Neste estudo não foi detectado o *int-3*, bem como nos dois estudos citados anteriormente em comparação. No entanto, um estudo realizado com amostras de leites crus na Turquia revelou a presença do *int-3* em 51,6% isolados de *P. aeruginosa* (Kürekci et al., 2016).

Apesar da mesma frequência entre o *int-1* e *int-2* em nossas amostras, dentre as classes de integrons descritas em literatura, a classe 1 é a mais prevalente, principalmente em estudos clínicos com foco em microrganismos Gram-negativos (Deng et al., 2015).

Um destaque importante foi que, dentre os genes detectados, *int-1* e *int-2* foram os que apresentaram maior número de resistência entre as classes de antimicrobianos estudadas. Adicionalmente, a única microbiota da amostra de queijo que apresentou resistência fenotípica a uma cefalosporina de quarta geração (cefepima), abrigava um *int-2*. Os achados neste estudo corroboram com a hipótese de que alimentos como o queijo possam atuar como reservatório para elementos genéticos móveis, de forma a transportar genes de resistência a diversos antimicrobianos.

Em meio aos mecanismos de resistência aos antimicrobianos de bactérias Gram-negativas, as β -lactamase de espectro estendido (ESBL) se destacam por possuir potencial para degradar cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, sendo caracterizadas como endêmicas em *Enterobacteriaceae* isoladas associadas a hospitais e adquiridas na comunidade (Castanheira et al., 2021). Em especial, no ambiente hospitalar, onde a pressão seletiva sobre as bactérias é maior, são consideradas uma grande preocupação (Hayashi et al., 2021).

A maioria das ESBLs são codificadas por *tem*, *shv* e *ctx-M* (El Salabi et al., 2013). Entre as amostras analisadas neste estudo, 87,5% das amostras apresentaram pelo menos a presença de um gene codificador de ESBL investigado. Ocorreu a predominância de *tem* (63%), seguido por *ctx* e *shv*, ambos apresentaram o mesmo percentual (38%). Nossos resultados estão de acordo com o estudo de Paula et al. (2018) no qual o gene *tem* foi o mais comum, em 91,4% das amostras. Silva et al. (2020) observaram o gene *shv* como o mais frequente, presente em 73,3% das amostras. Também foi encontrado maior número de gene *shv*, em análise de sucos de frutas coletados em ambiente hospitalar. Neste estudo, os autores também utilizaram a adaptação do método de seleção de bactérias Gram-negativas (Trocado et al., 2021).

Importante ressaltar que, em uma das MGN que abrigava o gene *tem*, segundo o CLSI, teve classificação fenotípica com resistência intermediária ao antimicrobiano sulfametoxazol-trimetoprima, no entanto na interpretação do ponto de corte do BrCAST, foi classificada como sensível.

Das sete diferentes MGN de resistência a antimicrobianos em que o gene *tem* foi detectado, três foram de uma única amostra de queijo e apresentavam coexistência com o gene *shv*. Outro ponto importante, foi que esse gene apresentou maior resistência ao sulfametoxazol-trimetoprima, antimicrobiano não beta-lactâmico, assim como o gene *ctx* foi principalmente detectada nas MGN resistentes à tetraciclina. Kürekci et al. (2016) detectou *E. coli* produtores de ESBL resistentes à tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprima. O estudo de da Silva Abreu et al. (2021) demonstrou a maior contagem genes beta-lactâmicos nas microbiotas resistentes à tetraciclina, seguidos pelas penicilinas.

Os genes de codificação de ESBL são frequentemente detectados em plasmídeos e elementos genéticos móveis, como sequências de inserção, integrons e transposons, conferindo múltiplas co-resistências a outras classes antimicrobianas (Paterson & Bonomo, 2005; Xu et al., 2015). As enzimas do tipo ESBL *ctx-M*, estão amplamente difundidas e desde o início dos anos 2000, foram reconhecidas como o grupo ESBL mais dominante, substituindo *tem* e *shv*. Ainda que existam opções terapêuticas

para isolados portadores dessas enzimas, a combinação dessas enzimas em isolados com outros mecanismos de resistência podem limitar a atividade de agentes mais novos (Castanheira et al., 2021).

Embora os marcadores de resistência à tetraciclina analisados em nosso estudo, não tenham aparecido como os mais prevalentes nas amostras analisadas, merecem atenção. Visto que, a tetraciclina é um fármaco frequentemente utilizado em animais criados para produção de alimentos e, no Brasil, a venda desse antimicrobiano para uso animal não é controlada (Barros, 2021). Um estudo que avaliou a presença genes de resistência em isolados de *E. coli* patogênicas provenientes de bovinos em dois países europeus, identificou os genes *tetA* e *tetB* como os mais prevalentes, em mais da metade das cepas analisadas, destacando potenciais riscos à saúde associados ao consumo de alimentos de origem animal (Tabaran et al., 2022).

Do total de amostras analisadas, 13% e 38%, abrigavam os genes *tetA* e *tetB*, respectivamente. Em consonância aos nossos resultados, estudos encontraram marcadores de resistência às tetraciclina em diferentes amostras de queijo minas (De Paula et al., 2018; Elkenany et al., 2022; Hammad et al., 2022; Silva et al., 2020).

Nenhuma das MGN analisadas carregavam os genes *kpc*, *oxa*, *oxa-48*, *mcr-1* e *qacEA1*. Ainda que seja raro a investigação desses genes em produtos lácteos, a presença de marcadores de resistência para os β -lactâmicos, foi encontrado o gene *oxa-48* no estudo de Silva et. al (2020), e em estudo mais recente, realizado na Turquia, os genes *kpc* e *oxa-48*, foram identificados em isoladas de amostras de leite cru (Uyanik et al., 2022).

Uma outra grande preocupação de saúde pública é o gene de resistência à colistina (*mcr*), droga de último recurso contra infecções letais. Nagy et al. (2021) em um estudo de revisão, observaram que apesar da presença desse gene em leite e produtos lácteos ser subpesquisada e, quando pesquisado, indicar baixa incidência, foi detectado em análises de produtos lácteos, em quase todos os continentes.

4. Conclusão

O estudo detectou a presença alarmante de genes de resistência aos antimicrobianos em queijos servidos a pacientes hospitalizados, reforçando a importância de estratégias de vigilância sobre o contexto do alimento como uma fonte potencial para a disseminação de bactérias resistentes a antimicrobiano. Um outro destaque neste trabalho, foi a diversidade de genes detectados, a partir do método de seleção de microbiota Gram-negativa.

Como perspectivas de trabalhos futuros, para a garantia da segurança alimentar em ambiente hospitalar, sugere-se o desenvolvimento de estudos que investiguem a ocorrência de resistência aos antimicrobianos a partir de outros alimentos servidos aos pacientes internados, como também a utilização do método de seleção de microbiota Gram-negativa tentando ampliar a detecção da resistência antimicrobiana.

Referências

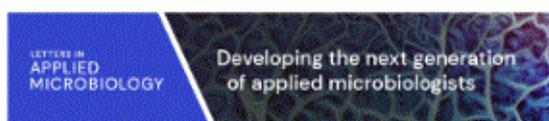
- Al-Ashmary, M. A., Sallam, K. I., Abd-Elghary, S. M., Elhadidy, M., & Tamara, T. (2016). Prevalence, molecular characterization, and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products. *Foodborne Pathogens and Disease*, 13(3), 156–162.
- Ambler, R. P. (1980). The structure of β -lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 289(1036), 321–331.
- Azimi, L., Rastegar-Lari, A., Talebi, M., Ebrahimzadeh-Narvaar, A., & Soleymanzadeh-Moghadam, S. (2013). Evaluation of phenotypic methods for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* in Tehran. *Journal of Medical Microbiology*, 3(3–4), 26–31.
- Bacardi, M., & Bagan, N. (2019). Importance of antibiotic residues in animal food. *Food and Chemical Toxicology*, 125, 462–466. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.01.033>
- Barros, R. R. (2021). Antimicrobial Resistance among Beta-Hemolytic *Streptococcus* in Brazil: An Overview. *Antibiotics*, 10(8), 973. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080973>
- Secretaria de Vigilância em Saúde, Portaria n° 64 de 11 de dezembro de 2018, Diário Oficial da União (2018). <https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=14/12/2018&jornal=515&pagina=59>

- Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2018). *Termo de ratificação do acordo de cooperação técnico-científica do Br-CAST 23-out-2018*. <http://brcast.org.br/documentos/>
- Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing/European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2022). *Tabela pontos de corte clínica Br-CAST 14-abr-2022*. <http://brcast.org.br/tabela-pontos-de-corte-clinicas-BrCAST-2017-final.pdf>
- Castanheira, M., Simner, P. J., & Bradford, P. A. (2021). Extended-spectrum β -lactamases: An update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC-Antimicrobial Resistance*, 3(3), dlab092. <https://doi.org/10.1093/jacarm/dlab092>
- Cavaco, L., Mordhorst, H., & Hendriksen, R. (2016). Laboratory protocol: PCR for plasmid-mediated colistin resistance genes. *Lyngby, Denmark: National Food Institute*.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2009). Laboratory protocol for detection of carbapenem-resistant or carbapenemase-producing, *Klebsiella* spp. And *E. coli* from rectal swabs. Atlanta, GA: CDC.
- Centers for Disease Control and Prevention. (2019). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. *EFSA Journal*, 17(2), e05598. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5598>
- Cerco, E., Deitelweig, S. B., Sherman, B. M., & Amin, A. N. (2016). Multidrug-resistant gram-negative bacterial infections in the hospital setting: Overview, implications for clinical practice, and emerging treatment options. *Microbial Drug Resistance*, 22(5), 412–431.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2018). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *CLSI supplement M100*.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2022). *EM100 Connect—CLSI M100-ED32-2022*. <http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20ED32:2022&scope=user>
- Collignon, P. (2013). The importance of a One Health Approach to Preventing the Development and Spread of Antibiotic Resistance. Em J. S. Mackenzie, M. Jeggo, P. Daszak, & J. A. Richt (Orgs.), *One Health: The Human-Animal-Environment Interfaces in Emerging Infectious Diseases: Food Safety and Security, and International and National Plans for Implementation of One Health Activities* (p. 19–36). Springer. https://doi.org/10.1007/978_2012_224
- da Silva Abreu, A. C., Matos, L. G., da Silva Cândido, T. J., Barbosa, G. R., de Souza, V. V. M. A., Manive Nêves, K. V., & Cirone Silva, N. C. (2021). Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. Isolated from organic and conventional Minas Frescal cheese producers in São Paulo, Brazil. *Journal of Dairy Science*, 104(4), 4012–4022. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19338>
- Dallenne, C., Da Costa, A., Decré, D., Favier, C., & Arlet, G. (2010). Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(3), 490–495.
- De Paula, A. C. L., Medeiros, J. D., De Azevedo, A. C., De Assis Chagas, J. M., Da Silva, V. L., & Dixit, C. G. (2018). Antibiotic Resistance Genetic Markers and Integrons in White Soft Cheese: Aspects of Clinical Resistance and Potentiality of Horizontal Gene Transfer. *Genes*, 9(2), 106. <https://doi.org/10.3390/genes9020106>
- De Paula Gollino, G., Machado Escobar, B., Dias da Silveira, I., Robales Siqueira, R. H., Ferreira, J. C., Da Costa Darini, A. L., & Bley Ribeiro, V. (2021). Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Southern Brazil. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*, 11(1). <https://doi.org/10.17058/reci.v11i.15017>
- Deng, Y., Bao, X., Ji, L., Chen, L., Liu, J., Miao, J., Chen, D., Bian, H., Li, Y., & Yu, G. (2015). Resistance integrons: Class 1, 2 and 3 integrons. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 14(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0100-6>
- Didelet, X., Bowden, R., Wilson, D. J., Peto, T. E., & Crook, D. W. (2012). Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. *Nature Reviews Genetics*, 13(9), 601–612.
- El Sahbi, A., Walsh, T. R., & Chouchani, C. (2013). Extended spectrum β -lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(2), 113–122. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.691870>
- Elkernary, R., Eltaysh, R., Elsayed, M., Abdel-Daim, M., & Shata, R. (2022). Characterization of multi-resistant *Shigella* species isolated from raw cow milk and milk products. *Journal of Veterinary Medical Science*, 84(7), 890–897. <https://doi.org/10.1292/jvms.22-0018>
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2022). *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0*. <http://www.eucast.org>.
- Ghaly, T. M., Chow, L., Asher, A. J., Waldren, L. S., & Gillings, M. R. (2017). Evolution of class 1 integrons: Mobilization and dispersal via food-borne bacteria. *PLOS ONE*, 12(6), e0179169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179169>
- Gao, L., Long, M., Huang, Y., Wu, G., Deng, W., Yang, X., Li, B., Meng, Y., Cheng, L., & Fan, L. (2015). Antimicrobial and disinfectant resistance of *Escherichia coli* isolated from giant pandas. *Journal of Applied Microbiology*, 119(1), 55–64.
- Hammad, A. M., Eltahir, A., Hassan, H. A., Abbas, N. H., Hussien, H., & Shimamoto, T. (2022). Loads of Coliforms and Fecal Coliforms and Characterization of Thermotolerant *Escherichia coli* in Fresh Raw Milk Cheese. *Food*, 11(3), 332. <https://doi.org/10.3390/foods11030332>
- Hayashi, W., Tanaka, H., Taniguchi, Y., & ... (2019). Acquisition of *mcr-1* and Cocciage of Virulence Genes in Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolates from Municipal Wastewater Effluents in Japan. *Applied and ...*, Query date: 2021-09-17 12:37:32. <https://doi.org/10.1128/AEM.01661-19>
- Himedia, S. (2011). *Agar (Salmonella Shigella Agar)*.
- Hleba, L., Petrović, J., Kántor, A., Čubok, J., & Kačarić, M. (2015). Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae strains isolated from chicken and milk samples. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2015, 19–22.

- Kaye, K. S., & Poppe, J. M. (2015). Infections Caused by Resistant Gram-Negative Bacteria: Epidemiology and Management. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 35(10), 949–962. <https://doi.org/10.1002/plar.1636>
- Koch, B. J., Hangate, B. A., & Price, L. B. (2017). Food-animal production and the spread of antibiotic resistance: The role of ecology. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 15(6), 309–318. <https://doi.org/10.1002/fee.1505>
- Kürekci, C., Arkadaş, M., & Ayar, Y. K. (2016). Occurrence, genetic characterization and antimicrobial resistance of extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* isolated from Sirk samples, a traditional turkish cheese. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 10(3), 709–714. <https://doi.org/10.1007/s11694-016-9355-7>
- Lanz, R., Kuhnert, P., & Boerlin, P. (2003). Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Veterinary microbiology*, 91(1), 73–84.
- Leffon-Guibout, V., Jurand, C., Bonaccorsi, S., Espirasse, F., Guelli, M. C., Dupontail, F., Heym, B., Bingen, E., & Nicolas-Chanoine, M.-H. (2004). Emergence and spread of three closely related virulent isolates of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* with variable resistance to aminoglycosides and tetracycline in a French geriatric hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(10), 3736–3742.
- Lund, B. M., & O'Brien, S. J. (2011). The Occurrence and Prevention of Foodborne Disease in Vulnerable People. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(9), 961–973. <https://doi.org/10.1089/fpd.2011.0860>
- Martins, A. F., & Rabinowitz, P. (2020). The impact of antimicrobial resistance in the environment on public health. *Future Microbiology*, 15(9), 699–702. <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0331>
- Nagy, Á., Székelyhidfi, R., Hanczák Lakatos, E., & Kapeszinski, V. (2021). Review on the occurrence of the *mer-1* gene causing colistin resistance in cow's milk and dairy products. *Heliyon*, 7(4), e068800. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e068800>
- Nielsen, K. M., Domingues, S., & da Silva, G. J. (2015). Global dissemination patterns of common gene cassette arrays in class 1 integrons. *Microbiology*, 161(7), 1313–1337. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000099>
- Nilsson, V. (2021). *The occurrence of antibiotic resistant bacteria in Swedish dairy products—A pilot study.*
- Nisba, A. (2008). Antibiotic residues—a global health hazard. *Veterinary world*, 11(12), 375.
- O'Neill, J. (2014). Review on antimicrobial resistance. *Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations*, 2014(4).
- Organização Pan-Americana da Saúde. (2020). *Resistência antimicrobiana—OP/AS/OAS*. <https://www.paho.org/pt/topicos/resistencia-antimicrobiana>.
- Paterson, D. L., & Benzoni, R. A. (2005). Extended-Spectrum β -Lactamases: A Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 657–686. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>
- Peirano, G., Agerso, Y., Aarestrup, F. M., dos Reis, E. M. F., & dos Prazeres Rodrigues, D. (2006). Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(2), 305–309. <https://doi.org/10.1093/jac/dkl248>
- Peirel, L., Walsh, T. R., Cavillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 79(1), 119–123.
- Quintieri, Fanelli, & Caputo. (2019). Antibiotic Resistant *Pseudomonas* Spp. Spoilers in Fresh Dairy Products: An Underestimated Risk and the Control Strategies. *Food*, 8(9), 372. <https://doi.org/10.3390/foods8090372>
- Randall, C. P., Mariner, K. R., Chopra, I., & O'Neill, A. J. (2013). The target of daptomycin is absent from *Escherichia coli* and other gram-negative pathogens. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(1), 637–639.
- San Millán, A. (2018). Evolution of plasmid-mediated antibiotic resistance in the clinical context. *Trends in microbiology*, 26(12), 978–985.
- Silva, C. R., Okano, N. T., Macedo, V. H. L. de M., Freire, I. D. R., Miller, R. M., & Marin, V. A. (2020). Resistance in gram-negative bacteria from soft cheese in Brazil. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 19(3), 430. <https://doi.org/10.9771/embio.v19i3.35460>
- Tabaran, A., Soulaigeon, V., Chirila, F., Reget, O. L., Mihaiu, M., Borzan, M., & Dan, S. D. (2022). Pathogenic *E. coli* from Cattle as a Reservoir of Resistance Genes to Various Groups of Antibiotics. *Antibiotics*, 11(3), 404. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030404>
- Trocado, N. D., de Moraes, M. S., Avelada, L., Silva, C. R., & Marin, V. A. (2021). Phenotypic and genotypic detection of antibiotic-resistant bacteria in fresh fruit juices from a public hospital in Rio de Janeiro. *Archives of Microbiology*, 203(4), 1471–1475. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02139-9>
- Uyanik, T., Çadirci, Ö., Güçlükoğlu, A., & Can, C. (2022). Investigation of major carbapenemase genes in ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from raw milk in Black Sea region of Turkey. *International Dairy Journal*, 128, 105315. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105315>
- World Health Organization. (2017). *WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed*. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- World Health Organization. (2020). *Antibiotic resistance*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
- Xiong, L., Sun, Y., Shi, L., & Yan, H. (2019). Characterization of antimicrobial resistance genes and class 1 integrase gene in raw meat and aquatic product, fresh vegetable and fruit, and swine manure in southern China. *Food Control*, 104, 240–246. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.05.004KUR>
- Xu, G., An, W., Wang, H., & Zhang, X. (2015). Prevalence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from piglets with post-weaning diarrhea in Heilongjiang province, China. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01103>

APÊNDICE B -PRESENCE OF B-LACTAMASE PRODUCING BACTERIA IN FOODS IN BRAZIL – ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA LETTERS IN APPLIED MICROBIOLOGY

Letters in Applied Microbiology



Presence of β -lactamase producing bacteria in foods in Brazil

| | |
|-------------------------------|---|
| Journal: | <i>Letters in Applied Microbiology</i> |
| Manuscript ID | Draft |
| Manuscript type: | Review Article |
| Date Submitted by the Author: | n/a |
| Complete List of Authors: | MELO, FABIANA; Federal University of the State of Rio de Janeiro Silva, Cristiane; Federal University of the State of Rio de Janeiro Carvalho, Gabriel; Federal University of the State of Rio de Janeiro Marin, Víctor; Federal University of the State of Rio de Janeiro |
| Abstract: | Resistance to β -lactams among GNB-BL makes the treatment of bacterial infections increasingly limited. Foods consumed raw can be reservoirs for β -lactamase dissemination and vectors of foodborne infectious diseases in humans. The excessive and improper use of antibiotics in agriculture aggravates the selection and propagation of genes resistant to β -lactams. This dissemination is intertwined with several sectors linked to the food production chain, with consequences for animal, human, and environmental health. In this sense, measures to reduce the burden of antibiotic resistance are important in middle-income countries, such as Brazil, which has its economic foundation in agribusiness. This review aims to discuss the characteristics and dynamics of GNB-BL, main contamination routes, and actions to mitigate AMR among GNB from raw foods produced in Brazil. |

SCHOLARONE™
Manuscripts

1 **Title:** Presence of β -lactamase producing bacteria in foods in Brazil

2 **Authors:** Fabiana Montovanele de Melo¹ *, Cristiane Rodrigues Silva², Gabriel Lopes Carvalho²,
3 Victor Augustus Marin².

