

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Cristiane Rodrigues Silva

**MARCADORES FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS DE RESISTÊNCIA AOS
ANTIMICROBIANOS EM BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS DE QUEIJO MINAS
FRESCAL**

Rio de Janeiro/RJ
2018

Cristiane Rodrigues Silva

**MARCADORES FENOTÍPICOS E GENOTÍPICOS DE RESISTÊNCIA AOS
ANTIMICROBIANOS EM BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS DE QUEIJO MINAS
FRESCAL**

Dissertação de Mestrado apresentada 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 mestre em Alimentos e Nutrição.

Orientador: Prof. Dr. Victor Augustus Marin

Rio de Janeiro/RJ
2018

Cristiane Rodrigues Silva

Marcadores fenotípicos e genotípicos de resistência aos antimicrobianos em bactérias Gram-negativas de queijo Minas frescal

Dissertação de Mestrado apresentada 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 mestre em Alimentos e Nutrição.

Aprovado em 07/03/2018

BANCA EXAMINADORA



Dr. Victor Augustus Marin
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO



Dr. Anderson Junger Teodoro
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - UNIRIO



Dra. Roberta Fontanive Miyahira
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

S581 Silva, Cristiane Rodrigues
Marcadores fenotípicos e genotípicos de
resistência aos antimicrobianos em bactérias Gram-
negativas de queijo Minas Frescal / Cristiane
Rodrigues Silva. -- Rio de Janeiro, 2018.
64 f.

Orientador: Victor Augustus Marin.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do
Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação
em Alimentos e Nutrição, 2018.

1. Alimento. 2. Queijo. 3. Segurança Alimentar.
4. Bactérias Gram-negativas. 5. Resistência a
antibióticos. I. Marin, Victor Augustus , orient.
II. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu companheiro Bruno por dividir as muitas alegrias e dificuldades que o Mestrado traz e pela compreensão nos momentos em que não estive tão presente quanto gostaria.

Ao meu orientador Victor por compreender o ser humano além da aluna, por ser um orientador sempre presente e por seu singular gosto e olhar para a ciência.

Aos amigos dos laboratórios Joel, Lana, Juliana e Newton pelas conversas, conhecimento e pela alegria do dia a dia.

Ao meu amigo e companheiro de trabalho Fernando pelo apoio sempre.

Aos meus chefes Anderson e Victor por todo apoio e compreensão sem os quais não seria possível alcançar essa realização pessoal e profissional.

À UNIRIO e ao Departamento de Ciência dos Alimentos pela oportunidade de realizar este trabalho.

RESUMO

O queijo Minas frescal é um produto lácteo, fresco amplamente consumido no Brasil. A alta umidade, característica do produto, pode favorecer o crescimento microbiano. Avaliação de microbiota resistente a antibióticos embora não seja habitual em alimentos, pode trazer informações mais completas que as obtidas com técnicas de isolamento, além de relevantes para avaliação do potencial de um alimento atuar no processo de resistência. A resistência a antibióticos é atualmente um importante problema de saúde mundial, que precisa de ação multissetorial para que seu combate seja efetivo. Esta pesquisa estabeleceu metodologia diferenciada que permitiu avaliar a susceptibilidade a antibióticos do conjunto das bactérias Gram-negativas viáveis de queijo Minas Frescal, além de investigação da presença de genes que possam ter conferido resistência as bactérias presentes. Estabeleceu um comparativo entre diferentes pontos de corte clínicos. Os resultados mostraram uma resistência fenotípica elevada. Todos os queijos avaliados apresentaram microbiota resistente, em 13,3% a resistência alcançou todos os antibióticos testados e em 80%, 8 a 10 diferentes antibióticos. Antibióticos considerados críticos como os carbapenêmicos apresentaram microbiota resistente em 86,7% dos queijos, no caso das cefalosporinas foram testados, a ceftazidima (3ª geração), em que alarmanamente, não houve susceptibilidade em nenhum dos queijos analisados e em cefepima (4ª geração) em que 46,7% das amostras já se mostraram resistentes. Na investigação genotípica foram encontrados nove genes de resistência distintos em 69,2% dos isolados, totalizando 224 genes. Os resultados demonstram que o queijo Minas Frescal pode apresentar microbiota com grande potencial de resistência, evidenciado fenotipicamente e genotipicamente. Portanto, a metodologia utilizada é uma possibilidade viável e com uma resposta mais completa sobre a capacidade de um alimento, através de sua microbiota, favorecer o desenvolvimento de resistência e sendo, portanto, a área de alimentos um importante setor a ser gerenciado para a redução do processo de resistência aos antibióticos.

Palavras-chave: alimento, queijo, segurança alimentar, bactérias Gram-negativas, resistência, antibiótico, saúde pública, genes de resistência a antibióticos, alimento seguro, qualidade dos alimentos.

ABSTRACT

Phenotypic and genotypic markers of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria from Minas Frescal cheese.

The Minas frescal cheese is a fresh dairy product widely consumed in Brazil. The high humidity, characteristic of the product, can promote microbial growth. Evaluation of antibiotic-resistant microbes, although not usual in food, can convey more complete data than those obtained with isolation techniques, as well as relevant to an appraisal of the potential of food to act in the process of resistance. This research applied a methodology which allowed to measure the susceptibility to antibiotics of Gram-negative viable set of bacteria of Minas Frescal cheese, in addition to an investigation of the presence of genes that may have conferred resistance to bacteria present. It established a comparison between different clinical cut points. The results indicated a high phenotypic resistance. All cheeses evaluated presented resistant microbiota of which 13.3% were resistant to all antibiotics tested and in 80% of the cases reached resistance between 8 to 10 different antibiotics. Antibiotics considered critics as the carbapenems presented resistant microbiota in 86.7% of the cheeses, in the case of cephalosporins the ceftazidime (3rd generation), in which alarmingly, there was no susceptibility in any of the cheeses analyzed and cefepime (4th generation) in which 46.7% of the samples have proved resistant. In genotypic research were found nine different resistance genes in 69.2% of the isolates, totaling 224 genes. The results indicate that the Minas fresh cheese can present potential resistant microbiota, that was evidenced phenotypically and genotypically. Therefore, the methodology used is a viable possibility, and with a complete answer about the ability of food through its microbiota, favor the development of resistance, and therefore the food area is an important sector to be managed to reduce the process of antibiotic resistance.

Keywords: food, cheese, food safety, Gram-negative bacteria, antibiotic resistance, public health, antibiotic resistance genes, food safe, quality food.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Etapa de pré-seleção	34
Figura 2: Disco difusão	35
Figura 3: Gel de eletroforese dos produtos de PCR de integron classe 1	38
Gráfico 1: Resistência fenotípica por amostra, de acordo com parâmetros do CLSI	35
Gráfico 2: Resistência fenotípica total comparando os padrões CLSI e BrCast	36
Gráfico 3: Comparativo dos antibióticos que apresentaram variações na resistência fenotípica com o uso do CLSI e do BrCAST.	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo das características dos antibióticos utilizados	28
Tabela 2: Pontos de corte interpretativos BrCAST/EUCAST.	29
Tabela 3: Sequência de nucleotídeos, tamanho dos genes e referências	30
Tabela 4: Quantidade de genes de resistência em amostras de queijo e em isolados	39
Tabela 5: Resumo dos genes encontrados em cada isolado	40

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	10
1.1 PRODUÇÃO DE LEITE E QUEIJO: RELEVÂNCIA ECONÔMICA	10
1.2 QUEIJO MINAS FRESCAL: CARACTERÍSTICAS	10
1.3 QUEIJO MINAS FRESCAL: PROCESSO PRODUTIVO	11
1.4 BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO	12
1.5 SEGURANÇA ALIMENTAR E DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS	13
1.6 ANTIBIÓTICOS E MECANISMOS DE AÇÃO	15
Inibição da síntese ou da atividade do ácido nucleico	16
Inibição do metabolismo bacteriano	16
Inibição da síntese da parede celular	16
Inibição da síntese de proteínas	17
Alterações da membrana celular	17
1.7 RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS	17
1.7.1 Impactos na saúde mundial	17
1.7.2 Mecanismos de resistência	19
<i>Diminuição da concentração intracelular de antibiótico</i>	20
<i>Inibição por ação sobre o alvo do antibiótico</i>	21
<i>Inativação do antibiótico</i>	21
1.7.3 Genes de resistência	22
1.8 RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS EM LEITE E DERIVADOS	23
1.9 BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS	24
2.0 OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3.0 MÉTODOS	27
AMOSTRAGEM	27
MÉTODO DE PRÉ-SELEÇÃO	27
AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA	27
3.4 EXTRAÇÃO DE DNA	29
IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA	30
ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	33

RESULTADOS	34
AMOSTRAGEM	34
RESISTÊNCIA NA ETAPA DE PRÉ-SELEÇÃO	34
RESISTÊNCIA FENOTÍPICA	34
COMPARATIVO RESISTÊNCIA FENOTÍPICA	36
RESISTÊNCIA GENOTÍPICA	37
DETECÇÃO DA FAMÍLIA <i>ENTEROBACTERIACEAE</i>	39
5.0 DISCUSSÃO	41
RESISTÊNCIA FENOTÍPICA	41
Resistência Fenotípica: Comparativo entre Parâmetros	43
RESISTÊNCIA GENOTÍPICA	44
Integrans	44
Genes de resistência a tetraciclina	46
Genes produtores de beta-lactamases	47
5.2.3.1 <i>Beta-lactamase com ação em carbapenêmicos</i>	49
6.0 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53

INTRODUÇÃO

PRODUÇÃO DE LEITE E QUEIJO: RELEVÂNCIA ECONÔMICA

Em 2016, a produção de leite no Brasil foi de 33,62 bilhões de litros, ocupando a quinta posição no ranking mundial de produção de leite com um valor de produção de R\$ 39,44 bilhões (IBGE, 2016). Segundo a Associação Brasileira de Indústrias de Queijo (ABIQ) entre os derivados do leite, a produção de queijo ocupa uma posição de destaque, sendo um mercado que absorve grande parte de sua produção (ABIQ, 2017).

De acordo com as projeções realizadas pela Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico e Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação/FAO) o Brasil com uma produção, em 2017, de 795,98 mil toneladas de queijo deverá aumentar em 19,0% (2,2% aa) até alcançar 946.96 mil toneladas em 2025 (FAO, 2016).

O mercado brasileiro de queijos tem grande possibilidade de ampliação pois indústrias estrangeiras reconhecem no mercado brasileiro a possibilidade de uma expansão que já não é mais possível em países europeus já saturados com altas taxas de consumo per capita. No Brasil, o consumo médio per capita de queijos é de apenas 5,4 quilos por ano, perdendo tanto para países como Argentina que alcança 11 quilos, como de toda a Europa com um consumo médio de 20 quilos e que pode chegar a 25 quilos por ano em países como França e Itália. Dentre os queijos mais populares no Brasil encontra-se o queijo minas frescal, também conhecido como queijo branco, queijo Minas ou frescal, possuindo alto teor de umidade, massa branca, consistência mole, textura fechada com algumas olhaduras irregulares, sabor suave a levemente ácido (ABIQ, 2017)

QUEIJO MINAS FRESCAL: CARACTERÍSTICAS

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Queijos constante na portaria número 146 de 07 de março de 1996 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, o queijo é definido como um produto fresco ou maturado obtido mediante a coagulação do leite ou leite reconstituído (na forma integral, parcial ou totalmente desnatado), ou de soros lácteos, pela ação de enzimas específicas, de bactérias específicas, de ácidos orgânicos, isolados ou combinados, com posterior retirada do soro. Podendo ser

adicionado de substâncias alimentícias e/ou especiarias e/ou condimentos, aditivos especificamente indicados, substâncias aromatizantes e corantes (BRASIL, 1996).

Para tratar especificamente do queijo minas frescal dispõe-se de uma legislação específica, o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal, que o caracteriza como um queijo fresco, ou seja, que está pronto para o consumo logo após sua fabricação, não necessitando de um período de maturação. O queijo Minas frescal pode ser obtido por coagulação enzimática do leite e/ou leite reconstituído com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas sendo estes seus ingredientes obrigatórios, podendo ser complementado com cultivo de bactérias lácticas específicas. São ingredientes opcionais: leite em pó, creme, sólidos de origem láctea, cloreto de sódio, cloreto de cálcio. É classificado como um queijo semi-gordo (contendo entre 25 e 44,9% de matéria gorda no extrato seco) com consistência branda e/ou macia e de muito alta umidade (conteúdo de umidade não inferior a 55%), possuindo formato cilíndrico, peso entre 0,3 kg e 5,0 kg, cor esbranquiçada, textura com ou sem olhaduras mecânicas, odor e sabor suave e característico da pouca acidez (BRASIL, 1997a). Em função de sua produção muito difundida possui relevante variação em seu padrão, mas em média o queijo minas apresenta quando pronto, um teor de sal variando entre 1,4% e 1,6% (SILVA, 2005).

Em relação à qualidade sanitária do queijo esta deve ser atestada através de um registro no serviço de inspeção sanitária. Podem possuir o registro do Serviço de Inspeção Federal (SIF) permitindo que o produto possa ser comercializado em qualquer unidade federativa, o registro de Inspeção Estadual (SIE) para comércio no estado e o do Serviço de Inspeção Municipal (SIM) que possibilita o comércio apenas no próprio município de produção. Sendo um produto de origem animal a inspeção é de competência do MAPA, cabendo a ANVISA a fiscalização após o processo produtivo (PREZOTTO, 2013).

QUEIJO MINAS FRESCAL: PROCESSO PRODUTIVO

O leite é um alimento perecível sujeito a contaminação por microrganismos, podendo gerar defeitos no queijo e também causar doenças. A garantia de um queijo seguro e de boa qualidade precisa se iniciar no leite usado para a produção do queijo. Antes de iniciar a fabricação do queijo é necessário fazer a pasteurização, já que bactérias potencialmente patogênicas presentes no leite cru podem multiplicar-se a níveis perigosos (DE OLIVEIRA PINTO et al., 2015).

O processo de pasteurização permite através do aumento de temperatura em um determinado período de tempo causar a destruição de microrganismos causadores de doença. Embora possa ser realizado com diversas combinações de tempo e temperatura qualquer dessas combinações permite a eliminação de microrganismos patogênicos não formadores de esporos, além de todos os bolores, leveduras, bactérias Gram-negativas e muitas Gram-positivas (FRANCO; LANDGRAF, 2008). De acordo com o regulamento 352 do MAPA é necessário que o leite a ser usado seja higienizado por meios mecânicos e submetido à pasteurização, ou tratamento térmico equivalente para garantir fosfatase residual negativa podendo ser combinados ou não a outros processos físicos e biológicos que garantam a inocuidade do produto (BRASIL, 1997).

A etapa seguinte corresponde à coagulação, em que ingredientes como fermento, cloreto de cálcio e coalho são adicionados permitindo que a caseína (proteína do leite) coagule gerando a massa. Durante o tratamento da massa o queijo é cortado em partes homogêneas para passar pelo processo de agitação permitindo a dessoragem que é quase completa na fase de enformagem onde também ganha a tradicional forma cilíndrica. Para completar o processo de produção o queijo passa pela etapa de salga, onde o sal tem a função não apenas de aprimorar o sabor, mas também exercer importante função no controle da umidade e conservação do produto (SILVA, 2005). A conservação do produto através do sal acontece pela redução de atividade de água. A atividade de água expressa o teor de água livre no alimento, alimentos com altos valores de atividade de água estão diretamente relacionados com a atividade metabólica e o crescimento microbológico (ORDÓÑEZ, 2005).

Terminado o processo de produção do queijo este é então embalado, com a função de proteção, já que caracteristicamente o tipo minas frescal possui uma casca macia. Em se tratando de um queijo de muito alta umidade é comum que nesta embalagem se acumule parte o soro (SILVA, 2005). O armazenamento deve ser feito em temperaturas reduzidas (de acordo com a legislação em temperatura não superior a 8°C) pois baixas temperaturas ajudam a inibir crescimento de microrganismos contaminantes e aumentar sua validade, particularmente importante no caso do minas frescal pois sendo um queijo fresco, sem maturação, apresenta uma validade curta de aproximadamente 20 dias (EMATER, 2009).

