



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO ANIMAL
MESTRADO EM PRODUÇÃO ANIMAL

LAINÉ SIMONE SILVA DE ARAÚJO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE ENTEROBACTERIALES
PRODUTORAS DE ESBL ISOLADAS DE PRODUTOS LÁCTEOS NA REGIÃO
SEMIÁRIDA BRASILEIRA**

MOSSORÓ

2025

LAINÉ SIMONE SILVA DE ARAÚJO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE ENTEROBACTERIAES
PRODUTORAS DE ESBL ISOLADAS DE PRODUTOS LÁCTEOS NA REGIÃO
SEMIÁRIDA BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Linha de Pesquisa: Tecnologia de Produtos de Origem Animal.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cibele dos Santos Borges

Co-orientador: Prof. Dr. Caio Augusto Martins Aires

MOSSORÓ

2025

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

A658c Araújo, Laine Simone Silva de.
Caracterização fenotípica e molecular de
Enterobacterales produtoras de ESBL isoladas de
produtos lácteos na região semiárida brasileira
/ Laine Simone Silva de Araújo. - 2025.
57 f. : il.

Orientadora: Cibele dos Santos Borges.
Coorientador: Caio Augusto Martins Aires.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Produção Animal, 2025.

1. Genes de Resistência. 2. Saúde única. 3.
Resistência a Fármacos Antimicrobianos. I.
Borges, Cibele dos Santos , orient. II. Aires,
Caio Augusto Martins, co-orient. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

LAINÉ SIMONE SILVA DE ARAÚJO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE ENTEROBACTERIAES
PRODUTORAS DE ESBL ISOLADAS DE PRODUTOS LÁCTEOS NA REGIÃO
SEMIÁRIDA BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre em Produção Animal.

Linha de Pesquisa: Tecnologia de Produtos de Origem Animal.

Defendida em: 26 / 02 / 2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Caio Augusto Martins Aires
Presidente

Prof. Dr. Jean Berg Alves da Silva
Membro Interno

Profa. Dra. Sthenia dos Santos Albano Amora
Membro Externo

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por toda a força, resiliência e determinação que desenvolvi durante este período na pós-graduação. Foram muitos desafios e dificuldades, momentos de dúvida e cansaço, mas também momentos de superação e aprendizado. Em cada passo dessa jornada, senti a presença de Deus ao meu lado, renovando minhas forças e me lembrando de que sou capaz de alcançar os objetivos que ele traçou para mim.

Aos meus pais, expresso minha mais profunda gratidão pelo apoio incondicional que sempre me deram. Obrigada por acreditarem em mim, incentivarem meus estudos e estarem ao meu lado em todos os momentos, nunca medindo esforços para me ajudar quando precisei. Seu amor e dedicação foram fundamentais para que eu chegasse até aqui.

Sou imensamente grata pelas amizades que construí durante o programa de pós-graduação, especialmente Bruna e Raquel. Obrigada por estarem ao meu lado nos dias intensos, enfrentando desafios e compartilhando momentos de apoio, companheirismo e incentivo. Nossos lanches da tarde, recheados de risadas e desabafos, trouxeram leveza e criaram memórias que levarei comigo com muito carinho. Foi gratificante dividir essa jornada com vocês.

Agradeço ao professor Dr. Caio Aires pelos valiosos ensinamentos transmitidos, que enriqueceram significativamente minha formação acadêmica. Aos colegas do laboratório LABMIC, minha gratidão pelo ambiente acolhedor, que me fizeram sentir parte de uma verdadeira equipe. Um agradecimento especial aos amigos Sérvulo e Ana Larissa, cuja paciência, dedicação e prontidão em me ajudar nos experimentos foram essenciais para o desenvolvimento do meu trabalho.

Por fim, expresso minha profunda gratidão à Professora Dr. Cibele Borges, cuja compreensão, apoio e incentivo foram fundamentais ao longo da minha trajetória. Sua dedicação em entender e respeitar minhas preferências acadêmicas foi essencial para que eu pudesse me desenvolver na área que tanto gosto, você é uma mulher incrível, cuja força e sabedoria me inspiraram profundamente.