4 ¹ Graduate Program in Food and Nutrition - Federal University of the State of Rio de Janeiro, Brazil.

5 ² Federal University of the State of Rio de Janeiro, Brazil.

6 ***Corresponding author:** Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro -Avenida Pasteur, 296,
7 Urca, Rio de Janeiro-RJ, Brasil- Zip code: 22.290-240 - E-mail: fabimontovanele@edu.unirio.br -
8 Phone: +55-21- 988015744.

9 **Running title:** β -lactamase in foods in Brazil

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24 **Impact Statement**

25 Antibiotic resistance is one of the main threats to global public health. Gram-negative bacteria
26 producing β -lactamases (GNB-BL) in raw foods can transmit resistance genes and cause infectious
27 diseases in humans. The excessive and improper use of antibiotics in agriculture drives the spread of
28 resistance to essential antibiotics in treating bacterial infections, the β -lactams. This article reviews
29 the literature on the characteristics, dynamics, and routes of GNB-BL contamination from raw foods
30 produced in Brazil. The authors also discuss possible actions to mitigate antibiotic resistance among
31 GNBs from these foods.

32

33 **Abstract**

34 Resistance to β -lactams among GNB-BL makes the treatment of bacterial infections
35 increasingly limited. Foods consumed raw can be reservoirs for β -lactamase dissemination and
36 vectors of foodborne infectious diseases in humans. The excessive and improper use of antibiotics in
37 agriculture aggravates the selection and propagation of genes resistant to β -lactams. This
38 dissemination is intertwined with several sectors linked to the food production chain, with
39 consequences for animal, human, and environmental health. In this sense, measures to reduce the
40 burden of antibiotic resistance are important in middle-income countries, such as Brazil, which has
41 its economic foundation in agribusiness. This review aims to discuss the characteristics and dynamics
42 of GNB-BL, main contamination routes, and actions to mitigate AMR among GNB from raw foods
43 produced in Brazil.

44 **Keywords:** Gram-negative bacteria; β -lactamases; Antimicrobial resistance; Raw foods; Food safety.

45

46

47

48

49

50 **Introduction**

51 Food can carry pathogenic biological agents that are dangerous to human health. Among
52 contaminated foods, those consumed raw have a greater risk of human exposure to these agents and
53 their toxins, which may represent an important source of human morbidity and mortality (FAO &
54 WHO, 2019; CDC, 2023). The World Health Organization (WHO) has estimated that the
55 consumption of contaminated food can cause illness in around 600 million people and 420,000 deaths
56 each year, which means an annual loss of 33 million disability-adjusted life years. Pathogenic bacteria
57 represent 80% of the burden of foodborne diseases (FBDs) (WHO, 2015). The negative impact of
58 FBDs is aggravated by the resistance of foodborne bacteria to antibiotics, with unfavorable
59 consequences for economic development, such as high healthcare costs and lost.

60 Antimicrobial resistance (AMR) occurs when bacteria can survive the action of the antibioti
61 cs used to treat them, increasing the risk of complications and death. According to WHO data from
62 2019, AMR is directly associated with more than 1.27 million deaths, and another 4.95 million indir
63 ectly, and is considered one of the ten greatest threats to global health in the 21st century, with a gre
64 ater burden on low- and middle
65 countries (WHO, 2022). AMR is a global health crisis, and without immediate interventions, by 205
66 0 it could become the leading cause of death in the world (O'Neill, 2016; Walsh et al., 2023). In the
67 economic context, the World Bank has estimated that AMR could generate an additional annual cos
68 t to health systems of 1 billion dollars by 2050; and 1 to 3.4 billion dollars in Gross Domestic Produ
69 ct losses per year by 2030 worldwide (Jonas et al., 2017).

70 Among the bacterial mechanisms related to AMR is adaptation in response to environmental
71 pressure, either by mutation or by acquiring a resistance gene. In addition to resisting the action of
72 antibiotics, these mechanisms also drive the circulation of antibiotic-resistant bacteria (ARB) and
73 antibiotic-resistance genes (ARG) in various environments (Partridge et al., 2018).

74 The rapid global spread of ARB and ARG is attributed to the misuse of antibiotics in clinical
75 therapy, along with veterinary use and food production (Vasoo et al., 2015). The use of antibiotics in

76 livestock farming stands out as a key element in the rise of AMR (Thompson et al., 2023). High
77 exposure to antibiotics has facilitated the expansion of β -lactase-producing GNBs (BL-GNBs) in
78 clinical settings, reaching natural ecosystems (Bush, 2018). The most critical BL-GNBs are extended-
79 spectrum β -lactamase-producing GNBs (ESBL-GNBs) and carbapenemase-producing GNBs (CP-
80 GNBs), which top the list of critical priority pathogens published by the WHO and are capable of
81 dominating the most effective β -lactams used to treat multidrug-resistant infections (WHO, 2017).

82 Raw foods can be contaminated in primary production, including fruits, vegetables, and dairy
83 products, representing a dangerous human exposure route to BL-GNBs (Ben Said et al., 2015; Zhao
84 et al., 2022; Loeza-Lara et al., 2023). The growing expansion of BL-GNBs is a critical issue in Brazil,
85 an important country in food production for national and international consumption. However,
86 information about AMR host and source trends is limited in Brazilian territory. Genetic monitoring
87 of potential AMR vectors is essential for infection management (de Souza et al., 2023). Thus, the
88 objective of this review was to discuss the characteristics and dynamics of BL-GNBs, main
89 contamination routes, and possible actions to mitigate AMR among GNBs from raw foods produced
90 in Brazil.

91 **GNBs, β -lactam and β -lactamases**

92 Penicillin, an antibiotic effective in the treatment of several infectious diseases, was
93 discovered in 1928 but only became clinically available in 1945 (Tan & Tatsumura, 2015). But even
94 before this milestone in antibiotic therapy, a resistant strain had already been documented in BGN
95 isolated from *Escherichia coli* in 1940 (Abraham & Chain, 1940).

96 Antibiotic derivatives with an amplified spectrum of activity formed the β -lactam class,
97 composed of penicillins, cephalosporins, and carbapenems. β -lactams have the β -lactam ring in their
98 structural core, which prevents the formation of cross-links between the peptide chains to form
99 peptidoglycan. With the disruption of the cell wall, bacteria lose resistance to osmotic pressure,
100 leading to cell death (Silhavy et al., 2010). The most problematic resistance to β -lactams is related to
101 the production of β -lactamases, which are enzymes that inactivate β -lactam antibiotics. With a

102 relatively simple mechanism, β -lactamases are challenging due to their efficiency in resisting the
103 action of these antibiotics (Kim et al., 2023).

104 With the success of clinical efficacy, the extensive use of β -lactams was maintained, and in
105 ways that could not have been predicted, AMR advanced. After mastering the basic structure of
106 penicillin, the fight against AMR began, with new derivatives that circumvented the action of β -
107 lactamases (Bush, 2018). In an attempt to circumvent the action of β -lactamases, combinations of
108 susceptible β -lactams with enzyme inhibitors were developed (e.g., clavulanic acid, sulbactam)
109 (Drawz & Bonomo, 2010). Over time, resistance mechanisms have become more effective and
110 sophisticated, so that, nowadays, bacterial strains have acquired resistance to almost all available β -
111 lactams (Drawz & Bonomo, 2010; Costa et al., 2015; Kim et al., 2023). However, the β -lactam class,
112 even today, has the greatest empirical coverage prescribed worldwide, due to its selectivity, high
113 tissue perfusion, low cost, and safety profile (Stašek et al., 2023).

114 GNBs are a priority target in the fight against AMR due to their distinct outer membrane,
115 which makes them more efficient in surviving and adapting to the selective pressures imposed by
116 exposure to β -lactams (Salahuddin et al., 2017). β -lactamases are distributed in diversity and
117 abundance in their cellular matrix, which may explain why the expression of inactivating enzymes is
118 the most significant AMR mechanism in more adapted GNB (Bush & Bradford, 2020).

119 In the 1970s, the rapid limitation of therapeutic options led to the constant monitoring of β -
120 lactamase genes (Massova & Mobashery, 1998). Thousands of β -lactamases sequences have been
121 identified, as a single nucleotide mutation is enough to expressly alter their phenotypic behavior.
122 Therefore, it is challenging to categorize β -lactamases into families with related characteristics
123 (Ambler, 1980; Bush & Jacoby, 2010; Bush, 2023).

124 β -lactamases are categorized into 4 groups: penicillinases, cephalosporinases, extended-
125 spectrum β -lactamase (ESBL), and carbapenemases (CP). ESBL-GNBs and CP-GNBs are the most
126 worrying in clinical aspects, as they have limited or intractable therapeutic options, in addition to
127 commonly presenting multiclass resistance. ESBL-GNBs are resistant to first to fourth-generation

128 cephalosporins, while CP-GNBs hydrolyze carbapenems, antibiotics used in serious infections, as
129 well as all their predecessors (de Souza et al., 2023; Vasoo et al., 2015).