BOAS PRÁTICAS DE FABRICAÇÃO

Pesquisas em queijo Minas Frescal têm mostrado a falta de atendimento a parâmetros

exigidos pela legislação: quanto a qualidade e identidade, demonstradas por AHAGON em 2017, tendo verificado a presença de matérias estranhas em ao menos 50% das 30 amostras de cada marca e pêlo de roedor nas 5 marcas analisadas; Quanto a qualidade microbiológica, em estudo feito em 2014, 80,6% das 31 amostras se apresentavam impróprias para consumo por apresentar ao menos um dos microrganismos avaliados, acima dos limites estabelecidos pela legislação (54,8% para coliformes termotolerantes, 16,12% para *Staphylococcus coagulase* positiva e 9,6% para *Listeria monocytogenes* (APOLINÁRIO; SANTOS; LAVORATO, 2014).

Por se tratar de um queijo que não sofre maturação, processo que leva à considerável perda de água e teoricamente associado a maior segurança do alimento, boas condições higiênicas durante a produção, transporte e armazenamento deste queijo são primordiais. A fim de contribuir significativamente para a garantia da qualidade final do produto em seus aspectos higiênicos sanitários se faz necessária a utilização das boas práticas de fabricação (BPF) que compreendem um conjunto de normas que devem ser adotadas durante o processo produtivo que conferem qualidade ao produto. Para este fim, a secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde estabeleceu, em 30 de julho de 1997, o regulamento técnico sobre as condições higiênico-sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos que estipula os parâmetros de higiene e de boas práticas de fabricação para alimentos destinados ao consumo humano, permitindo o alcance de níveis adequados de segurança alimentar. Estes critérios compreendem desde a obtenção da matéria prima, neste caso, o leite, até o transporte do produto pronto para comercialização. Desta forma é responsabilidade dos produtores garantir que todos os envolvidos na cadeia sigam estas orientações, assim como manutenção e conservação de estruturas, equipamentos e instalações que possam assegurar a qualidade do produto final (BRASIL, 2009).

SEGURANÇA ALIMENTAR E DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS

A alimentação é um direito fundamental da humanidade definido em pacto mundial, em que o Brasil participa como signatário sendo a alimentação adequada indispensável à realização dos direitos assegurados na Constituição Federal (GERMANO; GERMANO, 2015). Neste contexto é imprescindível compreender a Segurança Alimentar e Nutricional (SAN) que embora desde seu início tenha sido amplamente discutida em torno do papel central da fome e conseqüente necessidade de acesso igualitário ao alimento, recentemente

começa a ganhar destaque em seu desdobramento relativo à qualidade desse alimento. A lei nº 11.346, de 15 de setembro de 2006, que institui o Sistema Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional (SISAN), define a Segurança Alimentar e Nutricional como:

...a realização do direito de todos ao acesso regular e permanente a alimentos de qualidade, em quantidade suficiente, sem comprometer o acesso a outras necessidades essenciais, tendo como base práticas alimentares promotoras da saúde que respeitem a diversidade cultural e que sejam ambiental, cultural, econômica e socialmente sustentáveis (BRASIL, 2006).

Neste conceito, pode se destacar o artigo 4 inciso IV que vem especificar a necessidade da garantia de qualidade biológica, sanitária, nutricional e tecnológica dos alimentos a fim de garantir a SAN (Brasil, 2006).

Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) compreende o conceito de SAN como garantia de acesso físico e econômico a todo indivíduo em quantidade suficiente de alimentos inócuos e nutritivos atendendo suas necessidades e preferências, com foco em uma vida sadia. Com esse objetivo, torna-se, fundamental a produção de alimentos de forma segura (livre de contaminantes biológicos, químicos e físicos), que permita reduzir as doenças transmitidas por alimentos (DTAs) (FAO, 2014).

De acordo com o centro de controle e prevenção de doenças (CDC) alimentos considerados não seguros podem ser responsáveis por 250 diferentes doenças. As estimativas mostram que anualmente aproximadamente 48 milhões de pessoas adoecem em razão das DTAs, com 128 milhões de hospitalizações e pelo menos 3.000 mortos. Essas doenças são reconhecidamente um problema de saúde pública disseminado, sobrecarregando ainda mais o sistema de saúde, impactando de forma significativa a produtividade e reduzindo ganhos econômicos, porém muitos casos não são adequadamente relatados, o que não permite conhecer a verdadeira dimensão do problema (CDC, 2016). Uma vez que a falta de segurança dos alimentos e o grande número de doenças transmitidas por estes são importante causa de internações e mortes, a OMS adotou as resoluções, instituídas nas Assembléias Mundiais de Saúde, WHA 53.15 em 2002 e a resolução WHA 63.3 de maio de 2010, onde estabelecem como prioridade a inocuidade dos alimentos e a prevenção e controle das DTAs. (SILVA et al., 2016). Objetivo também proposto pela Organização Pan Americana de Saúde (OPAS) em seu Plano Estratégico 2014-2019 (OPAS, 2014).

No Brasil, de acordo com o ministério da saúde embora haja uma comprovada relação de várias doenças com a ingestão de alimentos contaminados, com crescente número de internações hospitalares e altos índices de mortalidade infantil por diarreia, em várias regiões

do país não se tem dados concretos de surtos relacionados as DTAs, tornando necessário a estruturação de um sistema de vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos (VE – DTA) que possa através do conhecimento dos casos e real magnitude das doenças, reduzir a incidência de DTAs no país, subsidiando medidas de prevenção e controle necessários (BRASIL, 2010). Evidenciando a importante relação alimento e saúde, em 2015 a OPAS/OMS no Brasil elegeram o tema “Do campo à mesa, obtendo alimentos seguros” no dia mundial da saúde, como forma de enfatizar a importância da segurança alimentar e nutrição adequada como temas indissociáveis. Em relação à segurança alimentar, uma visão mais abrangente permite compreender os microrganismos resistentes à antibióticos como um perigo biológico que pode estar na cadeia de alimentos e representa uma ameaça à saúde pública. Para seu combate é crucial o uso prudente dos antibióticos pela medicina humana e animal, e também na agricultura, particularmente na produção animal e na piscicultura (OPAS, 2015).

Em virtude da relevância da resistência a antibióticos em escala mundial, a mais recente Assembléia Mundial de Saúde, realizada em 2015, trouxe debate sobre o tema e propôs um plano de ação para a resolução do crescente problema da resistência antimicrobiana em que inclui o alimento como fonte de bactérias resistentes e seu papel na propagação destes (OPAS, 2015).

ANTIBIÓTICOS E MECANISMOS DE AÇÃO

Antimicrobianos são substâncias químicas, podendo ser naturais ou sintéticas, que previnem a multiplicação de agentes infecciosos ou induzem sua morte, impedindo assim, a disseminação da infecção (BRASIL, 2011). Podem ser classificados como bactericidas, quando causam a morte da bactéria, ou bacteriostáticos, quando promovem a inibição do crescimento microbiano (KASPER et al., 2017).

O primeiro antibiótico, a penicilina, surge em 1928 com a descoberta de Alexander Flemming e sua utilização em grande escala se inicia em meados de 1940. Nos anos subsequentes novas substâncias surgem, inclusive compostos, agora, sintéticos e de maior espectro, atingindo outros microrganismos além das bactérias (AMINOV, 2010).

Embora os antibióticos possam ter classificações diversas que derivam de sua origem, síntese, constituição química ou mecanismo de ação entre outras, uma das classificações mais usadas para os antibióticos de importância clínica os divide em: β -lactâmicos (penicilinas,

cefalosporinas, carbapenemases, monobactams), quinolonas, glicopeptídeos, oxazolidinonas, aminoglicosídeos, macrolídeos, lincosaminas, nitroimidazólicos, cloranfenicol, estreptograminas, sulfonamidas, tetraciclina e novos antibióticos (glicilciclina, polimixinas, daptomicina, gemifloxacina) (HARAGUCHI, 2000).

Os principais mecanismos de ação dos antibióticos são: inibição da síntese ou da atividade do ácido nucleico, alterações da membrana celular, inibição do metabolismo bacteriano, inibição da síntese da parede celular e inibição da síntese de proteínas. O detalhamento de como os antibióticos atuam são ferramentas que tornam possível compreender as suas potencialidades tóxicas, as razões da sua inocuidade, o risco que apresenta o aparecimento de resistência, bem como inferir possíveis terapêuticas futuras (BRUNTON; BRUNTON; CHABNER, 2012).

Inibição da síntese ou da atividade do ácido Nucleico

As quinolonas, incluindo seus derivados fluorados como a ciprofloxacina, atuam sobre enzimas essenciais à replicação do DNA, a topoisomerase IV e a DNA girase. Estas enzimas garantem o superespiralamento negativo do DNA, essencial à replicação, tendo suas atividades inibidas quando em contato com estes compostos (OSSWALD; ESTEVES, 2001).

Inibição do metabolismo bacteriano

Os antibióticos deste grupo atuam na via de síntese de ácido fólico. Vários produtos da via do ácido fólico atuam como coenzimas em reações de transferência de carbono, necessárias a produção de timidinas, de todas as purinas e de alguns aminoácidos que são essenciais ao crescimento bacteriano. Dentre estes antibióticos, também conhecidos como antimetabólitos estão a sulfonamida (sulfametoxazol) e a trimetoprima, ambos interferindo na via de ácido fólico (KASPER; FAUCI, 2015).

Inibição da síntese da parede celular

As células bacterianas possuem uma parede rígida, externa à membrana celular que possibilita à bactéria manter sua pressão osmótica sem rompimento. O principal componente desta parede é o peptidoglicano. Os agentes desta classe atuam sobre diversas fases como

síntese, montagem, exportação ou entrecruzamento do peptidoglicano levando a célula a interromper o crescimento celular e até mesmo a morte devido à lise. Os antibióticos β -lactâmicos são exemplo de antibióticos com ação ao nível da síntese do peptidoglicano que atuam através da inibição da transpeptidase, ligando-se a esta enzima mediante ligação covalente. Como resultado, o polímero linear não é transformado em polímero cruzado e não se forma a parede celular bacteriana. A susceptibilidade a essa substância varia entre Gram-negativos e Gram-positivos devido a presença, nos primeiros de mais uma fina membrana externa aos peptidoglicanos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2015).

Inibição da síntese de proteínas

Os antibióticos que agem sobre a síntese de proteínas interagem com o ribossomo bacteriano. Os ribossomos são unidades citoplasmáticas que sintetizam proteínas. Estes antibióticos possuem afinidade para as subunidades ribossômicas 30S e 50S, específicas das bactérias o que lhe confere a seletividade de ação, sem gerar efeitos graves para o paciente. Alguns exemplos de antibióticos que inibem a síntese proteica são os aminoglicosídeos (dentre eles a gentamicina), tetraciclina, anfenicóis, macrolídeos, lincosamidas, oxazolidonas e cloranfenicol (KASPER; FAUCI, 2015).

Alterações da membrana celular

A membrana celular atua como barreira seletiva, permitindo a passagem seletiva de solutos além de isolar a célula do meio externo e ainda delimitar seus compartimentos intracelulares. A permeabilidade da membrana celular é essencial para que o antibiótico tenha o efeito desejado, quer seja bactericida quer bacteriostático. São exemplos nesta classe: a polimixina, gramicidina A e daptomicina (BRUNTON; BRUNTON; CHABNER, 2012).

RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS

Impactos na saúde mundial

A associação entre o uso de antibióticos e o desenvolvimento de resistência bacteriana

é conhecida desde a introdução da penicilina. A intensa utilização destes medicamentos gerou grande impacto na saúde, trazendo uma falsa perspectiva de possível erradicação de todas as infecções. Essa concepção, errônea, culminou em uso indiscriminado dessas substâncias que através de sua pressão seletiva, favoreceu o rápido surgimento e aumento da resistência bacteriana. O uso abusivo de antibióticos torna-se uma ameaça, uma vez que a sua capacidade de prevenir ou tratar uma infecção bacteriana fica comprometida (WHO, 2012).

Atualmente existem bactérias com mecanismo de resistência inclusive a fármacos de amplo espectro, e até mesmo resistência múltipla em uma mesma cepa bacteriana. A presença de cepas resistentes tem consequências individuais e coletivas, além de maior taxa de morbidade e mortalidade, a resistência a antibióticos trás a sobrecarga sobre o orçamento dos sistemas de saúde, com o aumento do tempo de permanência de hospitalizados, dificuldade terapêutica e consequente uso de drogas mais novas e de maior custo (muitas vezes associadas a altos índices de efeitos adversos), recorrência de infecções e possibilidade de aumento de sequelas em pacientes. O efeito econômico ultrapassa o setor de saúde e tem repercussões negativas em setores de comércio, produção e inclusive em aspectos sociais. Como sua disseminação ultrapassa fronteiras, deve ser tratado como um problema global trazendo impactos inclusive à economia mundial (NEILL, 2014; WHO, 2012). Com um custo acumulado de 100 trilhões de dólares até 2050, de acordo com relatório emitido na mais recente reunião dos líderes mundiais do G20 (OECD, 2017).

A resistência a antibióticos é atualmente um dos principais problemas de saúde pública. Estimativas alarmantes mostram que as mortes desencadeadas por resistência a antibióticos podem alcançar o número de 10 milhões de mortes em 2050, superando outras causas significativas de morte, como diabetes, câncer e até mesmo acidentes de trânsito (NEILL, 2014). Nos Estados Unidos, segundo o CDC a estimativa é de que anualmente pelo menos dois milhões de pessoas sofram com doenças causadas por bactérias resistentes a antibióticos com 23.000 mortes em sua decorrência direta (CDC, 2013).

A Organização Mundial de Saúde endossa a necessidade urgente de ação em seu mais recente Relatório Global de Vigilância de Resistência à Antimicrobianos, enfatizando o fato de que diversos tratamentos médicos, são dependentes de antibióticos, pré e pós procedimento. Desta forma, mesmo tratamentos de menor complexidade, podem levar a um significativo aumento no risco de gerar infecções dificilmente tratáveis ou até mesmo não tratáveis com antibióticos (WHO, 2014).

Corroborando essa possibilidade recentemente, relata-se o surgimento do primeiro mecanismo de resistência mediada por plasmídeo para polimixina em membros da família Enterobacteriaceae. A polimixina é em alguns casos o último recurso medicamentoso para bactérias multirresistentes. Os autores alertam que embora esteja confinado a China, o gene MCR-1 possa seguir os passos de outros genes de resistência que se espalharam pelo mundo. Essa descoberta enfatiza a necessidade urgente de uma ação global coordenada na luta contra as bactérias Gram-negativas resistentes (LIU et al., 2016).

Detectar e controlar a resistência aos antibióticos requer a adoção de uma abordagem globalizada para a vigilância das doenças onde se reconheça que a resistência pode surgir em seres humanos, animais e meio ambiente. O delicado equilíbrio entre a necessidade de uso clínico e a prevenção da resistência é muitas vezes, comprometido pelo uso de grandes quantidades de antibióticos na produção animal, que acrescenta assim outra dimensão a uma situação já complexa (DOYLE et al., 2013).

Diversos setores e serviços estão envolvidos no crescimento da resistência antimicrobiana, tanto o uso adequado como o inadequado de medicamentos anti-infecciosos utilizados na saúde humana e animal, assim como na produção de alimentos e, ainda, com medidas inapropriadas para controlar a disseminação de infecções (WHO, 2012). O plano de ação global para deter a resistência a antibióticos proposto na mais recente Assembléia Mundial de Saúde aponta que um objetivo estratégico é fortalecer a base de evidências através do reforço da vigilância e da pesquisa, gerando o conhecimento dos princípios gerais que norteiam o mecanismo de resistência (OPAS, 2014) Além disso, a caracterização dos genes responsáveis pela resistência, assim como sua localização e diversidade são importantes para o entendimento dos fatores envolvidos nessa resistência (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Mecanismos de resistência

A resistência acontece quando um antibiótico tem seu efeito reduzido ou eliminado. Além da resistência intrínseca, quando a bactéria é naturalmente não predisposta a sofrer a ação de determinado medicamento, bactérias podem adquirir mecanismos de resistência, que podem surgir de mutações espontâneas (em função de alteração da informação genética endógena) ou pela incorporação de genes de outras bactérias (material exógeno). Quando exógeno, a transferência pode ocorrer por conjugação com outra bactéria, devendo para isso

que os genes responsáveis pela resistência tenham sido passados através de elementos móveis (plasmídeos, transposons e integrons). Embora menos comum é possível que a transferência ocorra através de bacteriófagos num processo também conhecido como transdução, além disso, há também a transformação, onde DNA livre no ambiente é incorporado por uma bactéria circundante, neste caso uma bactéria teria sofrido lise e seu material genético já então livre no ambiente pôde ser absorvido por outra bactéria (BRUNTON; BRUNTON; CHABNER, 2012).