RESUMO

A produção de leite no Brasil é economicamente importante e possui grande relevância nutricional, mas o uso indiscriminado de antibióticos em animais contribui para a emergência de microrganismos resistentes, como Enterobacterales produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) neste produto. Essas enzimas, principalmente das famílias CTX-M, SHV e TEM, conferem resistência a uma ampla gama de antibióticos, representando uma ameaça à saúde pública devido ao potencial de exposição a cepas resistentes por meio do consumo de produtos lácteos. O objetivo do estudo foi analisar as características fenotípicas e moleculares de Enterobacterales produtoras de ESBL isoladas de produtos lácteos na região semiárida brasileira. Entre junho de 2022 e fevereiro de 2024, foram coletadas 70 amostras de produtos lácteos. Após isolamento bacteriano em Ágar MacConkey suplementado com ceftriaxona (4 μ g/mL), os isolados identificados como Enterobacterales através de testes bioquímicos foram submetidos a testes de suscetibilidade antimicrobiana, detecção fenotípica de ESBL e detecção dos genes de resistência *bla*_{CTX-M} (grupos 1, 2, 8 e 9), *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *ant(3'')-Ia*, *aac(3)-Ia*, *ant(2'')-Ia*, *aac(6')-Ib* e *mcr-1* através de PCR. A amplificação por PCR também foi utilizada para confirmar a identificação das espécies *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. Das 70 amostras analisadas, 26 (37%) apresentaram crescimento de Enterobacterales, resultando em 29 isolados: 17 *E. coli*, 11 *Klebsiella* spp. (9 *K. pneumoniae*, 1 *K. aerogenes* e 1 *K. oxytoca*) e 1 *Hafnia* sp.. Entre os isolados, 25 (87%) foram produtores de ESBL, com resistência à ceftriaxona (93%), cefepime (90%), ceftazidima (86%) e cefotaxima (76%) e suscetibilidade aos carbapenêmicos: meropenem (93%) e imipenem (97%). Os genes *bla*_{CTX-M} (79%) e *qnrS* (55%) foram os mais frequentes. Resistência sugestiva à polimixina B foi observada em um isolado. Enterobacterales resistentes a antibióticos foram identificadas em produtos lácteos do semiárido brasileiro, representando um risco à saúde única.

Palavras-chave: Genes de Resistência, Saúde única, Resistência a Fármacos Antimicrobianos

ABSTRACT

Milk production in Brazil is economically significant and has high nutritional relevance. However, the indiscriminate use of antibiotics in animals contributes to the emergence of resistant microorganisms, such as extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Enterobacterales in dairy products. These enzymes, mainly from the CTX-M, SHV, and TEM families, confer resistance to a wide range of antibiotics, posing a public health threat due to the potential exposure to resistant strains through the consumption of dairy products. This study aimed to analyze the phenotypic and molecular characteristics of ESBL-producing Enterobacterales isolated from dairy products in the Brazilian semi-arid region. Between June 2022 and February 2024, 70 dairy product samples were collected. After bacterial isolation on MacConkey agar supplemented with ceftriaxone (4 μ g/mL), isolates identified as Enterobacterales through biochemical tests were subjected to antimicrobial susceptibility testing, phenotypic detection of ESBL, and detection of resistance genes *bla*_{CTX-M} (groups 1, 2, 8 and 9), *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *ant*(3'')-Ia, *aac*(3)-Ia, *ant*(2'')-Ia, *aac*(6')-Ib and *mcr-1* by PCR. PCR amplification was also used to confirm the identification of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* species. Of the 70 samples analyzed, 26 (37%) showed growth of Enterobacterales, resulting in 29 isolates: 17 *E. coli*, 11 *Klebsiella* spp. (9 *K. pneumoniae*, 1 *K. aerogenes*, and 1 *K. oxytoca*), and 1 *Hafnia* sp. Among the isolates, 25 (87%) were ESBL producers, showing resistance to ceftriaxone (93%), cefepime (90%), ceftazidime (86%), and cefotaxime (76%), and susceptibility to carbapenems: meropenem (93%) and imipenem (97%). The most frequent genes were *bla*_{CTX-M} (79%) and *qnrS* (55%). One isolate showed suggestive resistance to polymyxin B. Antibiotic-resistant Enterobacterales were identified in dairy products from the Brazilian semi-arid region, representing a One Health risk.