130 ESBL-GNBs are the most common causes of infections reported in hospitals and the
131 community; they carry a favorable genetic repertoire, which allows them to resist various therapeutic
132 options and are not restricted to hospital environments (Fuga, Sellera, Cerdeira, Esposito, Cardoso,
133 Fontana, Moura, Cárdenas-Arias, et al., 2022). ESBL-GNBs CTX-M, SHV and TEM represent the
134 most important ESBL-GNBs in global prevalence. The CTX-M-15 variant is the most widespread
135 worldwide, propagated by clonal expansion and dissemination via ARGs in different species of
136 clinical, community, environmental and food origin (Bush & Bradford, 2019; de Oliveira Santos et
137 al., 2022). The main types of BL-GNB genes, depending on each critical pathogen in the food chain,
138 are described in Table 1.

139 Although there are therapeutic drugs available to treat these infections, ESBL variants are
140 widespread globally, and increasingly adapting in response to the excessive and inappropriate use of
141 β -lactams. This panorama is a growing challenge for global health managers, as the evolution of
142 ESBL may reduce treatment options, and force health services to resort to the restricted use of
143 carbapenems, currently prescribed in hospital settings for potentially fatal infections. The greater
144 demand for these antibiotics can lead to the rapid evolution of carbapenemases and make more serious
145 infections untreatable (Payne et al., 2000).

146

147 **The complex pathway of elements determining resistance to β -lactams in the food chain**

148 Humans are the largest contributor to the accumulation and dissemination of ARGs, with
149 approximately 85% of ARGs shared between outdoor habitats and human feces (Zhang et al., 2023).
150 Furthermore, anthropogenic actions in agriculture can also have a significant impact on the
151 transmission of AMR (Murray et al., 2022; Brunn et al., 2022; Olaru et al., 2023). Intensive food
152 production systems were driven by the exponential increase in food demand due to the massive
153 growth of the global population. However, associated with a greater food supply, the excessive use

154 of antibiotics has established itself as an essential factor for yield and better productivity (Saath &
155 Fachinello, 2018; Shahid et al., 2023).

156 Residues and metabolites of active antibiotics, in subinhibitory quantities generated by
157 agriculture, potentially contribute to the worsening of AMR (Shahid et al., 2023). In turn, the waste
158 originating from this production, with BNGs and AGRs, can be deposited in the soil, directly or as
159 organic fertilizer, or even spread in aquatic environments (Ikhimiukor & Okeke, 2023).

160 Livestock farming is considered a potential “hotspot” for the dissemination and development
161 of ARGs. In animal production, antibiotics are added, in low doses, to animal feed or water, mainly
162 as growth promoters (Van Boeckel et al., 2019). The transmission of AMR in animal production
163 generally occurs through the consumption of meat, milk, and derivatives; however, the antibiotic and
164 biological residues generated can follow intricate paths, allowing genes associated with AMR to enter
165 the food chain from the soil (biofertilizer), air (bioaerosols), water (irrigation, effluents, sewage, and
166 natural resources), and/or direct fecal contamination. Furthermore, the use of antibiotics in animal
167 products that are also used in human medicine can lead to the development of cross-resistance (Tiedje
168 et al., 2023).

169 In agriculture, pesticides have been widely used to minimize economic losses in crops due to
170 pests (Lima et al., 2020). However, although the consequences of these chemicals on human health
171 and the environment are reasonably known, it is still unknown whether microbial responses to
172 pesticides can trigger AMR (Ramakrishnan et al., 2019).

173 A wide diversity of β -lactamases are identified in plant tissues and surfaces, although β -
174 lactams are not among the vital biocides in agriculture (Y.-J. Zhang et al., 2019). The natural
175 microbiota of plant products, in addition to hosts, produce their antibiotics (e.g., penicillin by fungi),
176 which exert selective pressure on endogenous ARGs along with natural intrinsic genes (Martinez-
177 Klimova et al., 2017).

178 ARBs can live in symbiosis with plants, fixing nitrogen available for plant growth, in
179 exchange for habitat and nutrients. These ARBs are closely linked to water, soil and air, and have

180 different habitats in plants: colonized on the surface of leaves (phyllosphere) and around roots
181 (rhizosphere). Once colonized in these habitats, they can be absorbed into the internal part of the plant
182 (endosphere), promoting the abundance and diversity of ARGs in edible portions of vegetables
183 (Chelaghma et al., 2021).

184 β -lactamases from food and/or environmental sources can resist the digestive process,
185 colonize, and spread among commensals of the intestinal microbiota, even in the absence of
186 antimicrobial selection (Zhou et al., 2022). In this context, food, humans, animals, and environments
187 may have broad interconnected and shared reservoirs, potentially accelerating the occurrence and
188 dissemination of ARGs among different hosts (Tiedje et al., 2023). CTX-M β -lactamases are
189 ubiquitous in sources throughout the food production chain and are commonly associated with mobile
190 genetic elements (MGEs) (I. M. Ahmed, 2021).

191 Other food additives used in agriculture, such as heavy metals (e.g., copper, zinc),
192 disinfectants, and pesticides, can play an important role in AMR as a contributor and intensifier of
193 the selection of resistant bacteria (FAO & WHO, 2019; Ramakrishnan et al., 2019).

194

195 **Mechanisms of transfer and adaptation of β -lactamases between food chain niches**

196 BL-GNBs that carry immobile β -lactamases on chromosomes are capable of disseminating β -
197 lactamase as they replicate (Gauba & Rahman, 2023). However, the evolution of AMR was achieved
198 by the exchange of genetic material between different bacteria and habitats; this mechanism is called
199 horizontal gene transfer (HGT) (Alekshun & Levy, 2007). Other genes and elements with important
200 harmful properties benefit from HGT, such as virulence and biofilm genes, influencing pathogenicity
201 (Novick & Ram, 2016).

202 The mobilization of β -lactamase genes normally occurs in MGEs named plasmids,
203 transposons and integrons. Among the MGEs, the integron draws attention for conferring diversity
204 and genomic expression, predominantly of ARGs, which are mainly widespread in the chromosomes
205 of environmental bacteria. Today, they are considered significant pollutants in natural environments,

206 generating reservoirs in different ecological niches spread globally and mainly expressing resistance
207 to β -lactams (Ghaly et al., 2022; Zheng et al., 2020). With increasing anthropogenic pressures,
208 reservoirs of β -lactamases are expected to increase in various niches along the food chain, which are
209 constantly shared with human, animal, and environmental reservoirs (Husna et al., 2023; Zheng et
210 al., 2020).

211

212 **Repercussions of bacterial resistance to antibiotics on food safety**

213 Food consumption can directly influence the modulation of human or animal intestinal
214 microbiota through a diverse and competitive ecosystem of commensal bacteria and opportunistic
215 pathogens transmitted by food (Figure 1. Possible transfer routes of BL-GNBs and BL-ARGs in the
216 food chain from raw foods. HGT can occur in all niches of the food chain) (Zhou et al., 2022). This
217 dynamic system is influenced by a myriad of factors that correlate and make the individual more
218 vulnerable, from the level of pollution in agroecosystems to the inherent characteristics of the host,
219 such as sociodemographic patterns, misuse of antibiotics and immune function (Grudlewska-Buda et
220 al., 2023a; Steinfeld et al., 2006).

221 From the farm to table path, resistance determinants and MGEs from multiple sources can be
222 preserved in broad reservoirs colonized in food. In this context, various foods may carry β -lactamases
223 genes, which are directly associated with AMR in the human clinic (Antunes et al., 2020; Carvalheira
224 et al., 2017; Simpson et al., 1980; Tekiner & Özpınar, 2016). Less frequently occurring,
225 contamination of food-borne pathogens in humans can also occur directly, through contact with
226 infected animals or humans (De Alcântara Rodrigues et al., 2020).

227 Regardless of food origin, the increase in cases of FDBs may be associated with growing
228 consumer demand for a wide range of raw foods or minimally processed products (CDC, 2023; FAO
229 & WHO, 2019).

230 To facilitate understanding, in this article, raw foods are defined as all foods of animal or
231 vegetable origin, fresh or minimally processed, that, to be consumed, do not need to be subjected to

232 prior heat treatments. These foods are the main cause of FDBs, especially vegetables, fruits, milk,
233 and their derivatives (CDC, 2023a; Hoffmann et al., 2017). The threat to human health attributed to
234 the consumption of these foods can be explained by greater exposure to AGRs and substances with
235 different degrees of virulence and toxicity since most harmful agents do not survive applied heat
236 treatments (Bryan, 1978). Furthermore, cleaning and sanitizing procedures can remove microbial
237 contaminants adhered to the surface, but, once inside the food (endophyte), these procedures cannot
238 remove these agents (Zhao et al., 2022).

239 The contamination of foods of plant origin is more related to the planting method, mainly due
240 to the use of wastewater and biofertilizers originating mainly in circumstances where antibiotics were
241 improperly applied (Lenzi et al., 2021; Fu et al., 2019). In the case of milk and its derivatives,
242 contamination can occur through contact with feces during milking, or endogenously, as the milk
243 passes through the mammary glands, especially if the animal is infected with mastitis (Martin, 2015).

244 Largely due to their ability to move and house a wide variety of genetic information in a single
245 strain, the majority of Enterobacteriaceae have become resistant to the β -lactam class, (Bush &
246 Bradford, 2020; Harding-Crooks et al., 2023). Recently, extended-spectrum β -lactamase producing-
247 Enterobacteriaceae (ESBL-E) have been dispersed in different environments that are easy to
248 disseminate into the food system and are often associated with many FDBs, especially those of greater
249 severity (Alagna et al., 2020; Lee & Yoon, 2021). The most recent outbreaks of pathogenic *E. coli*
250 infections have involved reported cases of raw food consumption (Grudlewska-Buda et al., 2023).

251 Adapted *E. coli* strains are capable of acquiring and grouping virulence properties and being
252 categorized into pathotypes according to the degree of pathogenicity. These pathotypes invade the
253 host and can cause diseases of different natures, such as intestinal (e.g., enteropathogenic *E. coli*) and
254 extraintestinal (e.g., uropathogenic *E. coli*), which, in extreme cases, can cause septicemia and even
255 death (N. Ahmed et al. 2008). *E. coli* can acquire resistance and/or virulence genes from other
256 commensal species, including harmless ones (Alegria et al., 2020). Another threat to host food safety

257 is related to the fact that some pathotypes have low infectious doses and can cause disease even in
258 small numbers (Grudlewska-Buda et al., 2023).