Os mecanismos de resistência podem ser divididos em três grandes grupos: primeiro aqueles que minimizam a concentração intracelular do antibiótico, quer por pouca penetração através da membrana plasmática, quer por bombas de efluxo; em segundo aqueles que modificam o alvo do antibiótico tanto por mutação genética quanto por modificação pós transcricional do alvo e em terceiro aqueles que inativam o antibiótico por hidrólise ou modificação deste (WRIGHT, 2011).

1.7.2.1 Diminuição da concentração intracelular de antibiótico

Antibióticos hidrofílicos atravessam a membrana externa por difusão através de proteínas porina, presentes na membrana externa. A redução da permeabilidade da membrana externa e limitação da entrada de antibiótico para a célula bacteriana é conseguido pela diminuição de porinas ou pela substituição de porinas que possuam canais menos seletivos por porinas com canais mais seletivos (BLAIR et al., 2014).

Um exemplo é o que acontece em *Pseudomonas aeruginosa* resistente ao imipenem que depende de uma porina específica para sua entrada. A ausência ou um decréscimo da expressão do gene *oprD*, codificador desta porina, torna inviável a atividade deste antibiótico (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2015).

Comparado com bactérias Gram-positivas as Gram-negativas possuem intrinsecamente uma permeabilidade reduzida, devido a presença nestes de uma membrana externa que forma uma barreira extra à permeabilidade (BLAIR et al., 2014). A constituição desta membrana pode gerar também resistência intrínseca a vários compostos. O antibiótico vancomicina inibe a reticulação de peptidoglicanos ligando sequências alvo de peptídeos D-Ala-D-Ala, mas normalmente só é eficaz em bactérias Gram-positivas já que em organismos Gram-negativos não pode atravessar a membrana externa e acessar estes peptídeos no periplasma (TSUCHIDO; TAKANO, 1988).

A concentração intracelular pode também ser reduzida através de bombas de efluxo, que transportam ativamente diversos antibióticos para fora da célula. Essas bombas contribuem significativamente para o aumento da resistência a múltiplos antibióticos e quando passam por super expressão podem conferir elevados níveis de resistência a antibióticos anteriormente efetivos. Algumas bombas de efluxo tem especificidade a um determinado substrato (por exemplo, as bombas de tetraciclina), mas muitas transportam uma ampla gama de substratos estruturalmente diferentes e são conhecidas como bombas de efluxo de resistência a múltiplos fármacos (MDR). Evidências sugerem a presença de uma variedade de sistemas de efluxo em bactérias, uma única bactéria pode possuir vários transportadores de efluxo de diferentes famílias, o que pode gerar a sobreposição de espectros de substrato (BLAIR et al., 2014).

Bombas de efluxo são um dos principais contribuintes para a resistência intrínseca de bactérias Gram-negativas para muitas drogas que podem ser efetivas para tratar infecções bacterianas causadas por bactérias Gram-positivas. O sistema de efluxo a multidrogas MexXY, por exemplo, parece ser o principal determinante da resistência à aminoglicosídeos em *Pseudomonas aeruginosa* (LIN et al., 2015).

1.7.2. 2 Inibição por ação sobre o alvo do antibiótico

É possível, por mutação no próprio alvo que este seja funcional mas que tenha sua afinidade reduzida para o antibiótico, que por não se ligar de forma eficiente, conseqüentemente, tem efeito reduzido ou negligenciável. Outra possibilidade é a adição de um grupo químico que pode impedir a ligação do antibiótico mas sem alterar a sequência da proteína primária do alvo, o que permite manter sua atividade (BLAIR et al., 2014).

1.7.2.3 Inativação do antibiótico

Um dos principais mecanismos de resistência à β -lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas é a produção de enzimas modificadoras destes antibióticos. Em β -lactâmicos, as β -lactamases hidrolisam a ligação amida do anel beta-lactâmico, destruindo o local onde os antibióticos β -lactâmicos se ligam às proteínas de ligação de penicilina bacterianas e através do qual exercem seu efeito antibacteriano (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2015).

O mecanismo mais comum de resistência aos aminoglicosídeos é a modificação covalente do fármaco por enzimas modificadoras. A adição de grupos químicos impede a ligação do aminoglicosídeo ao ribossoma, conferindo assim resistência (SHI et al., 2013).

1.7.3 Genes de resistência

O entendimento da base genética da resistência bacteriana e, portanto, o espectro de atividade de um antibiótico, podem guiar o desenvolvimento de novas combinações de agentes com aperfeiçoamento ou expansão de sua atividade (BLAIR et al., 2014).

Alguns genes importantes, já descritos pela literatura, compreendem a enzima Nova Deli metalo-beta-lactamase (NDM), descrita pela primeira vez em 2008, inicialmente proveniente da Índia. Os genes NDM codificam enzimas capazes de inativar todas as penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos. Esses genes se espalharam para diversos gêneros de membros da família Enterobacteriaceae entre outras bactérias e geograficamente já estão espalhados em países de todo o mundo (DENISUIK et al., 2013; SHOMA et al., 2014).

As carbapenemases clinicamente mais significativas, compreendem os tipos KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase). O gene KPC foi relatado pela primeira vez no final de 1990 a partir de *K. pneumoniae* isolada na Carolina do Norte, EUA e atualmente conta com mais de 10 diferentes variantes descritos. Estas enzimas oferecem uma resistência aos carbapenêmicos, cefalosporinas, cefamicinas e monobactâmicos (VAN DER BIJ; PITOUT, 2012).

Nos genes tet, temos que seus produtos são responsáveis pela proteção do ribossomo, por meio de mecanismos que induzem mudanças conformacionais. A tetraciclina fica então impedida de se ligar ao ribossomo para impedir a síntese de proteínas, a ação pode acontecer também de forma que ocorra a dissociação de tetraciclina já ligada ao ribossomo (BROOKS; ADELI; MCLAUGHLIN, 2014).

Os integrons são de grande importância na epidemiologia da resistência antimicrobiana entre as bactérias Gram-negativas. Eles podem incorporar cassetes gênicos móveis por recombinação específica, podendo assim, carregar distintos genes de resistência. Como exemplo, temos integrons que contêm genes que codificam para metalo- β -lactamase, o que destaca seu papel na disseminação de resistência (SUNDE et al., 2015).

O gene OXA-48 foi identificado pela primeira vez em 2001 a partir de *K. pneumoniae* isolada na Turquia, desde então, as bactérias que produzem β -lactamases foram causas

importantes de surtos nosocomiais em vários países europeus, como França, Alemanha, Espanha, Países Baixos, Bélgica, Reino Unido e Norte da África (VAN DER BIJ; PITOUT, 2012).

Bactérias produtoras de β -lactamases de espectro ampliado (ESBL) foram rastreadas para os genes bla_{TEM} , bla_{SHV} , e genes bla_{CTX-M} , em um surto de *K. pneumoniae* produtora de ESBL detectada em um hospital da Espanha, embora nenhum destes genes tenham sido associados ao alimento como fonte, Calbo et al. (2011) descreve a difusão rápida e generalizada de um clone de *K. pneumoniae* produtor de CTX-M-15 e SHV-1 causando este grande surto nosocomial através da cadeia alimentar. sendo o primeiro relatório que fornece uma visão sobre como a transmissão de ESBL-KP pode ocorrer através do alimento como veículo em ambiente hospitalar. Este estudo, chama atenção para que equipes de controle de infecção devem ter em conta que o alimento pode ser um vetor de transmissão para as estirpes multiresistentes no ambiente hospitalar.

RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS EM LEITE E DERIVADOS

Produtos lácteos apresentando risco à saúde estão distribuídos por todo o mundo. Bactérias do gênero *Campylobacter* podem estar presentes no leite como resultado de mastite clínica ou subclínica, ou indiretamente, através de contaminação fecal. *Campylobacter jejuni* é a espécie de *Campylobacter* mais frequentemente detectada no leite devido a sua presença regular no trato intestinal de bovinos (EFSA, 2014). Relatório do Comitê Científico da agência espanhola de proteção aos consumidores, segurança alimentar e nutrição, sobre zoonoses e resistência à antimicrobianos, indica que campilobacteriose é a zoonose veiculada por alimento mais frequente na Espanha e em todos os países da União Europeia juntos (AECOSAN, 2015). Na Espanha, um total de 5.488 casos (47,5 casos por 100.000 habitantes) foram relatadas (MAPAMA, 2015). Na União Europeia, o número de casos confirmados em 2012 foi de 214.268 (55,49 casos por 100.000 habitantes), com indicações específicas que leite cru foi envolvido em vários surtos de campilobacteriose (EFSA, 2014).

No Egito, 120 amostras de leite foram coletadas de vacas leiteiras que haviam sofrido com mastite clínica. Dos 131 isolados de bacilos Gram-negativos 56 apresentavam fenótipos de resistência abrigando pelo menos um gene de resistência (IBRAHIM et al., 2015). O sistema genético Integron também já foi encontrado em amostras de leite (OMBARAK et al., 2018).

Práticas adequadas durante o processo produtivo são fundamentais para que não haja desenvolvimento de patógenos resistentes, e/ou que permitam eliminar possíveis contaminantes já presentes durante a produção do leite. Em Wisconsin, 45 isolados de *Salmonella* spp. de amostras fecais de gado leiteiro foram caracterizados de acordo com sua susceptibilidade à antibióticos. Mais de metade (51%) de todos os isolados foram resistentes a pelo menos um agente antibiótico, e 29% foram resistentes a no mínimo 8 diferentes drogas. Demonstrando assim que o animal produtor de leite pode ser portador de genes de resistência (MARRERO-ORTIZ et al., 2012).

No Brasil, 90 isolados de *Staphylococcus aureus* oriundos de leite de vaca apresentando mastite mostraram fenótipo de resistência a ampicilina, penicilina e/ou tetraciclina (MARTINI et al., 2017).

Bactérias Gram-negativas como *Escherichia coli* foram identificadas por Montaz et al. (2012) em estudo que identificaram genes de resistência a antibióticos em *Escherichia coli* produtora de toxina shiga isoladas de 719 amostras de leite e produtos lácteos tradicionais do Irã. Das amostras estudadas, 102 apresentavam *E. coli* com prevalência de resistência a tetraciclina, com identificação dos genes Tet A e/ou Tet B em 64% das amostras positivas, trimetoprima (gene *drfA 1*) e estreptomicina (gene *aadA1*) ambos identificados em 41.17% das amostras.

BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS

As bactérias Gram-negativas são envolvidas com uma dupla camada de proteção de membranas lipídicas, através da qual eles expõem compostos nocivos por transporte transmembranar ativo. Várias classes de proteínas que atravessam a membrana medeiam seu transporte e, assim, conferem às bactérias a capacidade de ocupar nichos ecológicos perigosos ou de contornar os efeitos citotóxicos de compostos antibióticos (YU et al., 2013).

Em relação à resistência a antibióticos a estrutura das bactérias Gram-negativas é bastante relevante, particularmente por sua resistência intrínseca relacionada à suas características de pouca permeabilidade de membrana, devido a sua membrana externa, e também por suas bombas de efluxo que fazem o transporte ativo de antibióticos (RANDALL et al., 2013).

O relatório sobre surtos de resistência a antibióticos transmitidos por alimentos de 2013, produzido pelo centro para ciência no interesse público nos Estados Unidos traz

levantamento feito sobre a relação entre surtos de patógenos resistentes a antibióticos, em seres humanos, e alimentos, principalmente os de origem animal. Os 55 surtos relatados ocorreram entre 1973 e 2011 e resultaram em 20.601 indivíduos doentes, dos quais 3.166 necessitaram de hospitalização e 27 morreram. Bactérias Gram-negativas, como *Salmonella Typhimurium*, *S. Newport*, *S. Heidelberg*, *S. Hadar*, *Escherichia coli* e *Campylobacter jejuni*, foram responsáveis por 98,18% dos casos (DEWAAL et al., 2013).

Uma vez que a resistência aos antibióticos tornou-se uma importante ameaça para a medicina moderna, existe um interesse considerável para identificar os locais na qual as bactérias podem obter genes de resistência a antibióticos e os mecanismos pelos quais a resistência ocorre (VAN SCHAİK, 2015).

Estudos de mecanismo de resistência, de forma geral, trazem pouca informação sobre a origem e fonte da resistência a antibióticos. Uma visão ampliada deve incluir o estudo de genes de resistência de bactérias patogênicas e também das não patogênicas e até mesmo genes com o potencial para gerarem resistência. Este fato exige o estudo de todo o genoma do ambiente, ao qual têm se atribuído o termo resistoma, que é de maneira simplificada, a soma de todos os genomas microbianos presentes em determinada área ou amostra (COUGHLAN et al., 2015; D’COSTA, 2006).

A microbiologia tradicional geralmente envolve a obtenção de uma cultura pura para qualquer estudo na área. Contudo, estima-se que essas técnicas de cultura de laboratório padrão fornecem informações sobre 1 % ou menos, da diversidade bacteriana de uma amostra ambiental (TORSVIK; GOKSØYR; DAAE, 1990).

Portanto, a análise do conjunto de bactérias Gram-negativas, neste caso do queijo, permitirá a obtenção de informações mais completas sobre a participação do alimento no processo de desenvolvimento de resistência a antibióticos.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Verificar a susceptibilidade a antibióticos em bactérias Gram-negativas viáveis oriundas de queijo minas frescal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- estabelecer metodologia que permita avaliar a susceptibilidade à antibióticos do conjunto de bactérias Gram-negativas viáveis oriundas do queijo Minas frescal, sem a necessidade de isolamento;

- identificar fenotipicamente a susceptibilidade da microbiota Gram-negativa presente no queijo Minas frescal;

- Estabelecer um comparativo entre pontos de corte interpretativos de susceptibilidade do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e o European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST);

- investigar a presença de genes que conferem às bactérias Gram-negativas resistência à antibióticos.

3. MÉTODOS

AMOSTRAGEM

Quinze queijos Minas Frescal foram coletados, em estabelecimentos comerciais formalizados da cidade do Rio de Janeiro. Todos os queijos selecionados atendiam aos critérios estabelecidos pela RDC nº 12/2001 (BRASIL, 2001): produto na embalagem original não violada, produto visualmente não alterado ou deteriorado, dentro do prazo da validade, com carimbo de inspeção federal (SIF) ou estadual (SIE) e com temperatura de superfície menor ou igual a 8° C. O transporte ao laboratório foi feito em recipiente com manutenção da temperatura adequada de acordo com a legislação. Os queijos selecionados pertenciam a 14 diferentes marcas e 15 diferentes lotes.

MÉTODO DE PRÉ SELEÇÃO

Os queijos foram homogeneizados dentro da embalagem original (soro e queijo) e destes, $25,0 \pm 0,2$ g foram colocados em 225mL de Caldo GN (Gram-negativo) que tem por finalidade o enriquecimento seletivo para o cultivo de organismos Gram-negativos (HIMEDIA, 2011). Procedeu-se a incubação por 24 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ para pré-enriquecimento. Alíquotas de 1 mL foram retiradas para posterior extração de DNA.

Objetivando a pré-seleção de microbiota resistente, após 24 horas, 50 microlitros do caldo foram retirados e colocados em tubos contendo 5 mL de Caldo triptona de soja - TSB (Oxoid, Reino Unido) e disco de antibiótico (Oxoid, Reino Unido) (CDC, 2008). Foram selecionados 10 antibióticos, um de cada classe de acordo com a Classificação de Ambler (AMBLER, 1980) totalizando 150 possíveis isolados. Os antibióticos usados foram: Cefepima (30µg), Ertapenem (10 µg), Gentamicina (10 µg), Ampicilina (10 µg), Ampicilina Sulbactam (10/10 µg), Cloranfenicol (30 µg), Tetraciclina (30 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Ceftazidima (30 µg) e Trimetoprima Sulfametoxazol (1.25/ 23.75 µg). A etapa de pré-seleção foi realizada em triplicata para cada antibiótico testado.

AVALIAÇÃO DE RESISTÊNCIA

Após 24 horas de crescimento, todos os tubos com crescimento (turvação) foram

levados para a próxima etapa, em uma adaptação da técnica de disco difusão, uma alçada (10 microlitros) inoculada de maneira a formar superfície com crescimento homogêneo, em placa de Agar MacConkey, um meio diferencial e levemente seletivo para isolamento de organismos Gram-negativos. O disco antibiótico da classe selecionada foi colocado na superfície da placa recém-semeada e esta levada a estufa a $35^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{ C}$ por 16-18 horas (CDC, 2008; CLSI, 2015).