Keywords: Resistance Genes, One Health, Antimicrobial Drug Resistance

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** – Espécies isoladas pertencentes ao grupo Enterobacterales identificadas em amostras de produtos lácteos obtidos no semiárido brasileiro, no período de junho de 2022 a fevereiro de 2024.....35
- Gráfico 2** – Porcentagem de isolados de Enterobacterales classificados como resistentes e sensíveis aos antibióticos testados, com base nos resultados dos testes de sensibilidade antimicrobiana.....36
- Gráfico 3** – Porcentagem de isolados de *E. coli* e *Klebsiella* spp. resistentes aos antibióticos testados, com base nos resultados dos testes de sensibilidade antimicrobiana.....37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Representação das rotas de transmissão da resistência antimicrobiana entre animais de fazenda, o ambiente mais amplo e os seres humanos.....	25
Figura 2	– Isolamento de Enterobacterales lactose positiva em Ágar MacConkey, com destaque para colônia de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , proveniente de amostras de produtos lácteos coletados no semiárido brasileiro.....	28
Figura 3	– Provas bioquímicas utilizadas para identificação de Enterobacterales isoladas de produtos lácteos oriundos da região semiárida brasileira: Citrato de Simmons (CIT), Sulfeto de Hidrogênio, Indol e Motilidade (SIM), Ferro Tríplice Açúcar (TSI), Lisina Ferro (LIA) e Urease (URE).....	29
Figura 4	– Placa de ágar Mueller-Hinton demonstrando os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos, teste de sinergismo de disco duplo e o teste da gota modificado.....	31
Figura 5	– Ilustração dos procedimentos para extração do DNA, utilizando a técnica de PCR e eletroforese.....	33
Figura 6	– Gel de agarose demonstrando a presença de fragmentos amplificados correspondentes ao gene <i>bla</i> _{CTX-M} . Controles utilizados: positivo (C+) e negativo (C-). Amostras testadas: isolados 1 a 20. L: marcador de peso molecular (ladder), com banda de referência em 544 pb.....	38
Figura 7	– Heatmap ilustrando a presença e ausência dos genes de resistência nas amostras lácteas, obtidas no semiárido brasileiro.....	39
Figura 8	– Diagrama de Venn ilustrando a distribuição dos genes associados à resistência aos antibióticos β -lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos.....	40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Importância nutricional e econômica do leite.....	14
2.2 Contaminação por enterobacterales em produtos lácteos.....	15
2.2.1 Contaminação por antibióticos e cepas multirresistentes em produtos lácteos.....	16
2.3 Resistência bacteriana aos antimicrobianos.....	17
2.3.1 Resistência aos β -lactâmicos	19
2.3.2 Resistência aos aminoglicosídeos.....	21
2.3.3 Resistência às quinolonas.....	22
2.4 Saúde Única (<i>One Health</i>) e resistência aos antimicrobianos.....	24
3 OBJETIVO	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos	26
4 METODOLOGIA.....	27
4.1 Coleta das amostras	27
4.2 Processamento, seleção e armazenamento das amostras.....	27
4.3 Provas bioquímicas para identificação.....	28
4.4 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos	29
4.5 Teste da gota modificado	30
4.6 Teste de sinergismo de disco duplo.....	30
4.7 Extração de ácido desoxirribonucleico (DNA).....	31
4.8 Detecção dos genes de resistência e de identificação de espécies.....	31
5 RESULTADO.....	34
5.1 Enterobacterales identificadas nas amostras de produtos lácteos.....	34
5.2 Identificação dos isolados.....	34
5.3 Perfil de resistência antimicrobiana e produção fenotípica de β -Lactamases	35