259

260 **BL-GNBs reservoirs in food production in Brazil**

261 South American countries stand out for the increased incidence of deaths attributable to AMR
262 (Ciapponi et al., 2023; Murray et al., 2022; Pierce et al., 2020). Observational studies in this
263 subcontinent, which mainly include data from Brazil, indicate that the most critical β -lactamases,
264 which make the therapeutic use of third-generation cephalosporins and carbapenems unfeasible, are
265 more challenging in South America than in more developed regions (de Souza et al., 2023; Garcia-
266 Betancur et al., 2021).

267 Brazil is a country of interest for AMR scholars, due to its size of cultivable land and large
268 population (United Nations, 2022). In the country, the notification of pathogens from the ESBL-
269 producing critical priority group is worrying in the hospital area, but the growing number of integrated
270 reservoirs in the environment and the food chain is also a threat (Camargo et al., 2023; de Souza et
271 al., 2023; Gonçalves et al., 2019; WHO, 2017).

272 In the 1990s, with the opening of the Brazilian economy and greater financial support for
273 technological innovations, agriculture became a fundamental sector of the country's economic growth
274 (Molossi et al., 2023). It is estimated that in 2018, agribusiness occupied 29% of the territory. In the
275 period between 2000 and 2020, the country was responsible for 22.2% of global exports in the sector
276 (Contini et al., 2022).

277 This leadership position in agribusiness can lead to extensive, harmful production practices
278 that have a direct impact on the environment, and human and animal health. The evolution of AMR
279 dynamics between natural and opportunistic microbiota is enhanced by pollutants generated by
280 agriculture, such as antibiotic residues and molecular determinants of resistance. In addition to
281 agricultural farms, inadequate disposal of pollutants at home, pharmaceutical companies, and
282 hospitals are important factors in this pollution in Brazilian territory (Leroy-Freitas et al., 2022).

283 Recommended in national dietary guidelines for the Brazilian population, dietary transitions
284 towards healthy and sustainable diets have been increasing dietary patterns based on various fresh or
285 minimally processed foods, mainly vegetables and milk (Brazil, 2014). On the other hand, despite
286 moderate consumption in national recommendations, cheese is part of the diet of the majority of the
287 population and represents an important source of nutrients and proteins of high biological value
288 (Brazil, 2014; Scholz-Ahrens et al., 2020). However, usually consumed raw, these nutritious foods
289 can carry zoonotic pathogens, putting consumers' health at risk (Pineda et al., 2021; Verraes et al.,
290 2013; Breijyeh et al., 2020; Hölzel et al., 2018).

291 Pathogenic lineages of BL-GNBs species are clinically relevant and may be confined to foods
292 produced in different regions of Brazil. Table 2 brings together data from studies that carried out
293 genomic analysis of BL-GNBs DNA in raw foods produced in the country.

294 It has been demonstrated in these studies that raw foods can be reservoirs of broad genetic
295 content associated with ESBLs, including CTX, TEM, SHV and OXA genes. It is not surprising that
296 ESBL-producing *E. coli* strains are widespread in the food categories evaluated. In food, these
297 bacteria are capable of horizontally disseminating genetic content through integrons and plasmids
298 (IncFIB), with the cooperation of genes that confer resistance to biocides, heavy metals, disinfectants
299 and antiseptics (Fuga et al., 2022; Menezes et al., 2023; Parussolo et al., 2019).

300 Studies published on the topic in Brazil with genetic evaluation are few and recent. The
301 presence of global *E. coli* clones such as ST38 and ST648 indicates the hypothesis of dissemination
302 of ESBL-producing *E. coli* pathotypes in raw foods. Co-transport of OXA-1 with CTX-M-15 has
303 been identified in endophytic samples, which may vary susceptibility to penicillin/inhibitor
304 combinations (Livermore et al., 2019). This opportunistic bacterium was the protagonist in the
305 outbreaks of foodborne diseases that occurred in the country between 2009 and 2018. In turn, the
306 foods studied have been identified as a source of risk for several food-borne outbreaks caused by *E.*
307 *coli* (de Souza et al., 2023).

308 Successful adaptations of *E. coli* clones highlight the implications of “One-Health” in Brazil,
309 a global concept that consolidates and unifies human, animal, and environmental health, and that
310 actions that affect one sector can have an impact on others (Tiedje et al., 2023). Fresh vegetables
311 grown on Brazilian land can carry endophytic bacteria identified as critical priority clones that have
312 been previously identified in human infections (Fuga et al., 2022).

313 Although the current WHO assumptions of food chain interconnections encourage the
314 monitoring of the risks of various food categories at a national level, in Brazil, efforts are concentrated
315 on monitoring beef cattle, with increasing trends, in poultry and swine farming (ABAP, 2023; Contini
316 et al., 2022). On the other hand, monitoring of the food production chain produced by land cultivation
317 is still scarce in the country (Fuga et al., 2022).

318

319 **AMR's political agenda in Brazil with a focus on food**

320 Between 2000 and 2010, emerging countries, including Brazil, were responsible for 76% of
321 the global increase in the use of antibiotics. Factors such as restrictions on access to healthcare and
322 basic sanitation, and limited economic resources, present in Brazil and common to emerging
323 countries, increase the chance of populations in these countries contracting infections and transmitting
324 resistant bacteria (Hou et al., 2023). Recently, the challenges in controlling and preventing AMR have
325 worsened, due to the increase in the prescription of antibiotics and inadequate and incomplete
326 therapies, resulting from the effects of the SARS-CoV-2 pandemic in the country (Kiffer et al., 2023).

327 Brazil stands out, in Latin America, in the development of academic research to reduce the
328 abuse of antibiotics in animals, addressing a wide diversity of resistomes and virulomes. On the other
329 hand, there is still little scientific production linking AMR and β -lactamases genes with raw food
330 samples, especially milk, artisanal cheeses, and even fewer vegetable products (Andretta et al., 2023).

331 Antibiotic residues and bacterial resistance elements in products of animal origin, in addition
332 to hurting food and environmental safety, can represent a threat to the country's coffers due to the
333 stricter requirements of the main meat importing countries, regarding the limited maximum residues

334 for antibiotics and the presence of emerging contaminants specific to each country (ABPA, 2023;
335 Contini & Alves, 2023).

336 Brazil has been adopting measures to promote the responsible use of antibiotics in animal
337 production. From 1998 onward, antibiotics from different classes were gradually banned as growth
338 promoters, based on the WHO critical antibiotics list. However, the country still allows the use of
339 some antibiotics as animal growth-promoting agents, a practice already banned in the European
340 Union since 2006. While the use of β -lactams in animal production was completely banned in the
341 European Union, Brazil only banned their use as growth promoters, allowing their application as a
342 veterinary therapeutic option (Da Silva et al., 2023).

343 Although other specific actions were developed between the years 1990 and 2000, the main
344 milestone for Brazilian public policies related to AMR prevention and control, from the perspective
345 of human health, was the publication, in 2018, of the National Action Plan for Prevention and Control
346 of Antibiotic Resistance in the Scope of Single Health (PAN-BR). Coordinated by the Ministry of
347 Health and having several collaborating bodies, PAN-BR was the first initiative that sought to
348 consolidate a national agenda to combat AMR based on integrative management, under the "One
349 Health" perspective, proposed by the WHO (Brazil, 2018, 2021; Aguiar et al., 2023; Almeida et al.,
350 2023).

351 Although it was prepared from the perspective of the "One Health" concept, one of the most
352 scathing criticisms of the PAN-BR is that it has a limited approach to combating AMR, directing its
353 actions primarily to health services and only mentioning aspects of animal and environmental health
354 (Aguiar et al., 2023). As a result of PAN-BR guidelines, the National Action Plan for the Prevention
355 and Control of Antibiotic Resistance in Livestock (PAN-BR AGRO) was launched, with the aim of
356 "analyzing risks, trends, and patterns relating to AMR via foods of animal origin produced in Brazil,
357 generating collaborative data for decision-making and establishing public policies for the prevention
358 and control of resistance" (Brazil, 2021; de Oliveira Santos et al., 2022). According to MAPA, the
359 stage The initial plan, designed for the 2018-2022 five-year period, was conceived as a structuring

360 phase, to align national guidelines with international recommendations and requirements related to
361 the topic. For the next stage, the objective will be to maintain Brazil's compliance with international
362 initiatives on the topic, incorporating lessons learned in the first stage. Brazil's Agromonitora
363 system - a service designed to provide sales data for monitoring antibiotics for veterinary use, and the
364 development of international cooperation partnerships in the sector were the biggest advances made
365 by PAN-BR AGRO so far (Brazil, 2023).

366 Although the publication of PAN-BR and PAN-BR AGRO are considered important
367 milestones, there is still no research that confirms their effectiveness as an instrument to control the
368 spread of AMR in the country (de Oliveira et al., 2021; Brazil, 2023). To partially fill this gap, a
369 study, conducted in 2021 through interviews, sought to identify the perceptions of academics,
370 managers, and policymakers involved in the development of the PAN-BR on the implementation of
371 the plan and the challenges in confronting AMR. The researchers concluded, among other points, that
372 AMR is not yet considered a political priority in Brazil; and that the publication of the PAN-BR was
373 mainly due to the need to show, externally, an alignment with global efforts to combat AMR, seeking
374 not to harm Brazilian agribusiness. Furthermore, failures in coordination between the bodies involved
375 and the lack of definition of clear goals and indicators for monitoring were identified as factors that,
376 in the researchers' view, hindered the effective implementation of the PAN-BR (Corrêa et al., 2022).