Após 16-18 horas de incubação, cada placa foi examinada e os diâmetros dos halos de inibição mensurados e avaliados de acordo com tabela de Normas Interpretativas para zona de diâmetro e concentração inibitória mínima para família *Enterobacteriaceae* (CLSI, 2017). Os valores de referência se encontram resumidos na tabela abaixo.

Tabela 1: Resumo das características dos antibióticos utilizados.

Agente Antibiótico	Concentração do disco	Diâmetros das zonas de inibição (mm)		
		Resistente	Intermediário	Sensível
Cefepima (FEP)	30 µg	≤ 18	19-24	≥ 25
Ertapenem (ERT)	10 µg	≤ 18	19-21	≥ 22
Gentamicina (CN)	10 µg	≤ 12	13-14	≥ 15
Ampicilina (AMP)	10 µg	≤ 13	14-16	≥ 17
Ampicilina Sulbactam (SAM)	10/10 µg	≤ 11	12-14	≥ 15
Cloranfenicol (C)	30 µg	≤ 12	13-17	≥ 18
Tetraciclina (TE)	30 µg	≤ 11	12-14	≥ 15
Ciprofloxacina (CIP)	5 µg	≤ 20	21-30	≥ 31
Ceftazidima (CAZ)	30 µg	≤ 17	18-20	≥ 21
Trimetoprima Sulfametoxazol (SXT)	1,25µg/ 23,75 µg	≤ 10	11-15	≥ 16

Para controle positivo, todos os discos de antibiótico foram testados com *Escherichia coli* (ATCC 25922) simultaneamente ao teste.

Os isolados considerados resistentes e intermediários foram estocados em solução de TSB e 20% de glicerol.

Os resultados fenotípicos foram comparados com os pontos de corte interpretativos do European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Pontos de corte interpretativos BrCAST/EUCAST.

Agente Antibiótico	Concentração do disco	Diâmetros das zonas de inibição (mm)		
		Resistente	Intermediário	Sensível
Cefepima (FEP)	30 µg	< 21	21-26	≥ 27
Ertapenem (ERT)	10 µg	< 22	22-24	≥ 25
Gentamicina (CN)	10 µg	< 14	14-16	≥ 17
Ampicilina (AMP)	10 µg	< 14	-	≥ 14
Ampicilina Sulbactam (SAM)	10/10 µg	< 14	-	≥ 14
Cloranfenicol (C)	30 µg	< 17	-	≥ 17
Tetraciclina (TE)	30 µg	-	-	-
Ciprofloxacina (CIP)	5 µg	< 24	24-25	≥ 26
Ceftazidima (CAZ)	30 µg	< 19	21-22	≥ 22
Trimetoprima Sulfametoxazol (SXT)	1,25µg/ 23,75 µg	< 11	11 a 13	≥ 14

EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA dos isolados considerados resistentes e intermediários, assim como do crescimento em Caldo GN (fase de pré enriquecimento) foi realizada de acordo com as instruções do fabricante do kit comercial para extração de DNA genômico de bactérias Gram-negativas GeneJET Genomic DNA Purification KIT (ThermoScientific, Lituânia).

IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA

Isolados intermediários e resistentes foram analisados por PCR para os genes descritos na tabela 3. Os primers foram sintetizados pela Eurofins Genomics (Ebersberg, Alemanha) e Invitrogen Thermo Fisher Scientific (California, EUA) baseados em sequências de oligonucleotídeos previamente publicadas.

Tabela 3: Sequência de nucleotídeos, tamanho dos genes e referências.

Primer	Sequência (5' - 3')	Condições da PCR	Produto	Referência
tem (F)	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	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 et al., 2010
tem (R)	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC			
shv (F)	AGCCGCTTGAGCAAATTA AAC	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.	713	DALLENNE et al., 2010
shv (R)	ATCCCGCAGATAAATCACCA			
oxa (F)	GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG	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.	564	DALLENNE et al., 2010
oxa (R)	GGCACCAGATTCAACTTTCAAG			
int - 1 (F)	CTGCGTTCGGTCAAGGTTCT	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.	882	LANZ et al., 2003
int - 1(R)	GGAATGGCCGAGCAGATCCT			
int - 2 (F)	CACGGATATGCGACAAAAGG	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.	788	LANZ et al., 2003
int - 2 (R)	GTAGCAAACGAGTGACGAAATG			
int - 3 (F)	GCCTCCGGCAGCGACTTTCAG	03 min a 94 °C ; 35 ciclos	979	LANZ et al.,

		de 60s a 94 °C, 60 s a 68 °C, 60 s a 72 °C; 7 min de extensão final a 72 C.		2003
int - 3 (R)	ACGGATCTGCCAAACCTGACT			
ctx - M (F)	ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC	15 min a 95 °C; 30 s 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 et al., 2007
ctx - M (R)	TGGGTRAARTARGTSACCAGAAAYCAGCGG			
kpc (F)	GTATCGCCGTCTAGTTCTGC	05 min a 95 °C; 30 s 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 et al., 2013
kpc (R)	GGTCGTGTTTCCCTTTAGCC			
ndm (F)	GGTTTGCGGATCTGGTTTTTC	10 min a 94 °C; 36 s de 30 s a 94 °C, 40 s a 58 °C, 50 s a 72 °C; e 05 min de extensão final a 72 C.	621	POIREL et al., 2011a
ndm (R)	CGGAATGGCTCATCACGATC			
tet - a (F)	GGCCTCAATTTCCCTGACG	01 min a 94 °C; 30 s 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 et al., 2000
tet - a (R)	AAGCAGGATGTAGCCTGTGC			
tet - b (F)	GAGACGCAATCGAATTCGG	01 min a 94 °C; 30 s 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	GUILLAUME et al., 2000
tet - b (R)	TTTAGTGGCTATTCTTCCCTGCC			
ges-1 to 9, 11 (F)	AGTCGGCTAGACCGGAAAG	10 min a 94 °C; 30 s de 40 s a 94 °C, 40 s a 60 °C, 01 min a 72 °C e 07 min de extensão final a 72 °C	399	DALLENNE et al., 2010
ges-1 to 9, 11 (R)	TTTGTCCGTGCTCAGGAT			
per-1, 3 (F)	GCTCCGATAATGAAAGCGT	10 min a 94 °C; 30 ciclos	520	DALLENNE et

		de 40 s a 94 °C, 40 s a 70 °C, 01 min a 72 °C; and 07 min de extensão final a 72 °C		al., 2010
per-1, 3 (R)	TTCGGCTTGACTCGGCTGA			
veb -1,6 (F)	CATTTCCCGATGCAAAGCGT	10 min a 94 °C; 30 s de 40 s a 94 °C, 40 s a 70 °C, 01 min a 72 °C e 07 min de extensão final a 72 °C	648	DALLENNE et al., 2010
veb -1,6 (R)	CGAAGTTTCTTTGGACTCTG			
imp (F)	GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC	05 min a 94 °C; 35 s de 50 s a 94 °C, 60 s a 70 °C, 01 min a 72 °C e 08 min de extensão final a 72 °C	188	ZEIGHAMI et al., 2015
imp (R)	CCAAACCACTACGTTATCT			
vim (F)	GATGGTGTTTGGTCGCATA	15 min a 95 °C; 36 s de 30 s a 94 °C, 20 s a 57 °C, 50 s a 72 °C; e 05 min de extensão final a 72 °C.	390	KARUNIAWATI et al., 2013
vim (R)	CGAATGCGCAGCACCAG			
oxa 48 (F)	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	10 min a 94 °C; 36 s 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 et al., 2011c
oxa 48 (R)	CATCAAGTTCAACCCAACCG			
uni515 (F)	GTGCCAGCMGCCGCGGTA	03 min a 95 °C; 40 s de 15 s a 95 °C, 60 s a 70 °C, 01 min a 72 °C e 05 min de extensão final a 72 °C.	312	BARMAN et al., 2008
ent826 (R)	GCCTCAAGGGCACAACCTCCAAG			

A. bp: base pairs; B. Ges, per and veb (multiplex PCR); tem, shv and oxa (multiplex PCR); C. S = g ou c; Y = c or t; M = a ou c.

As condições de reação foram baseadas nos protocolos dos autores descritos na tabela. Para identificação da presença da família Enterobacteriaceae, foi utilizado o par de primers (ent826, uni515).

Os genes kpc, oxa-48 e o integron classe 1, foram também investigados no DNA multiespécie oriundo da fase de pré-enriquecimento.

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Todos os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1.5% (Hexapur Bio Lab, Holanda) com Tris-Borato-EDTA (Promega, EUA) em voltagem 90V. A visualização do gel foi realizada em transiluminador de UV (Forlab, Brasil).

4. RESULTADOS

AMOSTRAGEM

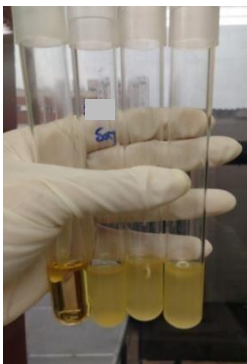
Todos os 15 queijos analisados apresentaram os requisitos para comercialização das amostras, o que permite a inferir que os resultados encontrados podem refletir eventuais falhas durante o processo produtivo. Embora todos tenham sido adquiridos na cidade do Rio de Janeiro, 67% dos queijos foram produzidos em Minas Gerais, 27% no Rio de Janeiro e 6% no Espírito Santo.

A composição média foi similar: leite pasteurizado, cloreto de sódio, cloreto de cálcio, ácido láctico e coalho, exceto por uma amostra (N) sem sal e com adição de cultura láctica.

RESISTÊNCIA NA ETAPA DE PRÉ-SELEÇÃO

Na etapa de pré-seleção em 98% (147/150) dos isolados houve crescimento (Figura 1). Os isolados sem crescimento ocorreram apenas no antibiótico ciprofloxacino nas amostras B,C e E.

Figura 1: Etapa de pré-seleção.

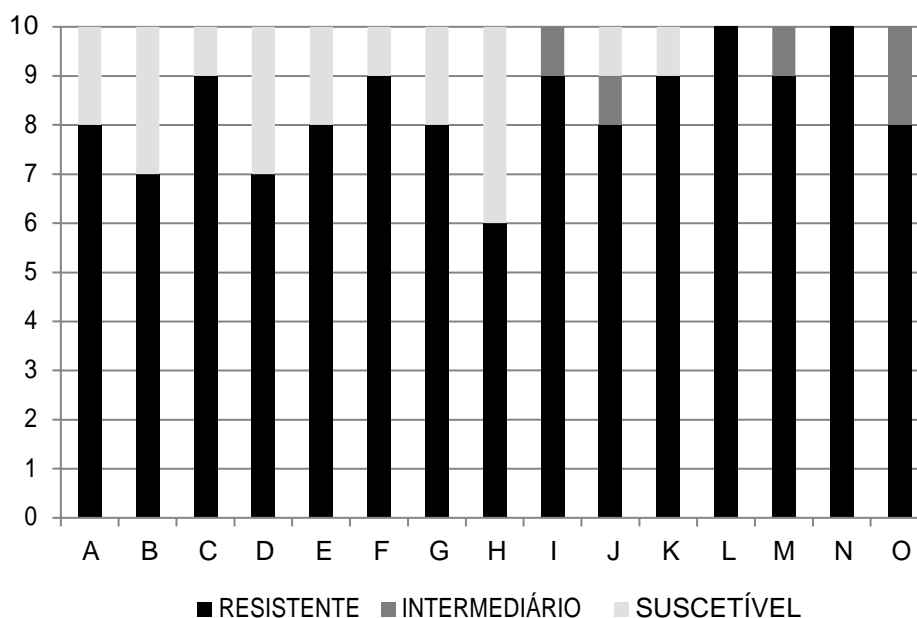


Da esquerda para a direita: Tubo 1 sem inoculo; tubos 2,3 e 4 triplicatas do isolado (amostra H – antibiótico sxt)

RESISTÊNCIA FENOTÍPICA

Todas as amostras de queijo evidenciaram uma microbiota alarmantemente resistente, de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo CLSI. Treze por cento das amostras (2/15) mostraram resistência a todos os 10 antibióticos testados. Taxa de resistência entre 8 a 10 dos antibióticos foi atingida em 80% das amostras (Gráfico 1).

Gráfico 1: Resistência fenotípica por amostra, de acordo com parâmetros do CLSI.

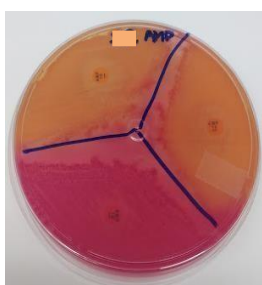


No eixo X (A-O) as amostras de queijo. No eixo Y, o número de antibióticos testado.

Para os beta-lactâmicos (ceftazidima, ampicilina e ampicilina-sulbactam), assim como para cloranfenicol, tetraciclina e trimetoprima-sulfametoxazol nenhuma amostra se mostrou suscetível, representando 60% (6/10) dos antibióticos sem efetividade em todos os queijos analisados (Figura 2). Para os quatro antibióticos restantes, que mostraram alguma ação contra a microbiota, as resistências ainda se mostraram altas: 86,7% em ertapenem (terceira geração de cefalosporina), 66,7% em gentamicina, 46,7% em cefepima (quarta geração de cefalosporina) e 33,3% em ciprofloxacina (fluoroquinolona).

Os resultados intermediários ou suscetível dependendo da dose (SDD), que são dependentes da concentração e da frequência da dose, ocorreram apenas em 6,7% dos isolados de ciprofloxacina e em 26,7% de cefepima.

Figura 2: Disco difusão



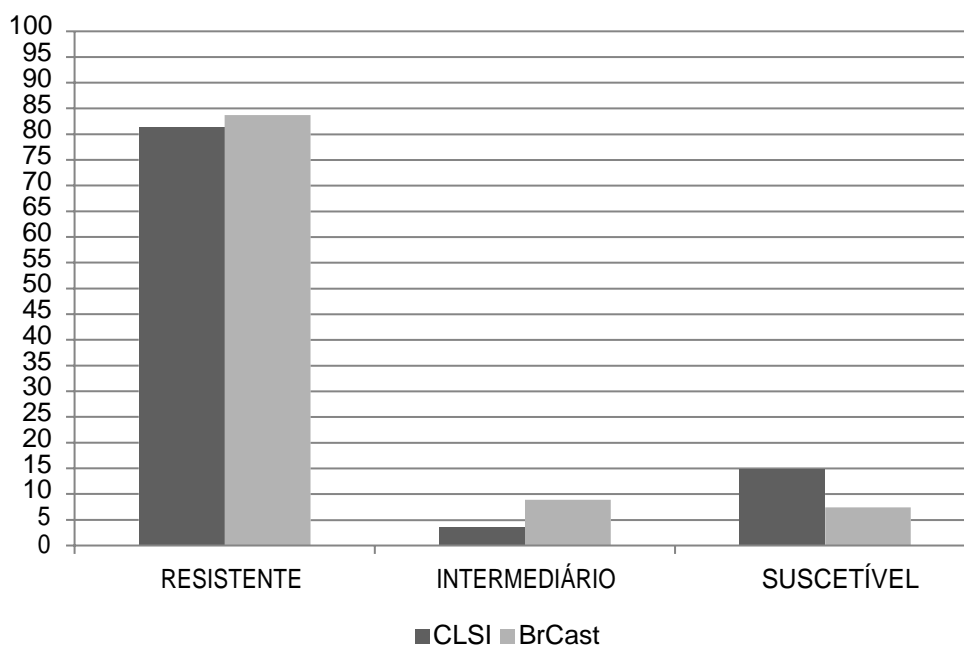
Isolado (Amostra N - antibiótico ampicilina)

No total, 130 isolados distintos (fenotípicamente resistentes e intermediários) foram selecionados para investigação na PCR.

COMPARATIVO RESISTÊNCIA FENOTÍPICA

O trabalho foi fundamentado nos parâmetros estabelecidos pelo CLSI. Porém, quando se comparam os resultados com os pontos de corte do Comitê Brasileiro sobre Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana (BrCAST) que é baseado no Comitê Europeu de Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana (EUCAST), os índices de resistência atingem níveis ainda mais altos (BRCAST, 2017). Neste caso, isolados sensíveis foram reduzidos pela metade, representando apenas 6,7% do total e apenas três antibióticos mostraram eficácia (Gráfico 2).

Gráfico 2 Resistência fenotípica total comparando os padrões CLSI e BrCast.