5.4 Detecção de genes de resistência antimicrobiana.....	37
6 DISCUSSÃO.....	41
7 CONCLUSÃO.....	44
REFERÊNCIAS.....	45

INTRODUÇÃO

A resistência antimicrobiana (RAM) é um problema crescente e exige uma compreensão aprofundada de suas origens e vias de transmissão. As Enterobacterales produtoras de β -lactamase do espectro estendido (ESBL) são cepas que se destacam devido ao seu crescente potencial de RAM, limitando as opções terapêuticas disponíveis (Cassini *et al.*, 2019). As ESBLs são enzimas produzidas por bactérias que conferem resistência à maioria dos antibióticos β -lactâmicos, estão associadas a outros mecanismos de resistência (Peirano *et al.*, 2019) e têm sido constantemente relatadas na saúde pública, afetando o meio hospitalar e a comunidade (Kurittu *et al.*, 2021).

O leite e seus derivados são fundamentais na alimentação humana, sendo ricos em proteínas, minerais, vitaminas e fornecem aminoácidos essenciais para a síntese de proteínas vitais. Além de seu valor nutricional, evidências crescentes indicam que o leite pode melhorar a qualidade da dieta, controlar o apetite, auxiliar na hidratação e até influenciar a função cognitiva (Rumbold *et al.*, 2021).

Contudo, a qualidade do leite pode ser afetada por diversos fatores que podem aumentar a contaminação por cepas bacterianas multirresistentes, dentre esses fatores pode-se incluir: o uso excessivo e inadequado de antimicrobianos na bovinocultura, o manuseio incorreto e as condições sanitárias precárias durante a produção, armazenamento, transporte e comercialização (Akinyemi *et al.*, 2021). Os produtos lácteos contaminados resultam em perdas financeiras significativas para as indústrias devido ao descarte do leite impróprio para consumo (Du *et al.*, 2020).

Estudos realizados na última década têm mostrado que bactérias produtoras de ESBL, especialmente *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* são frequentemente encontradas em animais e alimentos (Ahmed *et al.*, 2021). Esses estudos também indicam que o uso de antibióticos em animais de criação podem aumentar a incidência dessas cepas nos produtos de origem animal (Silva *et al.*, 2020).

A contaminação dos produtos lácteos e seus derivados por cepas ESBL torna-se algo preocupante no âmbito da saúde pública, viabilizando o aumento da RAM e o risco aos consumidores finais. A cadeia de produção está altamente associada aos padrões de segurança e qualidade dos alimentos de origem láctea, sendo que a falha pode estar associada aos cuidados com a sanidade animal, higiene ambiental, biossegurança, manipulação e armazenamento. O aumento crescente do perfil de resistência dessas cepas é um alerta para

implementação de medidas eficazes de controle de qualidade (Al-Shuwaili, M & Khudhir, Z., 2022).

A bovinocultura de leite é uma das mais importantes atividades presentes no semiárido brasileiro, pois, além de englobar fatores culturais, contribui significativamente para a economia local, gerando emprego e renda (Paes *et al.*, 2023). De acordo com Conrado et al. (2019), a pecuária tem se tornado essencial nessas áreas, devido à sua maior flexibilidade produtiva e resistência a períodos de seca, especialmente quando comparada aos sistemas agrícolas, que tendem a ser mais vulneráveis a essas condições adversas.

Neste sentido, surge a necessidade de compreender a ocorrência e o perfil de resistência de Enterobacterales produtoras de ESBL em produtos lácteos, uma vez que esses microrganismos representam uma ameaça à saúde pública devido ao seu potencial de disseminação, o que reduz as opções terapêuticas disponíveis. A contaminação de alimentos por cepas multirresistentes compromete a segurança alimentar e favorece a disseminação da RAM por meio da transferência de genes. Dessa forma, o objetivo do estudo foi realizar a caracterização fenotípica e molecular de Enterobacterales produtoras de ESBL isoladas de produtos lácteos na região semiárida brasileira.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância nutricional e econômica do leite