377

378 **Conclusion**

379 Foods of animal and vegetable origin are potential reservoirs and carriers of BL-BGNs,
380 especially when consumed raw. Since Brazil is a large exporter of food products, this threat can cross
381 national borders, posing a risk to global health. Studies that carried out genetic analysis of raw foods
382 produced in the country indicated the presence of clones of international BL-BGNs of critical priority.
383 Brazilian legislation aimed at controlling the management of antibiotics in animals has advanced,
384 however, data on the effectiveness of these advances in the transmission of AMR are still scarce. The
385 adoption of measures that seek to reduce the risk of contamination in agricultural production is still

386 quite timid, and it is necessary to think about the environment, man and animal triad, including food
387 as one of the main reservoirs in the food chain.

388

389 **Acknowledgments**

390 Not applicable.

391 **Conflict of Interest**

392 The authors declare no conflict of interest.

393 **Author contributions**

394 Not applicable.

395 **Data Availability Statement**

396 There is no data associated with this study.

397

398

399

400

401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411

412 **References**

413

414 Abraham, E. P., & Chain, E. (1940). An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. *Nature*,
415 146(3713),

416

417 Aguiar, J. N., et al. (2023). Evolution of Brazilian human health policies for the prevention and control
418 of antimicrobial resistance: Scope review. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 47, 1.

419

420 Ahmed, I. M. (2021). Detection of CTX-M gene in extended-spectrum β -lactamases producing
421 Enterobacteriaceae isolated from bovine milk. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 35(2), 397–402.

422

423 Ahmed, N., (2008). Genomic fluidity and pathogenic bacteria: Applications in diagnosis,
424 epidemiology and intervention. *Nature Reviews Microbiology*, 6(5).

425

426 Alagna, L., et al. (2020). Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria Decolonization in
427 Immunocompromised Patients: A Focus on Fecal Microbiota Transplantation. *International Journal*
428 *of Molecular Sciences*, 21(16), 5619.

429

430 Alegria, Á., et al. (2020). Molecular Diversity of ESBL-Producing *Escherichia coli* from Foods of
431 Animal Origin and Human Patients. *International Journal of Environmental Research and Public*
432 *Health*, 17(4).

433

434 Alekshun, et al. (2007). Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell*, 128(6),
435 1037–1050.

436

- 437 Algammal, et al. (2020). Emerging MDR-*Pseudomonas aeruginosa* in fish commonly harbor *oprL*,
438 and *toxA* virulence genes and *bla*TEM, *bla*CTX-M, and *tetA* antibiotic-resistance genes. Scientific
439 Reports,
440
- 441 Almeida, W. N. M., et al. (2023). Impacts of antimicrobial use on antimicrobial resistance: A
442 literature review with a one-health approach. Brazilian University Magazine, 1(2).
443
- 444 Ambler, R. P. (1980). The structure of beta-lactamases. Philosophical Transactions of the Royal
445 Society of London. Series B, Biological Sciences, 289(1036), 321–331.
446
- 447 Andretta, M., Call, D. R., & Nero, L. A. (2023). Insights into antibiotic use in Brazilian dairy
448 production. 76(1), 28–37.
449
- 450 Antunes, P., Novais, C., & Peixe, L. (2020). Food-to-Humans Bacterial Transmission. Microbiology
451 Spectrum, 8(1).
452
- 453 Brazilian Animal Protein Association. (2023, December 15). Annual Report 2023.
454
- 455 Ben Said, et al. (2015). Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing
456 Enterobacteriaceae in vegetables, soil, and water of the farm environment in Tunisia. International
457 Journal of Food Microbiology, 203, 86–92.
458
- 459 Benlabidi, S et al. (2023). Occurrence of High-Risk Clonal Lineages ST58, ST69, ST224, and ST410
460 among Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolated from Healthy Free-
461 Range Chickens (*Gallus gallus domesticus*) in a Rural Region in Tunisia. Genes, 14(4).
462

- 463 Brazil. (2014). Food guide for the Brazilian population. Ministry of Health. Department of Health
464 Care. Department of Primary Care.
465
- 466 Brazil. (2018). National Action Plan for the Prevention and Control of Antimicrobial Resistance,
467 within the scope of Agriculture 2018-2022. Ministry of agriculture, livestock and supply.
468
- 469 Brazil. (2021). Antimicrobial Resistance Surveillance and Monitoring Program in Agriculture (2019-
470 2022). Ministry of agriculture, livestock and supply.
471
- 472 Brazil. (2023). Balance of activities - 1st stage (2018-2022). Ministry of agriculture, livestock and
473 supply.
474
- 475 Breijyeh, Z., et al. (2020). Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and
476 Approaches to Resolve It. *Molecules*, 25(6).
477
- 478 Brunn, A., et al. (2022). Characteristics and Global Occurrence of Human Pathogens Harboring
479 Antimicrobial Resistance in Food Crops: A Scoping Review. *Frontiers in Sustainable Food Systems*,
480 6.
481
- 482 Bryan, F. L. (1978). Factors that Contribute to Outbreaks of Foodborne Disease. *Journal of Food*
483 *Protection*, 41(10), 816–827.
484
- 485 Bush, K. (2018). Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and*
486 *Chemotherapy*, 62(10)
487

- 488 Bush, K. (2023). Classification for β -lactamases: Historical perspectives. *Expert Review of Anti-*
489 *infective Therapy*, 21(5), 513–522.
- 490
- 491 Bush, K., & Bradford, P. A. (2019). Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors.
492 *Nature Reviews Microbiology*, 17(5)
- 493
- 494 Bush, K., & Bradford, P. A. (2020). Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. *Clinical*
495 *Microbiology Reviews*, 33(2)
- 496
- 497 Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases.
498 *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3)
- 499
- 500 Camargo, C.H, et al. (2023). Genomics and Antimicrobial Susceptibility of Clinical *Pseudomonas*
501 *aeruginosa* Isolates from Hospitals in Brazil. *Pathogens*, 12(7).
- 502
- 503 Carvalheira, A., Silva, J., & Teixeira, P. (2017). Lettuce and fruits as a source of multidrug-resistant
504 *Acinetobacter* spp. *Food Microbiology*, 64, 119–125.
- 505
- 506 Centers for Disease Control and Preventio-CDC. (2023, November 30). Foodborne outbreaks | CDC.
507 CDC. (2023a, August 9). Foods that can cause food poisoning.
- 508
- 509 CDC (2023b, October 24). CDC: Salmonella Outbreak Linked to Fresh Diced Onions.
- 510
- 511 Chelaghma, W., et al. (2021). Vegetables and Fruit as a Reservoir of β -Lactam and Colistin-Resistant
512 Gram-Negative Bacteria: A Review. *Microorganisms*, 9(12).
- 513

- 514 Contini, E., & Alves, E. (2023). Tribute to Brazilian agriculture.
515
- 516 Contini, E., et al. (2022). Trajectory of agro (Platform Vision of the future of agro).
517
- 518 Corrêa, J. S., Zago, et al. (2022). Antimicrobial resistance in Brazil: An integrated research agenda.
519 USP Nursing School Magazine, 56.
520
- 521 Costa, T. R. D., et al. (2015). Secretion systems in Gram-negative bacteria: Structural and
522 mechanistic insights. *Nature Reviews Microbiology*, 13(6).
523
- 524 Costa-Ribeiro, et al. (2024). Assessment of the presence of *Acinetobacter* spp. Resistant to β -lactams
525 in commercial ready-to-eat salad samples. *Food Microbiology*, 118, 104410
526
- 527 Da Silva, et al. (2023). Regulations on the Use of Antibiotics in Livestock Production in South
528 America: A Comparative Literature Analysis. *Antibiotics*, 12(8),
529
- 530 De Alcântara Rodrigues, et al. (2020). Antimicrobial resistance genes in bacteria from animal-based
531 foods. In *Advances in Applied Microbiology* (Vol. 112, pp. 143–183).
532
- 533 de Oliveira, L, et al. (2021). Surveillance and monitoring of antimicrobial resistance in production
534 animals in Brazil: A review. *Journal Archives of Health*, 2(4), 1246–1249.
535
- 536 de Oliveira Santos, et al. (2022). Panorama of Bacterial Infections Caused by Epidemic Resistant
537 Strains. *Current Microbiology*, 79(6), 175.
538

- 539 de Souza, et al. (2023). Antibiotic resistance profiles on pathogenic bacteria in the Brazilian
540 environments. *Archives of Microbiology*, 205(5), 185
541
- 542 Drawz, S. M., & Bonomo, R. A. (2010). Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. *Clinical*
543 *Microbiology Reviews*, 23(1), 160–201.
544
- 545 FAO & WHO. (2019). Joint FAO/WHO Expert Meeting in collaboration with OIE on Foodborne
546 Antimicrobial Resistance: Role of the Environment, Crops and Biocides – Meeting report.
547 *Microbiological Risk Assessment*.
548
- 549 Fu, Q., et al. (2019). Pharmaceutical and Personal Care Products: From Wastewater Treatment into
550 Agro-Food Systems. *Environmental Science & Technology*, 53
551
- 552 Fuga, et al. (2022). WHO Critical Priority *Escherichia coli* as One Health Challenge for a Post-
553 Pandemic Scenario: Genomic Surveillance and Analysis of Current Trends in Brazil. *Microbiology*
554 *Spectrum*, 10(2), e01256-21
555
- 556 García-Betancur, J. C., et al. (2021). Update on the epidemiology of carbapenemases in Latin
557 America and the Caribbean. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 19(2), 197–213.
558
- 559 Gauba, A., & Rahman, K. M. (2023). Evaluation of Antibiotic Resistance Mechanisms in Gram-
560 Negative Bacteria. *Antibiotics*, 12(11),
561
- 562 Ghaly, T. M., et al. (2022). Methods for the targeted sequencing and analysis of integrons and their
563 gene cassettes from complex microbial communities. *Microbial Genomics*, 8(3).
564 <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000788>

565

566 Gonçalves, V. D., et al. (2019). Detection of multidrug-resistant Enterobacteriaceae isolated from
567 river waters flowing to the Guanabara Bay and from clinical samples of hospitals in Rio de Janeiro,
568 Brazil. *Biomédica*, 39,

569

570 Grudlewska-Buda et al. (2023a). Antibiotic Resistance in Selected Emerging Bacterial Foodborne
571 Pathogens—An Issue of Concern? *Antibiotics*, 12(5)

572

573 Harding-Crooks, R., Smith, D., Fanning, S., & Fox, E. M. (2023). Dissemination of carbapenemase-
574 producing Enterobacteriaceae and associated resistance determinants through global food systems.
575 *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*.