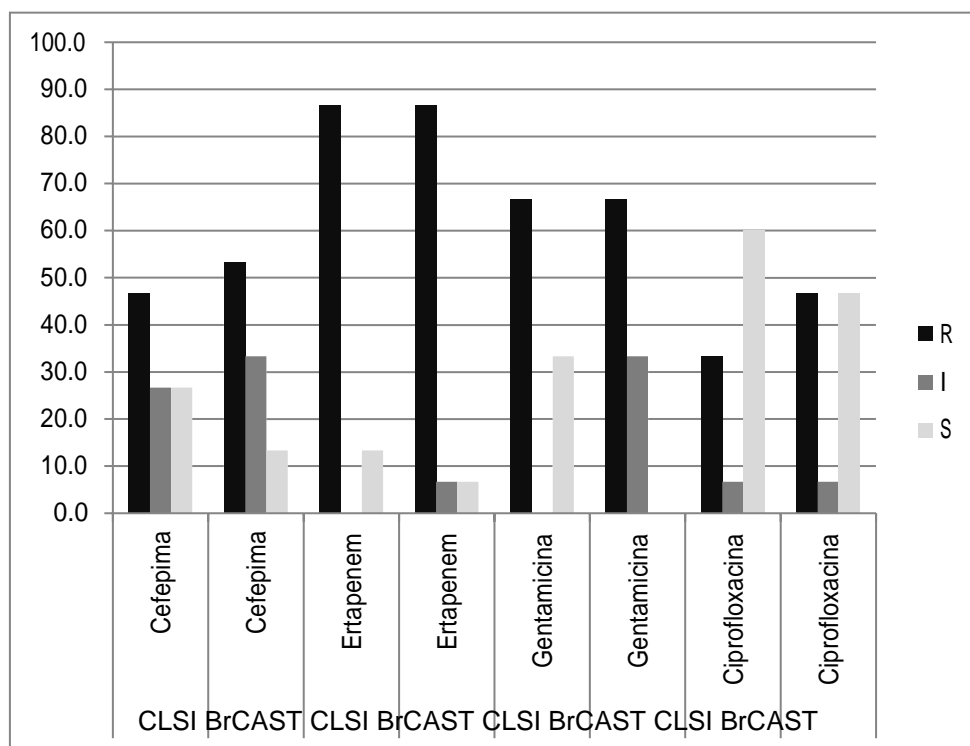
Eixo Y com valores percentuais. Os resultados encontrados em tetraciclina não foram usados para que a comparação seja adequada, uma vez que o BrCast não recomenda a sua utilização para a família *Enterobacteriaceae*.

Embora os pontos de corte sejam diferentes para todos os antibióticos testados, apenas 4 destes tiveram alteração em seus resultados, demonstrado no gráfico 3. Em 73,8% (96/130) dos isolados, não houve nenhuma formação de halo, demonstrando nestes casos, a total ineficácia destes antibióticos frente a microbiota Gram-negativa. De forma preocupante, em

nenhuma das amostras testadas com os antibióticos ampicilina, cloranfenicol e sulfametoxazol/trimetoprima houve ao menos desenvolvimento de halo, e nos casos de ampicilina/sulbactam e tetraciclina apenas uma amostra em cada um deles desenvolveu halo, porém ainda classificadas como resistentes.

Utilizando os parâmetros do BrCAST, os números de resistentes e de intermediários sofreram aumento enquanto a susceptibilidade foi bastante reduzida em todos os antibióticos. Em gentamicina, por exemplo, que de acordo com o CLSI apresentou 33,3% das amostras suscetíveis teria esse número reduzido a zero caso o novo parâmetro fosse utilizado. Outros antibióticos que sofreram modificação foram a ciprofloxacina em que isolados considerados sensível e intermediário foram reposicionados como resistentes, e um isolado considerado sensível foi considerado intermediário o que também ocorreu em ertapenem e cefepima.

Gráfico 3: Comparativo dos antibióticos que apresentaram variações na resistência fenotípica com o uso do CLSI e do BrCAST.



Eixo Y com valores percentuais.

RESISTÊNCIA GENOTÍPICA

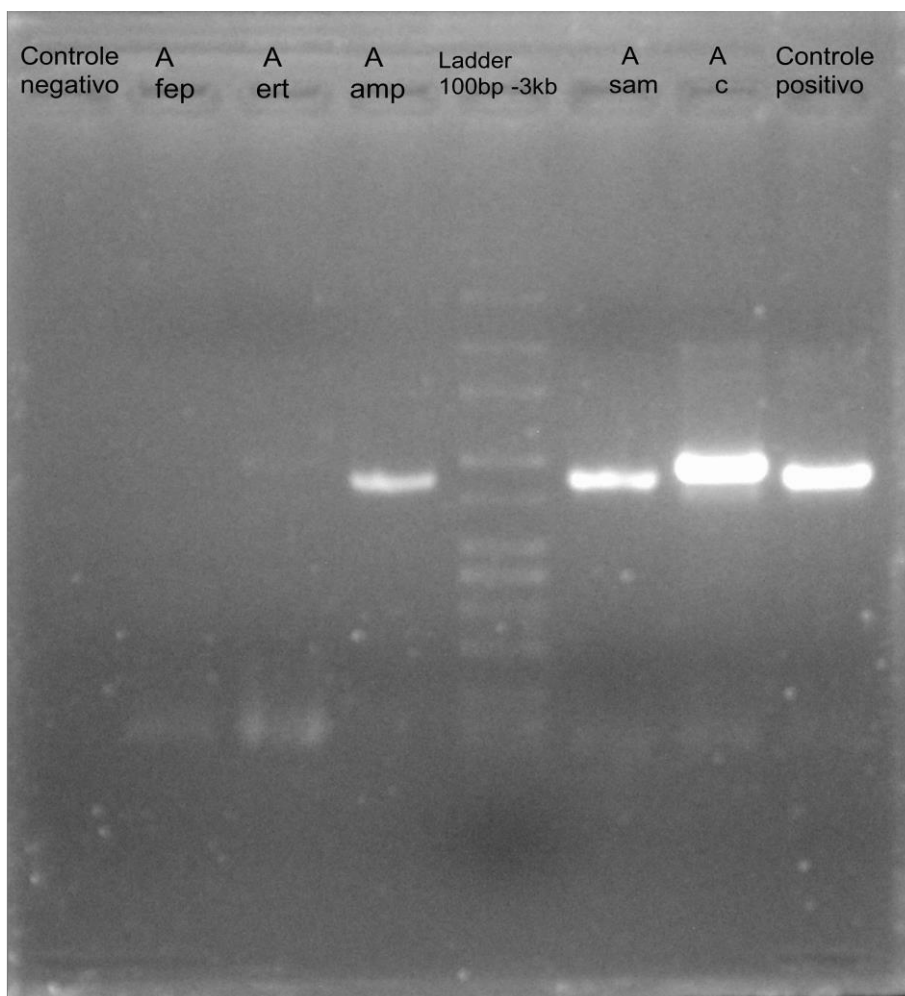
O ensaio da PCR foi realizado com amostras de DNA multi-espécie. No total, um subconjunto de 130 isolados (resistentes ou intermediários) foi testado quanto à presença de

17 genes de resistência diferentes. Foram encontrados nove genes de resistência distintos em 69,2% (90/130) isolados totalizando 224 genes.

Todos os queijos analisados apresentaram pelo menos um dos genes de resistência pesquisados. Notavelmente, 80% (12/15) das amostras de queijo estavam abrigando pelo menos 10 amplicons. O maior número de amplicons (n = 25) foi identificado na amostra K, pertencentes a cinco diferentes genes.)

A maior porcentagem encontrada nos queijos foi do elemento genético integron classe 1. (Tabela 4). Sendo encontrado em isolados resistentes a todos os antibióticos testados, inclusive em isolado considerado intermediário ao antibiótico cefepima (seja aplicando os pontos de corte do CLSI ou do BrCAST (Figura 3).

Figura 3: Gel de eletroforese dos produtos de PCR de integron classe 1.



Gel de agarose 1,5%, 90V, 1h30min. Controle negativo: DNA substituído por água. Poços 2,3,4,6 e 7 Amostra A e antibióticos testados cefepima, ertapenem, ampicilina, ampicilina-sulbactam e cloranfenicol, respectivamente. Amplicon com 882 pares de base.

Tabela 4: Quantidade de genes de resistência em amostras de queijo e em isolados.

Gene	Amostras de queijo	Quant. de Isolados
int 1	93% (14/15)	49,7% (72/145)
tet b	80% (12/15)	80,0% (12/15)
int 2	73% (11/15)	20,0% (26/130)
Shv	73% (11/15)	32,3% (42/130)
tet a	73% (11/15)	73,0% (11/15)
Ctx	67% (10/15)	18,5% (24/130)
Tem	67% (10/15)	35,0% (45/130)
oxa – 48	20% (3/15)	3,6% (3/84)

Nos casos de oxa-48 e int 1 os DNAs da fase de pré-seleção também foram testados.

Os genes *ges*, *per*, *veb*, *imp*, *vim*, *kpc*, *ndm*, *oxa*, assim como int classe 3 não foram encontrados em nenhum dos isolados.

Apenas 30,8% (40/130) dos isolados demonstraram resistência fenotípica e não apresentaram nenhum dos genes que foram selecionados para serem testados.

A distribuição da totalidade dos 224 genes encontrados distribuídos por cada isolado resistente está descrita na tabela 5. Alguns isolados alcançaram o número de 6 diferentes genes presentes.

DETECÇÃO DA FAMÍLIA *ENTEROBACTERIACEAE*

De acordo com a reação de PCR, a família *Enterobacteriaceae* foi identificada em todos os 130 isolados testados.

Tabela 5 Resumo dos genes encontrados em cada isolado.

Queijos	Cefepima	Ertapenem	Gentamicina	Ampicilina	Ampicilina Sulbactam	Cloranfenicol	Tetraciclina	Ciprofloxacina	Ceftazidima	Sulfametoxazol Trimetropim
A			-	shv, int1	int 1	int 1	ctx	-		int 1
B	-	-	int1	shv, int1	shv, int1	int1		-		int 1
C			shv, tem, int1, int2	shv, ctx, int2	ctx, int2	shv,int2	shv, tem, tet a, tet b, int1, int2	-	int2	int1
D	-		-	shv	shv, tem		shv, tem, tet a, tet b, int2	-	int1	shv, tem, int1, int2
E			-				tet b	-		
F		int1	-	shv, int1, int2	shv,tem, int1,ox48	shv, tem	shv, tem, tet a, tet b, int1, int2			ctx, int1
G	-		ctx, int1	ctx	ctx, int1	int1	ctx, tet a, tet b, int2	-		int1
H	-	-	-	ctx, int1, int2	ctx, int1		tet a	-		ctx, int1
I			shv, tem, int1	shv, tem, int1, int2	shv, tem, int1	shv	shv, tem, tet a, tet b, int1, int2			tem, ctx
J			ctx, int1	shv, int1	Ctx	shv, int1	shv, tem, tet a, tet b, int1, int2	shv		ctx, int1, int2
K		int1	shv, tem, int1, int2	shv, tem, int1, int2	shv, tem, int1, int2	shv, tem, int1, int2	shv, tem, tet b, int1, int2	-		shv, int1, int2
L		int1	tem	tem, int1	tem, int1	tem, int1	tem, tet a, tet b, int1	tem, int1	tem	tem, int1
M				shv, ctx, int2	shv, tem, ctx, int2	shv, tem	tem, tet a, tet b, int2	tem, int1	tem	shv, tem
N	tem	tem, int1	tem, int2	shv, tem, ctx, int1	shv, tem, ctx, int1	shv, tem, int1	shv, tem, ctx, tet a, tet b			ctx, int1
O	int1	int1	int1	shv, tem, ctx, int1	shv, tem, ctx, int1	shv, tem, int1	shv, tem, tet a, tet b, int1			tem,shv, ctx, int1

(-) Representam isolados que não foram considerados resistentes fenotípicamente. Quadros em branco representam amostras resistentes, nos quais os genes testados não foram encontrados.

5. DISCUSSÃO

RESISTÊNCIA FENOTÍPICA

O queijo é um produto lácteo amplamente consumido no Brasil e embora seja consumido por todas as faixas etárias, têm seu maior consumo entre a população idosa (IBGE, 2010), sendo também ofertado a pacientes imunossuprimidos (VICENSKI; ALBERTI; DO AMARAL, 2012) corroborando a necessidade de avaliação da segurança deste alimento, visto que é acessível à população suscetível.

A resistência a antibióticos em queijo Minas Frescal no Brasil vêm sendo demonstrada, predominantemente em Gram-positivos, em algumas espécies do gênero *Staphylococcus* (CASAES NUNES et al., 2016); identificação do gene *mec A* (medeia resistência a meticilina) em *Staphylococcus* coagulase negativa (FONTES et al., 2013); identificação do gene *van A* (resistência a vancomicina) no gênero *Enterococcus* (FURLANETO-MAIA et al., 2014). Porém, estudos com foco no isolamento de uma espécie ou gênero para análise podem representar estimativas muito baixas em relação à totalidade da microbiota do alimento. É o que revela estudo realizado em queijo maturado, que com a utilização de ferramentas de metagenômica, tornou possível a identificação da surpreendente variedade de mais de 500 diferentes gêneros em sua microbiota. (ESCOBAR-ZEPEDA; SANCHEZ-FLORES; QUIRASCO BARUCH, 2016). Logo, estudos com isolamento de microrganismos trazem importante informação do potencial de resistência presente especificamente na espécie estudada, mas pouco com relação ao potencial do alimento através da abundância de sua microbiota.

A adaptação da metodologia utilizada, para inclusão de uma etapa de pré-seleção, visou manter a pressão seletiva sobre os microorganismos dado que a manutenção de genes de resistência, em plasmídeos, é um processo custoso à célula o que poderia levar a sua perda, caso a pressão fosse retirada (MOLLENKOPF et al., 2017). Esta etapa mostrou uma resistência fenotípica elevada de 98% (147/150) dos isolados. Apenas um antibiótico testado demonstrou efetividade ainda nesta fase inicial, a ciprofloxacina, em apenas 3 amostras.

Na etapa seguinte, de disco difusão, o número de isolados com resistência sofreu uma pequena redução para 130 isolados. A diminuição de 11,6% pode estar associada a bactérias Gram-negativas anaeróbias que embora possam sabidamente fazer parte da microbiota de gado, como os gêneros *Prevotella*, *Bacteroides*, *Fusobacterium* (DENG et al., 2017) mas que

não poderiam ser avaliadas pela metodologia de disco difusão pela limitação do método em relação a bactérias anaeróbias. É importante ressaltar que resistência a antibióticos já foi identificada nos gêneros citados (FALAGAS; SIAKAVELLAS, 2000), assim como genes de resistência em *Prevotella* (MOON; KIM; LEE, 2017), *Bacteroides* (HANSEN et al., 2017), *Fusobacterium* (VOHA et al., 2006).

Os números de resistência encontrados são alarmantemente altos, o que é particularmente relevante, se tratando de um alimento pronto para consumo e que pode ser consumido sem a necessidade de aquecimento ou tratamento térmico que poderia reduzir os microrganismos presentes. Em dois queijos analisados a microbiota se mostrou resistente a todos os antibióticos testados. Em 80% (12/15) dos queijos testados a resistência alcançou de 8 a 10 antibióticos.

As análises mostraram que todos os queijos analisados foram resistentes a 6 antibióticos diferentes, estes pertencentes a 5 diferentes classes de antibióticos (os beta-lactâmicos: cefalosporina, penicilina isolada e em associação com sulbactam; anfenicol; tetraciclina e sulfonamida em associação com trimetoprima). Em pesquisa analisando 45 cepas de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênicos provenientes de tanques de leite ovino e caprino foram demonstradas resistência a tetraciclina em 8,9% (4/45), ciprofloxacino em 6,7% (3/45), ampicilina em 4,4% (2/45) e gentamicina em 2,2% (1/45) além de outros antibióticos testados aos quais 13,3% (6/45) dos isolados se mostraram multirresistentes a até 5 diferentes antibióticos (PEXARA et al., 2016).