O leite e seus derivados são amplamente consumidos em todo o mundo devido aos seus benefícios, incluindo o valor nutricional e o sabor. Ele representa uma rica fonte de minerais, vitaminas do complexo B (como B2) e vitaminas lipossolúveis, como A, D e E, além de proteínas de alta qualidade (Scholz-Ahrens *et al.*, 2020). Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) a qualidade nutricional do leite favorece em todas as fases da vida. Durante a infância, o leite contribui para o desenvolvimento físico e estrutural, na adolescência fornece nutrientes indispensáveis ao crescimento saudável, fortalecendo músculos, ossos e o sistema endócrino, e na terceira idade, destaca-se como uma importante fonte de cálcio, essencial para a saúde e a integridade dos ossos (Embrapa, 2021).

Além da sua importância para a nutrição humana, o leite se destaca pelo seu uso como matéria-prima na produção de derivados como manteiga, iogurte e queijos (Araújo, 2020). No cenário global, o Brasil ocupa a terceira posição na produção de leite, com uma produção anual aproximada de 34 bilhões de litros. O setor leiteiro brasileiro é vasto, com mais de 1 milhão de propriedades envolvidas, gerando cerca de 4 milhões de empregos. Quando processado e comercializado, seja em sua forma natural ou como subprodutos, o leite representa um valor de 70,9 bilhões de reais, ficando atrás apenas dos setores de carnes e dos produtos beneficiados de café, chá e cereais (Rocha *et al.*, 2020). De acordo com a Embrapa (2020), em 2020, o valor bruto da produção primária de leite no Brasil atingiu 35 bilhões de reais, posicionando-se como o sétimo produto no ranking dos produtos agropecuários nacionais.

Apesar da importância do leite, sua composição, aliada a fatores intrínsecos, como pH próximo da neutralidade e alta atividade de água, torna este produto um ambiente propício ao crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos (Hooshmand *et al.*, 2019). Esses microrganismos incluem fungos, vírus e, principalmente, bactérias (Brito *et al.*, 2021). Portanto, o leite e seus produtos podem atuar como veículos na transmissão de cepas bacterianas, comprometendo sua qualidade e representando riscos à saúde do consumidor (Garcia *et al.*, 2019).

2.2 Contaminação por Enterobacterales em produtos lácteos

Existem diversos patógenos bacterianos intestinais associados à transmissão por alimentos contaminados, incluindo membros da ordem Enterobacterales. Este é um grupo grande e diversificado de bactérias Gram-negativas, predominantemente encontradas no trato gastrointestinal de animais, embora também sejam relatadas em uma ampla variedade de nichos ecológicos (Janda e Abbott, 2021).

As bactérias dessa ordem servem como organismos indicadores, fornecendo informações sobre a higiene geral dos produtos lácteos, apontando para um alto potencial de deterioração e de provocar doenças de origem alimentar após o consumo (Janecko *et al.*, 2023; Mladenovic *et al.*, 2021). Espécies como *Salmonella enterica* e *E. coli* são amplamente reconhecidas como fontes de contaminação. Além disso, gêneros como *Klebsiella* spp e *Proteus* spp mostram evidências emergentes de transmissão de patologias associadas ao consumo de alimentos contaminados (Davis *et al.*, 2015).

Devido à sua natureza entérica, essa ordem está amplamente disseminada em ambientes agrícolas, o que facilita sua interação com os sistemas alimentares em diversos pontos da cadeia produtiva. O monitoramento dessas bactérias tem permitido identificar padrões relacionados ao tipo de alimento, às regiões geográficas e às espécies prevalentes em cada tipo, desta forma, o monitoramento é crucial para a detecção de patógenos bacterianos, contribuindo também para a identificação de fontes de contaminação e para a definição de pontos críticos de controle na gestão da segurança alimentar e de produção (Harding-Crooks *et al.*, 2024).

Os leite desempenham um papel crucial no transporte de cepas de Enterobacterales produtoras de ESBL (Dantas Palmeira e Ferreira, 2020), facilitando a disseminação de genes de resistência, tanto pela sua microbiota original quanto pela influência que exerce na microbiota do consumidor (Silva *et al.*, 2021). O leite e seus derivados passam por diversas etapas até chegarem ao consumidor e falhas na manutenção da qualidade desses produtos podem resultar em intoxicações e infecções alimentares graves (Şanlıbaba., 2022).