576

577 Hoffmann, S., et al. (2017). Attribution of global foodborne diseases to specific foods: Findings from
578 a World Health Organization structured expert elicitation.

579

580 Hölzel, C. S., et al. (2018). Unraveling the Role of Vegetables in Spreading Antimicrobial-Resistant
581 Bacteria: A Need for Quantitative Risk Assessment. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15(11), 671–
582 688.

583

584 Hou, J., et al. (2023). Global trends of antimicrobial resistance in common bacterial pathogens in
585 response to antibiotic consumption. *Journal of Hazardous Materials*, 442, 130042.

586

587 Husna, A., et al. (2023). Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBL): Challenges and Opportunities.
588 *Biomedicines*, 11(11)

589

- 590 Ikhimiukor, et al. (2023). A snapshot survey of antimicrobial resistance in food animals in low and
591 middle-income countries. *One Health*, 16, 100489.
- 592
- 593 Jonas, O. B et al. (2017). Drug-resistant infections: A threat to our economic future (Vol. 2): Final
594 report. HNP/Agriculture Global Antimicrobial Resistance Initiative.
- 595
- 596 Júnior, J. C. R et al. (2019). Short communication: Molecular characterization and antimicrobial
597 resistance of pathogenic *Escherichia coli* isolated from raw milk and Minas Frescal cheeses in Brazil.
598 *Journal of Dairy Science*, 102(12), 10850–10854.
- 599
- 600 Kiffer, C. R. V., et al. (2023). A 7-Year Brazilian National Perspective on Plasmid-Mediated
601 Carbapenem Resistance in Enterobacterales, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii*
602 Complex and the Impact of the Coronavirus Disease 2019 Pandemic on Their Occurrence. *Clinical*
603 *Infectious Diseases*, 77(Supplement_1), S29–S37.
- 604
- 605 Kim, D., et al. (2023). Structural Insights for β -Lactam Antibiotics. *Biomolecules & Therapeutics*,
606 31(2), 141–147.
- 607
- 608 Lee, H., & Yoon, Y. (2021). Etiological Agents Implicated in Foodborne Illness World Wide. *Food*
609 *Science of Animal Resources*, 41(1), 1–7.
- 610
- 611 Lenzi, A., Marvasi, M., & Baldi, A. (2021). Agronomic practices to limit pre- and post-harvest
612 contamination and proliferation of human pathogenic Enterobacteriaceae in vegetable production.
613 *Food Control*, 119, 107486.
- 614

- 615 Leroy-Freitas, D., et al. (2022). Exploring the microbiome, antibiotic resistance genes, mobile genetic
616 element, and potential resistant pathogens in municipal wastewater treatment plants in Brazil. *Science*
617 *of The Total Environment*, 842, 156773.
- 618
- 619 Lima, T., et al. (2020). Manure as a Potential Hotspot for Antibiotic Resistance Dissemination by
620 Horizontal Gene Transfer Events. *Veterinary Sciences*, 7(3), Article 3.
- 621
- 622 Livermore, et al. (2019). OXA-1 β -lactamase and non-susceptibility to penicillin/ β -lactamase
623 inhibitor combinations among ESBL-producing *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial*
624 *Chemotherapy*,
- 625
- 626 Loeza-Lara, et al. (2023). Frequency and characteristics of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated
627 from Mexican fresh cheese. *Food Science and Technology*, 43, e108222.
- 628
- 629 Mandujano, A., et al. (2023). Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolated
630 from Food-Producing Animals in Tamaulipas, Mexico. *Antibiotics*, 12(6),
- 631
- 632 Martak, D., et al., Bertrand, Populations of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia*
633 *coli* and *Klebsiella pneumoniae* are different in human-polluted environments and food items: A
634 multicentre European study. *Clinical Microbiology and Infection*,
- 635
- 636 Martin, J. G. P. (2015). Antimicrobial residues in milk – a review. *Food and Nutrition Security*, 18(2),
637 80.
- 638
- 639 Martinez-Klimova, et al. (2017). Endophytes as sources of antibiotics. *Biochemical Pharmacology*,
- 640 134, 1–17.

- 641 Massova, I., & Mobashery, S. (1998). Kinship and Diversification of Bacterial Penicillin-Binding
642 Proteins and β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(1), 1–17.
643
- 644 Menezes, K. V., Pimentel, B. M. F., Da Costa, J. A. C., Ferreira, N. S., Ignacchiti, M. D. C., &
645 Resende, J. A. (2023). Virulence factors and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated
646 from commercialized fresh cheese in the south of Espírito Santo. *Brazilian Journal of Microbiology*,
647 54(3), 2063–2071.
648
- 649 Minerdi, D., Loqui, D., & Sabbatini, P. (2023). Monooxygenases and Antibiotic Resistance: A Focus
650 on Carbapenems. *Biology*, 12(10),
651
- 652 Molossi, L., Hoshide, A. K., de Abreu, D. C., & de Oliveira, R. A. (2023). Agricultural Support and
653 Public Policies Improving Sustainability in Brazil's Beef Industry. *Sustainability*, 15(6),
654
- 655 Murray, et al. (2022) . Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: A systematic
656 analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
657
- 658 Olaru, I. D., Walther, B., & Schaumburg, F. (2023). Zoonotic sources and the spread of antimicrobial
659 resistance from the perspective of low and middle-income countries. *Infectious Diseases of Poverty*,
660 12(1), 59.
661
- 662 O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: Final report and recommendations
663 (United Kingdom) [Report]. Government of the United Kingdom.
664 <https://apo.org.au/node/63983> Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018).
665 Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*,
666 31(4),

- 667 Parussolo, L., Sfaciotte, R. A. P., Dalmina, K. A., Melo, F. D., Costa, U. M., & Ferraz, S. M. (2019).
668 Detection of virulence genes and antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* isolates from
669 raw milk and artisanal cheese in Southern Brazil. *Semina: Agricultural Sciences*, 40(1)
670
- 671 Payne, D. J., Du, W., & Bateson, J. H. (2000). Beta-lactamase epidemiology and the utility of
672 established and novel beta-lactamase inhibitors. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 9(2), 247–
673 261
674
- 675 Pineda, et al. (2021). Brazilian Artisanal Cheeses: Diversity, Microbiological Safety, and Challenges
676 for the Sector. *Frontiers in Microbiology*, 12.
677
- 678 Pontello, M., & Gori, M. (2023). Foodborne Diseases. In M. C. B. Raviglione, F. Tediosi, S. Villa,
679 N. Casamitjana, & A. Plasència (Eds.), *Global Health Essentials* (pp. 149–154). Springer
680 International Publishing.
681
- 682 Ramakrishnan, B., et al. (2019). Local applications but global implications: Can pesticides drive
683 microorganisms to develop antimicrobial resistance? *Science of The Total Environment*, 654, 177–
684 189.
685
- 686 Richter, L., et al. (2023). Prevalence of extended-spectrum β -lactamase producing Enterobacterales
687 in Africa's water-plant-food interface: A meta-analysis (2010–2022). *Frontiers in Sustainable Food*
688 *Systems*, 7, 1106082
689
- 690 Saath, K. C. de O., & Fachinello, A. L. (2018). Growth in global food demand and land factor
691 restrictions in Brazil. *Journal of Rural Economics and Sociology*, 56, 195–212.
692

- 693 Sadek, M., et al. (2021). Genetic Characterization of Carbapenemase-Producing *Enterobacter cloacae*
694 Complex and *Pseudomonas aeruginosa* of Food of Animal Origin from Egypt. *Microbial Drug*
695 *Resistance*, 27(2), 196–203.
- 696
- 697 Salahuddin, P., et al. (2017). Structure, Function of Serine and Metallo- β -lactamases and their
698 Inhibitors. *Current Protein & Peptide Science*, 19(2).
- 699
- 700 Scholz-Ahrens, et al. (2020). Nutritional and health attributes of milk and milk imitations. *European*
701 *Journal of Nutrition*, 59(1), 19–34.
- 702
- 703 Shahid, A., et al. (2023). Chapter 2 - Antibiotics and antibiotic-resistant bacteria in the environment:
704 Sources and impacts. In P. Singh & M. Sillanpää (Eds.), *Degradation of Antibiotics and Antibiotic-*
705 *Resistant Bacteria from Various Sources* (pp. 39–65). Academic Press.
- 706
- 707
- 708 Silhavy, T. J., et al. (2010). The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*,
709 2(5), a000414
- 710
- 711 Simpson, I., et al. (1980). Main beta-lactamases responsible for resistance to beta-lactam antibiotics
712 in urinary tract infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 17(6), 929–936.
- 713
- 714 Stašek, J., et al. (2023). Update on Therapeutic Drug Monitoring of Beta-Lactam Antibiotics in
715 Critically Ill Patients—A Narrative Review. *Antibiotics*, 12(3),
- 716
- 717 Steinfeld, H., et al. (2006). *Livestock's Long Shadow: Environmental Issues and Options*. Food &
718 *Agriculture Org.*

- 719 Tan, S. Y., & Tatsumura, Y. (2015). Alexander Fleming (1881–1955): Discoverer of penicillin.
720 Singapore Medical Journal, 56(7), 366–367.
721
- 722 Tekiner, İ. H., & Özpınar, H. (2016). Occurrence and characteristics of extended spectrum beta-
723 lactamases-producing Enterobacteriaceae from foods of animal origin. Brazilian Journal of
724 Microbiology, 47, 444–451.
725
- 726 Thompson, N. T., Kitzenberg, D. A., Kao, D. J., Thompson, N. T., Kitzenberg, D. A., & Kao, D. J.
727 (2023). Persistence-mediated emergence of antimicrobial resistance in agriculture due to antibiotic
728 growth promoters. AIMS Microbiology, 9(4),
729
- 730 Tiedje, J. M et al. (2023). Antibiotic resistance genes in food production systems support One Health
731 opinions. Current Opinion in Environmental Science & Health, 34, 100492.
732
- 733 United Nations. (2022). World Population Prospects. World Population Prospects 2022.
734
- 735 Van Boeckel, T. P., et al. (2019). Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- and
736 middle-income countries. Science, 365(6459), eaaw1944.
737
- 738 Vasoo, S., et al. (2015). Emerging Issues in Gram-Negative Bacterial Resistance. Mayo Clinic
739 Proceedings, 90(3), 395–403.
740
- 741 Verraes, C., et al. (2013). Antimicrobial Resistance in the Food Chain: A Review. International
742 Journal of Environmental Research and Public Health, 10(7), 2643–2669.
743