Dentre os 6 antibióticos que não demonstraram eficiência em nenhuma das amostras estão a cefalosporina de terceira geração: ceftazidima. A família *Enterobacteriaceae* (que foi identificada em todos os 130 isolados estudados) resistentes a cefalosporinas de terceira geração são um grupo considerado crítico (prioridade máxima) para desenvolvimento de pesquisas e novos antibióticos, de acordo com a Lista de Patógenos Prioritários (LPP) do CLSI em 2017 (WHO, 2017a). Importante ressaltar que além de 100% de resistência frente a este antibiótico de 3ª geração, 46,7% das amostras já se mostraram resistentes a cefepima, uma cefalosporina de 4ª geração. No Brasil, embora alguns estudos tenham testado a susceptibilidade de isolados de alimentos a cefepima: em *Staphylococcus* spp (HACHIYA et al., 2017); em *E. coli* (OLTRAMARI et al., 2014) em *Campylobacter* spp (HUNGARO et al., 2015), resistência raramente é encontrada, como em 3,3% (3/92) isolados de *Salmonella typhimurium* (ALMEIDA et al., 2015). Globalmente, esta resistência já foi identificada na Itália em 34,9% (22/63) das *Pseudomonas* spp em tanques/reservatório de leite (DECIMO;

SILVETTI; BRASCA, 2016); e também na Espanha, em 94,6% (106/112) das *E. coli* pré-selecionadas com produção de beta-lactamase de espectro ampliado (ESBL) em alimentos como carne fresca e vegetais. Amostras de 34 queijos também foram pesquisadas, mas como não apresentaram a única espécie selecionada para estudo, a resistência a cefepima não foi avaliada neste alimento (OJER-USOZ; GONZÁLEZ; VITAS, 2017).

A família *Enterobacteriaceae* resistente a carbapenêmicos é outro grupo considerado crítico pelo LPP, nos queijos analisados 86,7% deles foram resistentes ao carbapenêmico ertapenem. Susceptibilidade a ertapenem, embora pouco pesquisada em alimento não tem sido encontrada, no Brasil e mundialmente: *Listeria monocytogenes* e *Salmonella* spp (RODRÍGUEZ-LÁZARO et al., 2015); *Salmonella* spp. (MAKA et al., 2015); *E. coli* (FERREIRA et al., 2014); *E. coli* (HO et al., 2011), no entanto já foi identificada em fezes de animais de produção de alimento: *Salmonella enterica* de fezes bovina (ACAR et al., 2017); *E. coli* produtora de ESBL em fezes de frango (OJO; SCHWARZ; MICHAEL, 2016)

A OMS enfatiza ainda a necessidade urgente de dados da área de alimentos e necessidade de coordenação entre sistemas de vigilância humana e animal para a eficácia da abordagem “One health” para limitar a propagação da resistência (WHO, 2017b). A relação entre uso de antibiótico na cadeia de alimentos e aumento na resistência vem sendo discutida.

As evidências indicam que as intervenções que restringem o uso de antibióticos em animais produtores de alimentos estão associadas a uma redução na presença de bactérias resistentes aos antibióticos nesses animais de acordo com avaliação por meta-análise (TANG et al., 2017)

Vale lembrar que no Brasil, desde 2009, de acordo com o Regulamento Técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antibióticos de uso veterinário, o grupo das quinolonas, do qual a ciprofloxacina faz parte; os anfenicóis, as tetraciclinas, os beta-lactâmicos (benzilpenicilâmicos e cefalosporinas) e sulfonamidas sistêmicas, têm vedada a sua utilização como aditivo zotécnico melhorador de desempenho ou como conservante de alimento para animais sendo de uso exclusivo em produtos antibióticos de uso veterinário (BRASIL, 2009).

5.1.1 Resistência Fenotípica: Comparativo entre Parâmetros

Os pontos de corte para determinação da susceptibilidade, selecionados para uso na pesquisa foram os parâmetros estabelecidos pelo CLSI, mas caso fossem utilizados os parâmetros brasileiros (BrCAST) e/ou europeu (EUCAST) um número maior de isolados

seria classificado como resistente e/ou intermediário e conseqüentemente aumentado o número de isolados em que os genes foram testados. Utilizando o critério BrCast, de forma geral, os isolados sensíveis seriam reduzidos pela metade, representando então, apenas 10 (7,6%) isolados sensíveis em um total de 130 isolados. Toda a susceptibilidade encontrada poderia ser resumida da seguinte forma: apenas 1 amostra suscetível à ertapenem, 2 à cefepima e 7 à ciprofloxacina.

No caso dos aminoglicosídeos, a gentamicina que apresentou 33,3% das amostras suscetíveis (pelo CLSI) teria esse número reduzido a zero caso o novo parâmetro fosse utilizado.

Importante notar que em 125 isolados considerados resistentes, 96 deles não demonstraram nenhum halo de inibição, o que não permitiria outra interpretação que não fosse a resistência, qualquer que fosse o critério selecionado para uso. Isso ocorreu em 100% dos queijos analisados nos isolados resistentes a ampicilina, cloranfenicol, e sulfametoxazol-trimetoprima e em 93.3% (14/15) amostras com ampicilina-sulbactam e tetraciclina. Esse fato enfatiza a intensa capacidade de resistência verificada na microbiota dos queijos avaliados. Além disso, a redução significativa no número de isolados suscetíveis e aumento no número de intermediários e resistentes pôde ser verificada em apenas 29 isolados restantes, evidenciando assim, quão criteriosos são os pontos de corte BrCAST/EUCAST embora estes sejam menos difundidos que os padrões do CLSI.

RESISTÊNCIA GENOTÍPICA

Oito diferentes genes de resistência foram encontrados em 69,2% (90/130) isolados totalizando 224 genes. Todos os queijos analisados apresentaram pelo menos um gene de resistência pesquisado.

A maior prevalência encontrada foi do elemento genético integron de classe 1.

Integrans

Integrans são elementos genéticos que podem funcionar como sistemas de aquisição de genes. Estes genes, na forma de cassetes gênicos, são capturados e convertidos em genes funcionais pelo integron (GILLINGS, 2017).

Os integrans garantem uma resposta rápida a alterações ambientais impulsionando a adaptação bacteriana. Isso é possível não apenas pela possibilidade de capturar novos genes,

mas também como pela viabilidade de seus genes serem reordenados, além de consequentemente atuar como um repositório de genes (LOOT et al., 2017) possuindo um papel fundamental na adaptação de bactérias a antibioterapia, uma vez que têm acesso a um vasto pool de genes com diversas funções permitindo às células que os contêm uma rápida seleção e fixação desses genes sob efeito de forte pressão seletiva imposta pelo uso de antibióticos na medicina humana, veterinária e na agricultura (GILLINGS, 2017).

O integron mais estudado em alimentos, assim como em outras áreas é o integron classe 1, tendo seus cassetes mais detalhadamente descritos na literatura (GILLINGS, 2014). Nos queijos analisados a maior prevalência encontrada foi em integron de classe 1, encontrado em isolados resistentes a todos os 10 antibióticos testados e em 93% (14/15) das amostras. A maior quantidade foi verificada em sulfametoxazol/trimetoprima, onde foi detectado em 80% dos isolados e em ampicilina e ampicilina/sulbactam com 66,6% em ambas. Surpreendentemente, foi detectado inclusive em isolado considerado SDD (suscetível dependente da dose) a cefalosporina de 4^a geração: cefepima (seja aplicando os pontos de corte do CLSI ou do BrCAST).

Os números encontrados em outros artigos são menores, o que pode estar relacionado à metodologia de estudo, contudo podem ainda ser comparáveis. Integron classe 1 foi encontrado em 28 isolados de *E.coli* resistentes em 187 amostras de leite no Egito (OMBARAK et al., 2018). Raramente estudado em queijos e mesmo em produtos lácteos, já foi encontrado em outros produtos alimentícios, como carne bovina (AMMAR et al., 2016), cachorro quente (CAMPOS et al., 2015) e também de amostra de *Pseudomonas aeruginosa* isolada de vacas com mastite (MOKHTARI et al., 2016).

YU et al. (2016) pesquisando carne já cocionada pesquisou a presença de integron de classe 1 em *E.coli* e também a possibilidade de sua transferência para *E.coli* com ausência de integrons, obtendo resultados positivos em ambos os testes. Enfatizando a importância do alimento na transferência horizontal de genes de resistência.

Integrans de classe 2 embora já tenham sua importância reconhecida na área clínica, ainda são parcamente pesquisados na área de alimentos. Em nosso estudo foi detectado em 73% (11/15) dos queijos, sendo encontrado em maior número entre os isolados resistentes a tetraciclina (53,3% dos isolados) e ampicilina (40%), mas também encontrado em isolados resistentes a gentamicina, ampicilina/sulbactam, sulfametoxazol/trimetoprima, cloranfenicol e ceftazidima. Os números são comparáveis ao encontrado em análise realizada no Egito em 27 isolados de *Shigella* spp. multirresistentes. Isolados provenientes de leite e queijo

apresentaram 8 integrons e em carne bovina e frango 12 integrons classe 2 (AHMED; SHIMAMOTO, 2015).

Pesquisas abordando integron de classe 3 em alimentos são raríssimas. Apenas 1 integron de classe 3 foi identificado em 333 bactérias Gram-negativas isoladas de 144 amostras de frutas e vegetais (JONES-DIAS et al., 2016). Em nossa pesquisa, nenhum dos queijos analisados apresentou integron classe 3.

A pesquisa de integrons é ainda escassa na área de alimentos, centradas em um pequeno número de espécies bacterianas, em integrons de classe 1 e pouca variedade de alimentos. Nossas análises mostraram que mais da metade (56,2%) dos isolados possuíam um dos sistemas integron, classe 1 ou 2 ou em alguns casos os dois sistemas em um mesmo isolado. O alto número de isolados encontrados em nossas análises enfatiza a necessidade de que esse sistema genético seja adequadamente pesquisado para que se possa compreender na totalidade a real importância de integrons na segurança de alimentos.

Genes de resistência a tetraciclina

Atualmente já foram descritos 59 genes de resistência à tetraciclina (genes tet) (MAROSEVIC; KAEVSKA; JAGLIC, 2017). Em nosso estudo 100% dos queijos analisados tiveram microbiota resistente a tetraciclina e em 80% dos casos a resistência está provavelmente relacionada à presença de dois genes estudados (tet a e tet b). Em 73% (11/15) dos queijos tet a está presente e em 80% (12/15) tet b. Importante notar que 10 queijos possuíam simultaneamente estes dois genes, o que sugere que outros genes (não testados) possam também coexistir, principalmente em amostras com alto índice de integrons, como as encontradas neste estudo.

Resistência a tetraciclina em queijo também foi retratada em análise realizada com 100 amostras de queijo de leite cru egípcio popular, queijo karish, encontrou 120 isolados de *Enterococcus* spp. em 90 queijos, onde 14 cepas (11,6%, 14/120) possuíam genes de resistência a antibióticos. Estes incluíram tet M, tet L, tet K, erm B e aph 3', que foram detectados em 5%, 3,3%, 0,83%, 0,83% e 0,83% de isolados, respectivamente (HAMMAD; HASSAN; SHIMAMOTO, 2015).

A fim de obter informações sobre o fluxo de resistência antimicrobiana através do meio ambiente e suprimento de alimentos, 78 cepas de *Escherichia coli* foram recuperadas de amostras de ar e exsudato de uma fazenda de gado leiteiro e seus arredores na Espanha.

Nestes isolados 15 cepas foram resistentes a tetraciclina e destas, sete abrigavam o gene tet a, quatro tet b e um isolado abrigava simultaneamente os dois genes (NAVAJAS-BENITO et al., 2017).

Em Minas Gerais, foram selecionados 90 isolados de *Staphylococcus aureus* oriundos de leite de vaca apresentando mastite. Os isolados foram selecionados por seu fenótipo de resistência a ampicilina, penicilina e/ou tetraciclina, e nestes foram encontrados blaZ (gene de produção de beta-lactamase) em 97% dos isolados, tet K em 84%, tet L em 9%, tet M em 2% e tet O em 1% (MARTINI et al., 2017).

Pesquisa em 49 isolados de *Campylobacter* spp. em tanques e filtros de leite, detectou 68,4% de resistência a tetraciclina (DEL COLLO et al., 2017). As taxas e frequência de resistência a tetraciclina e seus genes podem estar relacionadas à constante utilização deste antibiótico em gado. Estudo sobre o uso de antibióticos em rebanhos bovinos em 15 unidades de agricultura familiar no norte de Minas Gerais identificou que antibióticos foram os medicamentos mais utilizados contra a mastite e desses a tetraciclina e os aminoglicosídeos foram os mais frequentes (VIEIRA et al., 2016). Além disso, resíduos de antibióticos em leite vem sendo demonstrada no Brasil. No Paraná, em 80 amostras de leite de vaca pasteurizado apresentando resíduo de antibiótico, quarenta e oito amostras (18,5%) foram positivas para tetraciclina, 29 (17,4%) para neomicina, 9 (3,5%) para beta-lactâmicos, 6 (2,3%) para gentamicina, 4 (1,5%) para cloranfenicol e 1 (0,4%) para estreptomicina-di-hidroreptomicina (ZANELLA et al., 2010). Alertando para a intensa utilização de antibióticos diversos em gado leiteiro no Brasil, onde resíduos de antibióticos já foram encontrados, inclusive em leite de cultivo orgânico (RIBEIRO et al., 2009).

Genes produtores de beta-lactamases

Antibióticos beta-lactâmicos, são a terapia de primeira linha para infecções graves (TACCONE; LAUPLAND; MONTRAVERS, 2016). Entre eles estão selecionados os antibióticos criticamente importantes para o gerenciamento de risco da resistência antimicrobiana devido ao uso não humano (WHO, 2017c).

A resistência bacteriana a beta-lactâmicos é obtida principalmente através de beta-lactamases que hidrolisam a maioria dos antibióticos beta-lactâmicos (BAEDE et al., 2017). A maioria das beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) evoluíram a partir de mutações

genéticas em beta-lactamases tipo tem e shv e são consideradas um mecanismo importante que confere resistência às penicilinas e cefalosporinas, inclusive de terceira e quarta geração.

As ESBLs da família ctx que tem sua ação em cefalosporinas, principalmente em cefotaxima (cefalosporina de terceira geração) foram inicialmente isoladas de cepas na Europa e Argentina no final da década de 1980 e início da década de 1990 (BAUERNFEIND; SCHWEIGHART; GRIMM, 1990; RADICE et al., 2002). Desde então vem sendo identificadas e estão se tornando causa de preocupação em todo o mundo. No Brasil, a família de ESBLs ctx-m são as mais prevalentes em amostras clínicas, particularmente em *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* (ROCHA; PINTO; BARBOSA, 2016).

Em nossas análises, o gene produtor de ESBL encontrado em maior número de amostras foi o shv, presente em 11 dos 15 queijos, sendo identificado em 32,3% (42/130) dos isolados resistentes a 6 diferentes antibióticos. Com prevalência entre os isolados resistentes as penicilinas: SAM (11 isolados), AMP (8), mas também presente em C, TE, SXT e CN. Quantidade semelhante foi verificada com o gene tem, encontrado em 10 dos 15 queijos, em 35% (45/130) isolados, sendo estes, resistentes a todos os antibióticos testados, incluindo as cefalosporinas de terceira e quarta geração e um carbapenêmico. A maior contagem foi encontrada em TE (10 isolados) e SAM (8). O gene ctx foi encontrado em 10 dos 15 queijos em isolados resistentes a 5 antibióticos em percentual de 18,5% (24/130). Os isolados resistentes as penicilinas: SAM (7 isolados), AMP (7), apresentaram o maior número, mas também foi verificado entre TE, CN e C. Importante ressaltar que dos 72 isolados apresentando ESBLs, 32 apresentavam simultaneamente pelo menos dois dos ESBLs descritos (tem,shv e ctx).

Pesquisa em leite mastítico, identificou 23,53% (36/150) isolados de *E. coli* produtoras de ESBL. Em suas análises o gene ctx foi predominante, sendo encontrado em 77,78% (28/36) dos isolados, seguido de 55,56% (20/36) isolados apresentaram o gene tem e em 16,67% (6/36) o gene shv. Sendo que em 44,44% (16/36) possuíam 2 ou 3 destes genes conjuntamente (ALI et al., 2016).

Em pesquisa semelhante 490 *E. coli* isoladas de amostras de leite mastítico foram investigadas para a produção de ESBLs por teste de susceptibilidade a antibióticos. Em 27 *E. coli* com produção de beta-lactamases, 22 isolados possuíam genes da família ctx-m enquanto 13 possuíam genes tem, e shv não foi encontrado em nenhuma das amostras (EISENBERGER et al., 2017).