Nesse contexto, o leite atua como um excelente meio para o crescimento e desenvolvimento bacteriano. A contaminação bacteriana no leite constitui 90% de todas as doenças relacionadas aos laticínios e representa uma séria ameaça à saúde humana. A presença de múltiplas mutações e de genes de resistência dos microrganismos do leite potencializa a disseminação da RAM (Nathan *et al.*, 2023).

2.2.1 Contaminação por antibióticos e cepas multirresistentes em produtos lácteos

A indústria láctea é uma atividade socioeconômica importante no Brasil devido ao grande consumo, o que a torna alvo de diversos programas de monitoramento de qualidade (Pesca *et al.*, 2020). Ao longo do tempo o mercado de produção tem como objetivo aumentar a produção dos produtos lácteos e garantir a sua qualidade (Silva *et al.*, 2019).

Para alcançar esse objetivo, é crucial atender aos requisitos e padrões de qualidade em todas as fases do processo de produção, incluindo os requisitos nutricionais do gado, sanidade animal e comercialização final do produto. A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO) recomenda a adoção de práticas rigorosas de higiene, baseada em análises de riscos que incluem a identificação e monitoramento de pontos críticos de controle (OECD/FAO, 2022).

Contudo, é fundamental implementar práticas sustentáveis de produção que assegurem a saúde e o bem-estar dos animais. Outro fator importante é o uso consciente e responsável dos medicamentos veterinários que podem atuar como contaminantes no leite e provocar complicações na saúde do consumidor. Essa contaminação é uma das principais preocupações globais, especialmente devido à presença de resíduos antimicrobianos (WOAH, 2009). O leite pode conter diversos contaminantes, como bactérias patogênicas, além de resíduos de antibióticos, pesticidas e outros compostos químicos (Abebe *et al.*, 2023).

No entanto, o uso excessivo de antimicrobianos pode levar ao desenvolvimento de microrganismos resistentes, especialmente bactérias. Essas bactérias podem ser transmitidas aos seres humanos através do consumo de produtos de origem animal contaminados. Esse fenômeno representa um risco significativo para a saúde humana, pois as infecções causadas por essas cepas resistentes são de difícil tratamento (Wesguerber *et al.*, 2024).

A presença de resíduos de antibióticos interfere diretamente na fabricação de produtos derivados, como: manteigas e cremes, influenciando a deterioração do alimento, provocando odores desagradáveis e inibindo parcialmente as bactérias ácido-láticas utilizadas no processo de fermentação (Stroher *et al.*, 2022). A detecção de antimicrobianos no leite ocorre com frequência tanto no Brasil quanto no exterior (Talma *et al.*, 2019). Um agravante desse problema é que mesmo após tratamentos térmicos como pasteurização, fervura ou esterilização, os resíduos dos antimicrobianos não são eliminados (Ferreira *et al.*, 2012).

O consumo de uma pequena quantidade de resíduos presentes no leite pode contribuir para o desenvolvimento da RAM a longo prazo (Jeena *et al.*, 2020). Os principais antibióticos detectados no leite incluem penicilinas, tetraciclinas, sulfonamidas, cefalosporinas e

estreptomicinas. Além disso, vem sendo relatado que genes de resistência são transferidos entre cepas bacterianas presentes em animais, alimentos e humanos (Argudín *et al.*, 2017).

A RAM tem se tornado uma crescente preocupação para a saúde pública, com as bactérias resistentes a antimicrobianos apresentando um risco significativo, especialmente no setor pecuário. Bactérias resistentes a cefalosporinas de terceira geração e carbapenêmicos, como algumas espécies de Enterobacterales, foram identificadas em várias espécies de animais, incluindo o gado leiteiro (Haulisah *et al.*, 2021).