- 744 Walsh, T. R., et al. (2023). Antimicrobial Resistance: Addressing a Global Threat to Humanity. *PLOS*
745 *medicine*, 20(7), e1004264.
- 746
- 747 World Health Organization-WHO (2017). WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics
748 are urgently needed.
- 749
- 750 WHO (2015). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: Foodborne disease burden
751 epidemiology reference group 2007-2015
- 752
- 753 WHO (2022). Monitoring and evaluation of the global action plan on antimicrobial resistance.
- 754
- 755 WHO (2022). Food safety. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>
- 756
- 757 Wu, X., et al. (2023). Spread of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in animal-derived foods
758 in Beijing, China. *International Journal of Food Microbiology*, 403, 110296.
- 759
- 760 Zhang, Q., et al. (2023). Metagenomic Insight into The Global Dissemination of The Antibiotic
761 Resistome. *Advanced Science*, 10(33)
- 762
- 763 Zhang, Y.-J., et al. (2019). Transfer of antibiotic resistance from manure-amended soils to vegetable
764 microbiomes. *Environment International*, 130, 104912. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.104912>
- 765
- 766 Zhao, et al. (2022). Uncovering the diversity and contents of gene cassettes in class 1 integrons from
767 the endophytes of raw vegetables. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 247, 114282
- 768

769 Zheng, et al. (2020). Clinical class I integron-integrase gene – A promising indicator to monitor the
770 abundance and elimination of antibiotic resistance genes in an urban wastewater treatment plant.
771 *Environment International*, 135, 105372.

772

773 Zhou, et al. (2022). Antibiotic resistance bacteria and antibiotic resistance genes survived from the
774 extremely acidity posing a risk on intestinal bacteria in an in vitro digestion model by horizontal gene
775 transfer. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 247, 114247.

776

777

778

779

780

781

782

783

784

785

786

787

788

789

790

791

792

793

794

795

For Review Only

Tables**Table 1.** β -lactamases each critical-priority GNBs commonly found in samples from the food chain.

| Critical-priority BGNs | β -lactamases | References |
|--------------------------------|---------------------------|---|
| <i>Acinetobacter baumannii</i> | OXA, TEM, SHV, CTX-M- VEB | (Costa-Ribeiro et al., 2024; Minerdi et al., 2023) |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | VIM, OXA, TEM, CTX-M, SHV | (Algammal et al., 2020; Minerdi et al., 2023; Wu et al., 2023; Sadek et al., 2021) |
| <i>Escherichia coli</i> | TEM, SHV, CTX-M, OXA | (Mandujano et al., 2023; Benlabidi et al., 2023; Martak et al., 2022; Richter et al., 2023) |

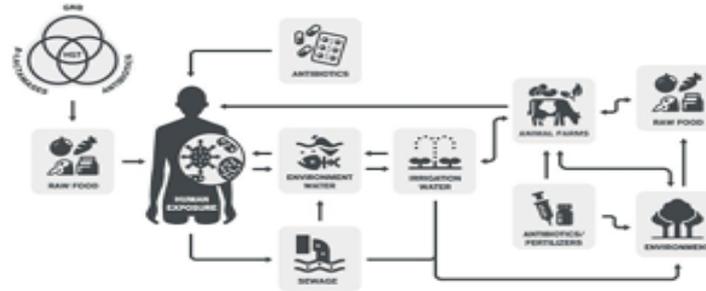
Table 2. Distribution of BL-GNBs in raw foods produced in Brazil.

| Food Type | Gene/ MGE | Isolated Species | Isolated Number | Geographic regions of Brazil | Viruloma/phylogenomic | Inhibition halos for the biocides | Investigate the clonal profile | Sequence Type (ST) | Biofilm-forming capacity | Plasmid Type | References |
|---|-----------------------|---|-----------------|------------------------------|---|---|--------------------------------|--|--------------------------------|-----------------------------|--------------------------|
| Serrano artisanal cheese and raw milk | TEM (TEM-1 and TEM-2) | <i>E. coli</i> | 62 | South | ene (TEM), st, lt and aggR | ND | ND | ND | Potential form biofilm (67,5%) | ND | (Parussolo et al., 2019) |
| Fresh cheese | ND ¹ | <i>E. coli</i> | 50 | Southeast | ND | chlorhexidine digluconate (74%) and sodium hypochlorite (84%) | ND | ND | Potential form biofilm (100%) | ND | (Menezes et al., 2023) |
| Endophytic ESBL (CTX-M-15)-producing Enterobacteriales from vegetables (spinach, cabbage, lettuce, arugula) | OXA-1, TEM-1B and SHV | <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> | 6 | Southeast | air, eilA, nfaE, sat, senB, lpfA, iss, gad, irp2, ybt, fyuA, mrk gene cluster, yidE and csgABCDEFGHI operon | hydrogen peroxide, quaternary ammonium compounds, phenol, triclosan, biguanides/chlorhexidine organosulfate/sodium dodecyl sulfate compounds and ionic detergents/sodium deoxycholate | ND | ST4012, ST648, ST198, ST2739, ST927 and ST38 | ND | IncFIB, IncFII and IncHI2A. | (Lopes et al., 2021) |
| Minimally processed fruits (Melon) ¹ | ND ¹ | <i>Aeromonas hydrophila</i> | 1 | Southeast | alt, act, aer A and hly A | ND | ND | ND | ND | ND | (Teodoro et al., 2022) |
| Pasteurized milk ¹ | ND | <i>E. coli</i> | None | Midwest | tLST and rpoS | ND | 9 strains (100% similarity) | ND | Potential form biofilm (51,6%) | ND | (Machado et al., 2023) |

| | | | | | | | | | | | |
|--|---|-----------------|-----------------|---|--|----|---------------------------------|--------|--------------------------------|---------------------|--------------------------|
| Artisanal cheeses | None ² | <i>E. coli</i> | 2 | South and southeast | ND | ND | ND | ND | ND | ND | (Kothe et al., 2022) |
| Organic and conventional Minas Frescal cheese | ND ¹ | <i>E. coli</i> | 6 | Southeast | ND | ND | ND | ND | ND | ND | (Saleh et al., 2023) |
| Cheese Made from Unpasteurized Milk | None ¹ | <i>E. coli</i> | 39 | South, southeast, midwest and northeast | eneA, iron, ompT, hlyF, iss and iutA | ND | O64474:H8, O127:HNT and O73:H12 | ND | Potential form biofilm (10,3%) | ND | (de Campos et al., 2018) |
| Minas Frescal cheese | CTX-M, CTX-M15, SHV, TEM, OXA-48, Int1 and Int2 | Pool BGNs | 130 Pools | Southeast | ND | ND | ND | ND | ND | ND | (Silva et al., 2020) |
| Cheese samples (served to patients admitted to a hospital) | CTX-M, SHV, TEM, Int1 and Int2 | Pool BGNs | 73 Pools | Southeast | ND | ND | ND | ND | ND | ND | (Melo et al., 2022) |
| Minas soft cheeses | TEM, Int1 and Int2 | ND ¹ | ND ¹ | Southeast | ND | ND | ND | ND | ND | ND | (De Paula et al., 2018) |
| Cheese produced by hand | None | <i>E. coli</i> | 5 | Northern | ND | ND | ND | ND | ND | ND | (Pena et al., 2021) |
| Vegetable (Spinach) | CTX-M-15, TEM-1B. | <i>E. coli</i> | 1 | Southeast | yagY/cepB, yagX/cepC, yagZ/cepA, gad, iss, papB, hra, yagW/cepD, papA, ompA, traT, papI, | ND | entB-O8:H4 | ST4012 | ND | IncFIA, IncFIB-like | (Fuga, et al., 2022) |

| | | | | | | | | | | | |
|--|-------------------------------|----------------|-----|-------------------|--|----|--------------|--------------------|----|---|-----------------------|
| Vegetable (cabbage) | CTX-M-15, TEM-1B, OXA-1 | <i>E. coli</i> | 2 | Southeast regions | yagY/cepB, ybeS, irp2, iucA, yagW/cepD, irp1, kpsD, tssD1, lpfA, iucB, ompT, ompA, tssJ, ybtU, senB, chuA, tmT, yfcV, kpsMII, ybtT, sat, yagX/cepC, yagZ/cepA, chuV, ybtE, papB, papA, iucC, ybtX, ybtQ, tssB, kpsE, chuU, ybP, fepB, entC, chuT, iutA, fyuA, cilA, tssC, entB, ykgK/cepR, yagV/cepE, ybtA - | ND | --H6-O86:H18 | ST38 and ST648 | ND | IncFIA, IncFIB, IncFII, IncI2-like, Col156-like, Col, ColRNA I and IncFRST. | (Fuga, 2022) |
| Illegal and legal Minas Frescal cheese | ND ¹ | <i>E. coli</i> | 319 | South regions | caeA and str2 | ND | ND | O101:HNT and OR:H- | ND | ND | (Junior et al., 2019) |
| Fresh soft cheese | TEM, SHV, Int1, Int2 and Int3 | <i>E. coli</i> | 30 | Southeast region | ND | ND | ND | ND | ND | ND | (Pires et al., 2019) |
| Minas frescal cheese (inspected and not by official government agencies) | ND | <i>E. coli</i> | 330 | Southeast region | None | ND | ND | ND | ND | ND | (Okura & Marin, 2014) |

¹ Phenotypic profile research only; ²production of lactamase enzymes (disk approximation, MIC and TET tests); ³*E. coli* was detected at average levels below the threshold required to perform a reliable detection of genes; ⁴culture-independent approaches. ND- No data.



360x184mm (72 x 72 DPI)