Prevalência de isolados produtores de ESBLs entre cepas de *E. coli* com perfil de multirresistência a diferentes classes de antibióticos como fluoroquinolonas, trimetoprima, tetraciclina e aminoglicosídeos foi analisada em isolados hospitalares. Dentre as 197 *E. coli* produtoras de ESBLs, 172 (87,3%) continham genes que codificavam enzimas CTX-M e 142 (72,1%) produtores continham genes que codificavam enzimas TEM. Os resultados mostraram que a maioria das *E. coli* produtoras de ESBL produziu mais de um tipo de beta-lactamase. Os dados do teste de susceptibilidade mostraram que os produtores de ESBL que eram resistentes à maioria dos beta-lactâmicos eram freqüentemente resistentes aos antibióticos não beta-lactâmicos, por exemplo, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (LIU et al., 2015).

A resistência a múltiplos fármacos tem sido comumente observada na maioria dos produtores de ESBL e de forma mais alarmante, a co-resistência a outros antibióticos de uso comum, como aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, tetraciclina tem sido freqüentemente relatada (TIMOFTE et al., 2014; XU et al., 2015).

Os genes *per*, *oxa* e *veb* também produtores de ESBLs não foram encontrados nos queijos analisados. Não são comumente pesquisados em queijo ou mesmo produtos lácteos. O gene *per* embora pesquisado não foi encontrado em queijos (GESER; STEPHAN; HÄCHLER, 2012; KHOSHBAKHT; SHAHED; ASKI, 2014), o gene *veb* já foi encontrado em produtos lácteos (KHOSHBAKHT; SHAHED; ASKI, 2014), e o gene *oxa* identificado em queijo tradicional do Egito (HAMMAD; ISHIDA; SHIMAMOTO, 2009).

5.2.3.1 Beta-lactamase com ação em carbapenêmicos

Carbapenêmicos são geralmente uma das opções restantes de tratamento para pacientes infectados com bactérias resistentes a vários outros medicamentos disponíveis. Quando resistência ao carbapenêmico é identificada a terapia é geralmente limitada a antibióticos, como a colistina, que pode ser menos efetiva e/ou ter mais efeitos adversos (EFSA, 2017).

Algumas beta-lactamases da classe D, além de sua presumida ação em penicilinas também hidrolisam carbapenêmicos. Esse é o caso do gene *oxa-48*, que possui uma atividade de carbapenemase fraca, mas significativa, identificada pela primeira vez a partir de um isolado de *Klebsiella pneumoniae* resistente a todos os beta-lactâmicos incluindo

carbapenêmicos, identificado em um hospital em Istambul, Turquia, em 2001 (POIREL et al., 2004).

Embora as carbapenemases tenham sido predominantemente identificadas, em ambientes nosocomiais e comunitários (KHALIFA et al., 2017; LÜBBERT et al., 2017; MAIRI et al., 2017) a presença de oxa-48 em animais produtores de alimento (CECCARELLI et al., 2017) sugere que estes possam atuar como reservatório e também possibilitar a transmissão da resistência ao homem via alimentação ou mesmo durante o manejo.

Investigando a prevalência de *Enterobacteriaceae* produzindo ESBL e carbapenemase em leite cru no Líbano Diab, 2017, encontrou uma alta prevalência (30,2%) de *K. pneumoniae* produzindo CTX-M-15, com identificação de uma cepa de *K. pneumoniae* produzindo OXA-48 além de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras de CTX-M-15. Mostrando que o leite pode atuar como uma fonte de exposição humana a ESBLs e carbapenemases.

Em nossas análises, o gene oxa-48 foi identificado em 3 queijos diferentes. Em dois queijos a identificação ocorreu em DNA da etapa de enriquecimento seletivo para Gram-negativos. No último isolado (resistente a ampicilina/sulbactam) também foram identificados os genes *tem*, *shv* e *integron* classe 1.

Oxa-48 demonstra atividade hidrolítica de alto nível contra penicilinas e hidrólise de baixo nível em relação à carbapenêmicos e não são suscetíveis a inibidores de beta-lactamase, como o sulbactam (MAIRI et al., 2017; POIREL; POTRON; NORDMANN, 2012).

O que é notável com os produtores de OXA-48 é que padrões de resistência a beta-lactâmicos muito diferentes podem ser observados, já que sua susceptibilidade e resistência a cefalosporinas e carbapenêmicos podem ser variadas, tornando seu reconhecimento e detecção desafiadores (POIREL; POTRON; NORDMANN, 2012). Embora já difundido em vários países (CARRÈR et al., 2010; POIREL et al., 2011b) no Brasil, vem sendo identificado predominantemente em ambiente hospitalar normalmente na cidade de Porto Alegre (DE MOURA PINTO et al., 2014; PAGANO et al., 2016; SCHERER; CALVETTI, 2017).

O surgimento de enzimas OXA conferindo resistência aos carbapenêmicos, particularmente em *Acinetobacter baumannii*, transformou essas beta-lactamases de um obstáculo que inicialmente se acreditou pequeno em um grave problema globalizado por reduzir a eficácia clínica dos carbapenêmicos (EVANS; AMYES, 2014).

Os genes *imp*, *vim*, *kpc*, *ndm* e *ges* com ação em carbapenêmicos não foram encontrados nos queijos analisados. A pesquisa destes genes em queijo é rara não tendo sido

encontrada para os genes *imp*, *vim* e *ges*. O gene *ndm* já foi encontrado em amostras de leite, porém de leite materno (GHATAK et al., 2013), *kpc*, embora tenha sido pesquisado não foi identificado em leite (GESER; STEPHAN; HÄCHLER, 2012).

6. CONCLUSÃO

O queijo Minas Frescal apresentou microbiota Gram-negativa viável com grande potencial de resistência evidenciado fenotipicamente pela intensa resistência encontrada.

A quantidade e diversidade de genes encontrados com a utilização da avaliação do conjunto de bactérias Gram-negativas se mostrou viável quando comparadas aos resultados encontrados com a utilização de isolamento de microrganismo, mostrando que a metodologia utilizada é uma possibilidade com uma resposta mais completa sobre a capacidade de um alimento, através de sua microbiota, favorecer o desenvolvimento de resistência.

A comparação dos pontos de corte mostraram que a utilização dos parâmetros do BrCAST/EUCAST podem trazer resultados mais rigorosos de susceptibilidade a antibióticos.

Os resultados corroboram a importância da área de alimentos como um setor a ser gerenciado para a redução do processo de resistência aos antibióticos.

REFERÊNCIAS

- ABIQ. **Mercado de queijos tem alto potencial de crescimento no Brasil**. Disponível em: <<http://www.oleite.com.br/Noticia/abiq253a-mercado-de-queijos-tem-alto-potencial-de-crescimento-no-brasil-492716>>. Acesso em: 5 jan. 2018.
- ACAR, S. et al. Phenotyping and genetic characterization of Salmonella enterica isolates from Turkey revealing arise of different features specific to geography. **International journal of food microbiology**, v. 241, p. 98–107, 16 jan. 2017.
- AECOSAN. Report of the Scientific Committee of the Spanish Agency for Consumer Affairs , Food Safety and Nutrition (AECOSAN) on the microbiological risks associated with the consumption of raw milk and raw milk-based products. **Revista del Comité Científico de la AECOSAN**, v. 3, n. 21, p. 45–78, 2015.
- AHAGON, C. M. et al. Avaliação da qualidade de queijo minas frescal quanto aos ensaios de umidade, gordura e presença de matérias estranhas. v. 13, n. 3, p. 956–964, 2017.
- AHMED, A. M.; SHIMAMOTO, T. Molecular characterization of multidrug-resistant Shigella spp. of food origin. **International journal of food microbiology**, v. 194, p. 78–82, 2 fev. 2015.
- ALI, T. et al. ESBL-Producing Escherichia coli from Cows Suffering Mastitis in China Contain Clinical Class 1 Integrons with CTX-M Linked to ISCR1. **Frontiers in microbiology**, v. 7, n. NOV, p. 1931, 2016.
- ALMEIDA, F. et al. Genotypic diversity, pathogenic potential and the resistance profile of Salmonella Typhimurium strains isolated from humans and food from 1983 to 2013 in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 64, n. 11, p. 1395–1407, 2015.
- AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 289, n. 1036, p. 321–31, 16 maio 1980.
- AMINOV, R. I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. **Frontiers in microbiology**, v. 1, p. 134, 2010.
- AMMAR, A. M. et al. Class 1 integron and associated gene cassettes mediating multiple-drug resistance in some food borne pathogens. **International Food Research Journal**, v. 23, n. 1, p. 332–339, 2016.
- APOLINÁRIO, T. C. C.; SANTOS, G. S. DOS; LAVORATO, J. A. A. Avaliação da qualidade microbiológica do queijo minas frescal produzido por laticínios do estado de minas gerais. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, n. 6, p. 433, 2 dez. 2014.

- AZIMI, L. et al. Evaluation of Phenotypic Methods for Detection of *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase-Producing K . *Pneumoniae in Tehran*. v. 2, n. 3, p. 26–31, 2013.
- BAEDE, V. O. et al. Raw pet food as a risk factor for shedding of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in household cats. **PLOS ONE**, v. 12, n. 11, p. e0187239, 2 nov. 2017.
- BARMAN, M. et al. Enteric salmonellosis disrupts the microbial ecology of the murine gastrointestinal tract. **Infection and immunity**, v. 76, n. 3, p. 907–15, mar. 2008.
- BAUERNFEIND, A.; SCHWEIGHART, S.; GRIMM, H. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. **Infection**, v. 18, n. 5, p. 294–298, set. 1990.
- BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42–51, 1 dez. 2014a.
- BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42–51, 1 dez. 2014b.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento. Portaria nº 146, de 7 de março de 1996. **Diário Oficial da União**, v. 1, n. 204, p. 23, 1996.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento. Portaria nº 352, de 4 de setembro de 1997. **Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 08 de setembro de 1997**, 1997.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Diário Oficial da União de 10 de janeiro de 2001.**, 2001.
- BRASIL. Lei nº 11.346, de 15 de setembro de 2006. **Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 de setembro de 2006.**, 2006.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 26, de 9 de julho de 2009. **Diário Oficial da União**, 2009.
- BRASIL. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. [s.l.] Ministério da Saúde, 2010.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC n. 20, de 5 de maio de 2011. . 2011, p. 39–41.
- BRCAS. Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing - BrCAST Tabelas de pontos de corte para interpreta. **Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**, p. 1–58, 2017.

BROOKS, J. P.; ADELI, A.; MCLAUGHLIN, M. R. Microbial ecology, bacterial pathogens, and antibiotic resistant genes in swine manure wastewater as influenced by three swine management systems. **Water Research**, v. 57, p. 96–103, 15 jun. 2014.

BRUNTON, L. L.; BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman (12a. ed.)** (Hill MacGraw, Ed.)Hill MacGraw, , 2012.

CALBO, E. et al. Foodborne Nosocomial Outbreak of SHV1 and CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology and Control. **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 6, p. 743–749, 15 mar. 2011.

CAMPOS, J. et al. Ready-to-eat street-vended food as a potential vehicle of bacterial pathogens and antimicrobial resistance: An exploratory study in Porto region, Portugal. **International Journal of Food Microbiology**, v. 206, p. 1–6, 2015.

CARRËR, A. et al. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 1369–73, 1 mar. 2010.

CASAES NUNES, R. S. et al. Identification and molecular phylogeny of coagulase-negative staphylococci isolates from Minas Frescal cheese in southeastern Brazil: Superantigenic toxin production and antibiotic resistance. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 4, p. 2641–2653, 2016.

CDC. Laboratory Protocol for Detection of Carbapenem-Resistant or Carbapenemase-Producing , *Klebsiella* spp . and *E . coli* from Rectal Swabs. **Centro de Controle e Prevenção de Doenças**, n. 5, p. 1–6, 2008.

CDC. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. **Centro de Controle e Prevenção de Doenças**, p. 114, 2013.

CDC. What is CDC's role in food safety? **Centro de Controle e Prevenção de Doenças**, 2016.

CECCARELLI, D. et al. Chromosome-Based blaOXA-48-Like Variants in *Shewanella* Species Isolates from Food-Producing Animals, Fish, and the Aquatic Environment. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 2, p. e01013-16, 1 fev. 2017.

CLSI. M02-A12 Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard— Twelfth Edition. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2015.

CLSI. M 100 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2017.

COUGHLAN, L. M. et al. Biotechnological applications of functional metagenomics in

the food and pharmaceutical industries. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 672, 2015.

D' COSTA, V. M. Sampling the Antibiotic Resistome. **Science**, v. 311, n. 5759, p. 374–377, 20 jan. 2006.

DALLENNE, C. 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, 1 mar. 2010.

DE MOURA PINTO, F. et al. Prevalência de carbapenemases em enterobactérias resistentes a carbapenêmicos em quatro hospitais terciários de Porto Alegre Prevalence of carbapenemases in carbapenem-resistant enterobacteriaceae in four tertiary care hospitals in Porto Alegre. **Artigo Original Clin Biomed Res Clin Biomed Res**, v. 473434, n. 11, p. 47–52, 2014.

DE OLIVEIRA PINTO, C. L. et al. Identificação de bactérias psicrotóxicas proteolíticas isoladas de leite cru refrigerado e caracterização do seu potencial deteriorador. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 70, n. 2, p. 105, 3 set. 2015.

DECIMO, M.; SILVETTI, T.; BRASCA, M. Antibiotic Resistance Patterns of Gram-Negative Psychrotrophic Bacteria from Bulk Tank Milk. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 4, p. M944–M951, 2016.

DEL COLLO, L. P. et al. Prevalence, antimicrobial resistance, and molecular characterization of *Campylobacter* spp. in bulk tank milk and milk filters from US dairies. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 5, p. 3470–3479, 2017.

DENG, Y. F. et al. Influence of dairy by-product waste milk on the microbiomes of different gastrointestinal tract components in pre-weaned dairy calves. **Scientific Reports**, v. 7, n. March, p. 1–13, 2017.

DENISUIK, A. J. et al. Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-, AmpC β -lactamase- and carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Canadian hospitals over a 5 year period: CANWARD 2007-11. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. suppl 1, p. i57–i65, 1 maio 2013.

DEWAAL, C. S. et al. **Antibiotic Resistance in Foodborne Pathogens: Evidence of the Need for a Risk Management Strategy**. [s.l.] Center for Science in the Public Interest, 2013.

DIAB, M. et al. OXA-48 and CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamases in raw milk in Lebanon: epidemic spread of dominant *Klebsiella pneumoniae* clones. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 11, p. 1688–1691, 1 nov. 2017.

DOYLE, M. P. et al. Antimicrobial Resistance: Challenges and Perspectives.

Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, v. 12, n. 2, p. 234–248, 1 mar. 2013.

EFSA. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. **EFSA Journal**, v. 10(3), n. 1003, p. 2597, 2014.

EFSA. ECDC, EFSA and EMA Joint Scientific Opinion on a list of outcome indicators as regards surveillance of antimicrobial resistance and antimicrobial consumption in humans and food-producing animals. **EFSA Journal**, v. 15, n. 10, 1 out. 2017.

EISENBERGER, D. et al. Molecular Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates from Milk Samples of Dairy Cows with Mastitis in Bavaria, Germany. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 0, n. 0, p. mdr.2017.0182, 27 set. 2017.

EMATER. **Guia técnico para a implantação de boas práticas de fabricação em unidades de produção do queijo minas artesanal**. [s.l.] EMATER, 2009.

ESCOBAR-ZEPEDA, A.; SANCHEZ-FLORES, A.; QUIRASCO BARUCH, M. Metagenomic analysis of a Mexican ripened cheese reveals a unique complex microbiota. **Food Microbiology**, v. 57, p. 116–127, 1 ago. 2016.

EVANS, B. A.; AMYES, S. G. B. OXA β -lactamases. **Clinical microbiology reviews**, v. 27, n. 2, p. 241–63, 1 abr. 2014.

FALAGAS, M. E.; SIAKAVELLAS, E. Bacteroides, Prevotella, and Porphyromonas species: A review of antibiotic resistance and therapeutic options. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 15, n. 1, p. 1–9, 2000.

FAO. O Estado da Segurança Alimentar e Nutricional no Brasil. Um Retrato Multidimensional. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**, set. 2014.

FAO. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2016-2025**. [s.l.] OECD Publishing, 2016. v. 18

FERREIRA, J. C. et al. IncII/ST113 and IncII/ST114 conjugative plasmids carrying blaCTX-M-8 in *Escherichia coli* isolated from poultry in Brazil. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 80, n. 4, p. 304–6, dez. 2014.