O leite contaminado com essas bactérias representa uma via potencial de disseminação de bactérias multirresistentes colocando em risco a segurança alimentar e, por conseguinte, a saúde dos consumidores. O risco de contaminação e transmissão de bactérias através do leite e outros produtos de origem animal é uma preocupação crescente, pois as bactérias resistentes têm a capacidade de se propagar rapidamente, o que pode comprometer a eficácia de tratamentos antimicrobianos em humanos e reduzir as opções terapêuticas disponíveis (Gelalcha e Kerro Dego., 2022).

2.3 Resistência bacteriana aos antimicrobianos

Os antimicrobianos são elementos essenciais no sistema de saúde moderno. Desde sua descoberta, esses compostos têm salvado milhões de vidas, aprimorando os resultados clínicos (Huemer *et al.*, 2020). Eles também são amplamente reconhecidos como um dos maiores avanços na medicina humana e veterinária. Contudo, a crescente RAM em ambientes hospitalares e na comunidade tem se tornado uma preocupação significativa para a saúde pública. Estima-se que quase 700.000 mortes humanas por ano sejam atribuídas à falha no tratamento de infecções bacterianas devido à RAM (Iagg., 2020). A situação é ainda mais alarmante na saúde animal, onde mais de 70% dos antimicrobianos vendidos são destinados ao uso em animais de criação (O'Neill., 2016).

As infecções causadas por microrganismos resistentes a antimicrobianos representam uma séria ameaça à saúde humana e animal, uma vez que os antimicrobianos são medicamentos eficazes para combater diferentes tipos de patógenos, como bactérias (antibióticos), fungos (antifúngicos), vírus (antivirais) e parasitas (incluindo antimaláricos) (Ghosh *et al.*, 2019). A resistência ocorre quando esses microrganismos adquirem a capacidade de sobreviver à exposição aos medicamentos que normalmente seriam eficazes em eliminá-los ou inibir seu crescimento (Michael *et al.*, 2021).

As bactérias possuem diversos mecanismos que neutralizam ou reduzem a eficácia dos antibióticos. Os mecanismos de resistência podem ser classificados como intrínsecos ou adquiridos. A resistência intrínseca ocorre quando a cepa possui características genéticas naturais que conferem resistência a determinados antibióticos, essa resistência geralmente está associada a fenótipos e genes já presentes na população bacteriana (Mendonça *et al.*, 2024).

A resistência adquirida, por outro lado, resulta de mutações espontâneas ou da incorporação de material genético exógeno, podendo ocorrer por três mecanismos principais: a) conjugação, que envolve a transferência de material genético, como plasmídeos e transposons, entre bactérias através do contato direto; b) transdução, na qual o DNA é transferido por bacteriófagos, que transportam material genético de uma bactéria para outra; e c) transformação, que consiste na captação de DNA exógeno presente no ambiente, frequentemente oriundo de bactérias mortas ou de fragmentos liberados por outras células (Mendonça *et al.*, 2024).

Entre os principais mecanismos de resistência, destacam-se: a) alteração do sítio de ligação, que envolve modificações do local onde as moléculas do fármaco normalmente se ligam; b) alteração no sistema de transporte celular/porinas, em que as bactérias modificam qualitativa e quantitativamente os canais de entrada de moléculas (incluindo antibióticos), resultando em menor entrada de antibiótico na célula bacteriana; c) os sistemas de bombas de efluxo, que expulsam ativamente as moléculas de antibiótico para o meio extracelular; d) inativação enzimática dos antibióticos, essa ação promove alteração química da estrutura do antibiótico (Peterson e Kaur., 2018).

A resistência aos antibióticos essenciais, como os β -lactâmicos, representa uma grave ameaça à saúde. Embora essa preocupação tenha sido historicamente limitada a ambientes hospitalares, a detecção de Enterobacterales resistentes em contextos comunitários destaca a necessidade de adotar uma abordagem em saúde única - do inglês “*One Health*”. Esse conceito reconhece a interação entre saúde humana, animal e ambiental, incluindo a segurança alimentar, como um aspecto crucial no enfrentamento dessa ameaça (McEwen & Collignon., 2018).