FONTES, C. O. et al. Prevalence, Antimicrobial Resistance, and Virulence Characteristics of mecA-Encoding Coagulase-Negative Staphylococci Isolated from Soft Cheese in Brazil. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 4, p. 594–599, 2013.

FRANCO, B. G. DE M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. [s.l.] Atheneu,

2008.

FURLANETO-MAIA, L. et al. Antimicrobial Resistance in Enterococcus sp Isolated from Soft Cheese in Southern Brazil. **Advances in Microbiology**, v. 4, n. February, p. 175–181, 2014.

GERMANO, P. M.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos**. [s.l.] Manole, 2015.

GESER, N.; STEPHAN, R.; HÄCHLER, H. Occurrence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk. **BMC Veterinary Research**, v. 8, n. 1, p. 21, 7 mar. 2012.

GHATAK, S. et al. Detection of New Delhi Metallo-beta-Lactamase and Extended-Spectrum beta-Lactamase Genes in Escherichia coli Isolated from Mastitic Milk Samples. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 60, n. 5, p. 385–389, 1 out. 2013.

GILLINGS, M. R. Integrons: past, present, and future. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 78, n. 2, p. 257–77, 1 jun. 2014.

GILLINGS, M. R. Class 1 integrons as invasive species. **Current Opinion in Microbiology**, v. 38, p. 10–15, 2017.

GUILLAUME, G. 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, 1 abr. 2000.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. DA S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667–679, 2010.

HACHIYA, J. DE O. et al. Methicillin-resistant Staphylococcus spp. isolated from curd cheese “requeijão” and “especialidade láctea type requeijão” sold in Brazil. **Ciência Rural**, v. 47, n. 7, 2017.

HAMMAD, A. M.; HASSAN, H. A.; SHIMAMOTO, T. Prevalence, antibiotic resistance and virulence of Enterococcus spp. in Egyptian fresh raw milk cheese. **Food Control**, v. 50, p. 815–820, abr. 2015.

HAMMAD, A. M.; ISHIDA, Y.; SHIMAMOTO, T. 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, 30 mar. 2009.

HANSEN, K. C. M. et al. Antimicrobial resistance in the Bacteroides fragilis group in

faecal samples from patients receiving broad-spectrum antibiotics. **Anaerobe**, v. 47, p. 79–85, 1 out. 2017.

HARAGUCHI, T. Antibióticos: classificação geral. **RBM Revista Brasileira de Medicina**, 2000.

HIMEDIA. **HiMedia-Technical Data GN Broth**, 2011. Disponível em: <<http://himedialabs.com/TD/M242.pdf>>. Acesso em: 9 jan. 2018

HO, P. L. et al. Extensive dissemination of CTX-M-producing *Escherichia coli* with multidrug resistance to “critically important” antibiotics among food animals in Hong Kong, 2008-10. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 66, n. 4, p. 765–8, abr. 2011.

HUNGARO, H. M. et al. Low contamination of *Campylobacter* spp. on chicken carcasses in Minas Gerais state, Brazil: Molecular characterization and antimicrobial resistance. **Food Control**, v. 51, p. 15–22, 2015.

IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, p. 130, 2010.

IBGE. **Produção Pecuária Municipal**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2016_v44_br.pdf>. Acesso em: 3 jan. 2018.

IBRAHIM, H. M. M. et al. Distribution of Multidrug-Resistant Gram Negative Bacteria Causing Clinical Mastitis in Dairy Cows. **Global Veterinaria**, v. 15, n. 3, p. 268–277, 2015.

JONES-DIAS, D. et al. Architecture of Class 1, 2, and 3 Integrons from Gram Negative Bacteria Recovered among Fruits and Vegetables. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 13 set. 2016.

KARUNIAWATI, A.; SAHARMAN, Y.; LESTARI, D. Detection of Carbapenemase Encoding Genes in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* Isolated from Patients at Intensive Care Unit Cipto Mangunkusumo Hospital in 2011. **Acta medica Indonesiana**, v. 45, p. 101–106, 2013.

KASPER, D.; FAUCI, A. **Doenças Infecciosas de Harrison**. [s.l.] AMGH Editora, 2015.

KASPER, D. L. et al. **Manual de Medicina de Harrison**. [s.l.: s.n.].

KHALIFA, H. O. et al. High Carbapenem Resistance in Clinical Gram-Negative Pathogens Isolated in Egypt. **Microbial Drug Resistance**, v. 23, n. 7, p. 838–844, 1 out. 2017.

KHOSHBAKHT, R.; SHAHED, A.; ASKI, H. S. Characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from dairy products. **Journal of**

Microbiology, Biotechnology and Food Sciences, v. 3, n. 4, p. 333–336, 2014.

LANGILLE, M. G. I. et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. **Nature Biotechnology**, v. 31, n. 9, p. 814–821, 25 set. 2013.

LANZ, R.; KUHNERT, P.; BOERLIN, P. 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, 2 jan. 2003.

LIN, J. et al. Mechanisms of antibiotic resistance. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 34, 2015.

LIU, H. et al. The prevalence of *Escherichia coli* strains with extended spectrum beta-lactamases isolated in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 335, 21 abr. 2015.

LIU, Y.-Y. 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, fev. 2016.

LOOT, C. et al. Differences in Integron Cassette Excision Dynamics Shape a Trade-Off between Evolvability and Genetic Capacitance. **mBio**, v. 8, n. 2, p. e02296-16, 28 mar. 2017.

LÜBBERT, C. et al. Environmental pollution with antimicrobial agents from bulk drug manufacturing industries in Hyderabad, South India, is associated with dissemination of extended-spectrum beta-lactamase and carbapenemase-producing pathogens. **Infection**, v. 45, n. 4, p. 479–491, 26 ago. 2017.

MAIRI, A. et al. OXA-48-like carbapenemases producing Enterobacteriaceae in different niches. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, p. 1–18, 8 out. 2017.

MAŁKA, Ł. et al. Occurrence and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. isolated from food other than meat in Poland. **Annals of agricultural and environmental medicine: AAEM**, v. 22, n. 3, p. 403–8, 2015.

MAPAMA. Informe de zoonosis y resistencias antimicrobianas. **MAPAMA**, 2015.

MAROSEVIC, D.; KAEVSKA, M.; JAGLIC, Z. Resistance to the tetracyclines and macrolide-lincosamide-streptogramin group of antibiotics and its genetic linkage – a review. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 24, n. 2, p. 338–344, 12 jun. 2017.

MARRERO-ORTIZ, R. et al. Genetic characterization of antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars isolated from dairy cattle in Wisconsin. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 962–967, 1 mar. 2012.

MARTINI, C. L. et al. Characterisation of penicillin and tetracycline resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk samples in Minas Gerais, Brazil. **Journal of Dairy Research**, v. 84, n. 2, p. 202–205, 14 maio 2017.

MOKHTARI, A. R. et al. ISOLATION PSEUDOMONAS AERUGINOSA BACTERIA AND GENES INTEGRON CLASS I OF SUBCLINICAL MASTITIS IN DAIRY COWS IN TEHRAN **VETERINARY RESEARCHES BIOLOGICAL PRODUCTS (PAJOUHESH-VA-SAZANDEGI)**, , 1 jan. 2016. Disponível em:

<<http://www.sid.ir/En/Journal/ViewPaper.aspx?ID=547867>>. Acesso em: 5 fev. 2018

MOLLENKOPF, D. F. et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae recovered from the environment of a swine farrow-to-finish operation in the United States.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 61, n. 2, 2017.

MOMTAZ, H. et al. Molecular characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ruminant and donkey raw milk samples and traditional dairy products in Iran.

TheScientificWorldJournal, v. 2012, p. 231342, 2012.

MONSTEIN, H.-J. et al. Multiplex PCR amplification assay for the detection of bla SHV, bla TEM and bla CTX-M genes in Enterobacteriaceae. **APMIS**, v. 115, n. 12, p. 1400–1408, 1 dez. 2007.

MOON, J. H.; KIM, M.; LEE, J. H. Genome sequence of *Prevotella intermedia* SUNY aB G8-9K-3, a biofilm forming strain with drug-resistance. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 5–6, 2017.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. [s.l.] Elsevier Brasil, 2015.

NAVAJAS-BENITO, E. V. et al. Molecular characterization of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains from a dairy cattle farm and its surroundings. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 1, p. 362–365, 1 jan. 2017.

NEILL, J. O. '. **Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations The Review on Antimicrobial Resistance Chaired**. [s.l.: s.n.]. Disponível em:

<[https://amr-review.org/sites/default/files/AMR Review Paper - Tackling a crisis for the health and wealth of nations_1.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf)>. Acesso em: 8 jan. 2018.

OECD. **G20 Health Ministers' Meeting: Fighting Antimicrobial Resistance -OECD**. Disponível em: <<http://www.oecd.org/g20/summits/hamburg/g20-health-ministers-meeting-fighting-antimicrobial-resistance.htm>>. Acesso em: 6 fev. 2018.

OJER-USOZ, E.; GONZÁLEZ, D.; VITAS, A. I. Clonal Diversity of ESBL-Producing

Escherichia coli Isolated from Environmental, Human and Food Samples. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 7, p. 676, 23 jun. 2017.

OJO, O. E.; SCHWARZ, S.; MICHAEL, G. B. Detection and characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli from chicken production chains in Nigeria. **Veterinary microbiology**, v. 194, p. 62–68, 15 out. 2016.

OLTRAMARI, K. et al. Genetic heterogeneity of Escherichia coli isolated from pasteurized milk in State of Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 2, p. 337–343, 2014.

OMBARAK, R. A. 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, 11 fev. 2018.

OPAS. Plano Estratégico da Organização Pan-Americana da Saúde 2014-2019. **Organização Pan-Americana da Saúde; Organização Mundial da Saúde**, p. 1–159, 2014.

OPAS. **Do Campo à mesa obtendo alimentos seguros**. Disponível em: <http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=4811:dia-mundial-da-saude-7-de-abril&Itemid=875>. Acesso em: 7 jan. 2018.

ORDÓÑEZ, J. A. **Tecnologia de Alimentos**. [s.l.] Artmed, 2005.

OSSWALD, W.; ESTEVES, A. V. **Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas: manual de farmacologia e farmacoterapia**. [s.l.] Porto Editora, 2001.

PAGANO, M. et al. Prevalência de carbapenemases em Enterobactérias isoladas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. **Clin Biomed Res**, v. 36, 2016.

PEXARA, A. et al. Occurrence and antibiotic resistance of enterotoxigenic Staphylococcus aureus in raw ovine and caprine milk in Greece. **Dairy Science & Technology**, v. 96, n. 3, p. 345–357, 1 mar. 2016.

POIREL, L. et al. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in Klebsiella pneumoniae. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 15–22, 1 jan. 2004.

POIREL, L. et al. Detection of NDM-1-producing Klebsiella pneumoniae in Kenya. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 934–6, 1 fev. 2011a.

POIREL, L. et al. Detection of NDM-1-Producing Klebsiella pneumoniae in Kenya. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 934–936, 1 fev. 2011b.

POIREL, L. et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes.

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, v. 70, n. 1, p. 119–123, 1 maio 2011c.

POIREL, L.; POTRON, A.; NORDMANN, P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 67, n. 7, p. 1597–606, jul. 2012.

PREZOTTO, L. L. Manual de Orientações sobre Constituição de Serviços de Inspeção Municipal (SIM). **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, p. 136, 2013.

RADICE, M. et al. Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 2, p. 602–4, fev. 2002.

RANDALL, C. P. et al. The target of daptomycin is absent from *Escherichia coli* and other gram-negative pathogens. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 637–9, 1 jan. 2013.

RIBEIRO, M. G. et al. Microrganismos patogênicos, celularidade e resíduos de antimicrobianos no leite bovino produzido no sistema orgânico. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 52–58, jan. 2009.

ROCHA, F. R.; PINTO, V. P. T.; BARBOSA, F. C. B. The Spread of CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases in Brazil: A Systematic Review. **Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)**, v. 22, n. 4, p. 301–11, jun. 2016.

RODRÍGUEZ-LÁZARO, D. et al. Identification and molecular characterization of pathogenic bacteria in foods confiscated from non-EU flights passengers at one Spanish airport. **International Journal of Food Microbiology**, v. 209, p. 20–25, set. 2015.

SCHERER, J. D. S.; CALVETTI, R. A. Descrição de casos de Enterobactérias Produtoras de Carbapenemases subtipos Oxa-48 e NDM em hospital público de Porto Alegre. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 7, n. 2, p. 79–84, 8 maio 2017.

SHI, K. et al. Prospects for circumventing aminoglycoside kinase mediated antibiotic resistance. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, p. 22, 2013.

SHOMA, S. et al. Characterization of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* from Australia carrying blaNDM-1. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 1, p. 93–97, 1 jan. 2014.

SILVA, F. T. **Queijo Minas Frescal**. [s.l.: s.n.]. v. 21

SILVA, C. O. DA et al. **Segurança Alimentar e Nutricional**. [s.l.: s.n.].

SUNDE, M. et al. Integron, Plasmid and Host Strain Characteristics of *Escherichia coli* from Humans and Food Included in the Norwegian Antimicrobial Resistance Monitoring Programs. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0128797, 5 jun. 2015.

TACCONE, F. S.; LAUPLAND, K. B.; MONTRAVERS, P. Continuous infusion of β -

lactam antibiotics for all critically ill patients? **Intensive Care Medicine**, v. 42, n. 10, p. 1604–1606, 29 out. 2016.

TANG, K. L. et al. Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Planetary Health**, v. 1, n. 8, p. e316–e327, 1 nov. 2017.

TIMOFTE, D. et al. Detection and molecular characterization of Escherichia coli CTX-M-15 and Klebsiella pneumoniae SHV-12 β -lactamases from bovine mastitis isolates in the United Kingdom. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 2, p. 789–94, 1 fev. 2014.

TORSVIK, V.; GOKSØYR, J.; DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil bacteria. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, n. 3, p. 782–7, 1 mar. 1990.

TSUCHIDO, T.; TAKANO, M. Sensitization by heat treatment of Escherichia coli K-12 cells to hydrophobic antibacterial compounds. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 32, n. 11, p. 1680–3, 1 nov. 1988.

VAN DER BIJ, A. K.; PITOUT, J. D. D. The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 9, p. 2090–2100, 1 set. 2012.

VAN SCHAİK, W. The human gut resistome. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 370, n. 1670, p. 20140087, 5 jun. 2015.

VICENSKI, P. P.; ALBERTI, P.; DO AMARAL, D. J. C. Dietary recommendations for immunosuppressed patients of 17 hematopoietic stem cell transplantation centers in Brazil. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 34, n. 2, p. 86–93, 2012.

VIEIRA, V. A. et al. Práticas de uso de antimicrobianos em rebanhos bovinos de unidades de agricultura familiar no Norte de Minas Gerais. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 8, n. 1, p. 8–15, 2016.

VOHA, C. et al. Genetic and biochemical characterization of FUS-1 (OXA-85), a narrow-spectrum class D beta-lactamase from Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2673–9, 1 ago. 2006.

WHO. The evolving threat of antimicrobial resistance: Options for action. **WHO Publications**, p. 1–119, 2012.

WHO. Antimicrobial resistance. Global Report on Surveillance. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 61, n. 3, p. 383–94, 2014.

WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. **World Health Organization**, 2017a.

WHO. Implementation of the Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. **World Health Organization**, n. 30, p. 4–7, 2017b.

WHO. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine. **World Health Organization**, v. 58, n. 12, p. 1–38, dez. 2017c.

WRIGHT, G. D. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Chemical Communications**, v. 47, n. 14, p. 4055, 22 mar. 2011.

XU, G. et al. 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**, v. 6, p. 1103, 2015.

YU, E. W. et al. **Microbial Efflux Pumps: Current Research**. [s.l.] Caister Academic Press, 2013.

YU, T. et al. Characterization and horizontal transfer of class 1 integrons in *Escherichia coli* isolates from cooked meat products. **Journal of infection in developing countries**, v. 10, n. 1, p. 68–73, 31 jan. 2016.

ZANELLA, G. N. et al. Occurrence and antibiotic resistance of coliform bacteria and antimicrobial residues in pasteurized cow's milk from Brazil. **Journal of food protection**, v. 73, n. 9, p. 1684–7, 2010.

ZEIGHAMI, H.; HAGHI, F.; HAJIAHMADI, F. Molecular characterization of integrons in clinical isolates of betalactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Iran. **Journal of Chemotherapy**, v. 27, n. 3, p. 145–151, 27 jun. 2015.