A disseminação global de bactérias multirresistentes (MDR) tem como um dos principais fatores a presença de elementos genéticos móveis, os plasmídeos, que possibilitam a coexistência de genes de resistência a diferentes classes de antimicrobianos em uma mesma estrutura genética, a qual pode ser transferida entre bactérias (Baquero *et al.*, 2019). O

processo de conjugação é o mecanismo mais impactante na transferência horizontal de genes, tanto de resistência quanto de virulência, especialmente nos membros da ordem Enterobacterales (Pinilla-Redondo *et al.*, 2018). Isso resulta no surgimento de "super patógenos", que infectam o setor clínico humano, animais domésticos e selvagens, além de estarem presentes em alimentos e no meio ambiente (Yang *et al.*, 2021).

2.3.1 Resistência aos β -lactâmicos

Os β -lactâmicos são fármacos amplamente utilizados no tratamento de infecções clínicas, mas sua eficácia tem diminuído progressivamente ao longo do tempo. Os principais agentes β -lactâmicos pertencem a quatro grandes classes químicas: penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos (Bush e Bradford., 2020). Entre os mecanismos de resistência a essa classe de antibióticos estão: a) produção de beta-lactamases, enzimas que irão inativar ou modificar a estrutura do antimicrobiano tornando-o inativo; b) alteração da permeabilidade, bloqueando a penetração do antibiótico; c) alteração do sítio de ação, através da alteração de proteínas e; d) bomba de efluxo, em que o antimicrobiano é retirado do meio intracelular (Arruda *et al.*, 2019).

As penicilinas, primeiros β -lactâmicos, como a amoxicilina combinada com inibidores de β -lactamase, continuam a ser amplamente utilizadas. Sua estrutura é composta por um anel tiazolidina e um anel β -lactâmico, com representantes como penicilina G, V, oxacilina e ampicilina (Lima *et al.*, 2020). Os monobactâmicos, como o aztreonam, atuam contra Gram-negativas e são resistentes a algumas β -lactamases (Bush & Bradford., 2020).

As cefalosporinas, também β -lactâmicos, são classificadas em gerações conforme seu espectro de ação: as de primeira geração (como cefazolina); as de segunda geração (como cefuroxima); as de terceira geração (como ceftriaxona) e a quarta geração (como cefepima) (Bui e Preuss, 2023). Os carbapenêmicos, com amplo espectro de ação, são os β -lactâmicos mais potentes, resistentes a β -lactamases de Gram-negativas e essenciais no tratamento de infecções graves (Bonardi e Pitino., 2019).

Atualmente, as β -lactamases clinicamente relevantes incluem hidrolases de carbapenem (carbapenemases), enzimas AmpC mediadas por plasmídeos e as ESBLs (Yu *et al.*, 2024). As β -lactamases é um dos principais mecanismos de resistência, essas enzimas capazes de inativar esses antimicrobianos e comprometer sua eficácia. Elas agem eliminando a atividade bactericida dos β -lactâmicos, ligando-se ao fármaco e quebrando a ligação amídica do anel de azetidinona de quatro membros presente em todas as moléculas de β -lactâmico (Yu *et al.*, 2024).

As ESBLs, especialmente os tipos TEM, SHV e CTX-M, possuem a capacidade de hidrolisar penicilinas e cefalosporinas, conferindo um amplo espectro de resistência. O uso generalizado das cefalosporinas de terceira geração tem favorecido a disseminação das CTX-M, que acabaram substituindo as variantes TEM e SHV, tornando-se as mais prevalentes (Castanheira *et al.*, 2021). Dentro desse grupo, a primeira enzima identificada foi a CTX-M-1, originada de *Kluyvera* spp. Essa enzima apresenta uma alta taxa de hidrólise da cefotaxima, mas exerce pouca ação sobre a ceftazidima (Bevan *et al.*, 2017).

As CTX-M compreendem mais de 220 enzimas, que são agrupadas em cinco subfamílias com base na identidade de seus aminoácidos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25. As subfamílias CTX-M-1 e CTX-M-9 são as mais disseminadas e comumente encontradas em cepas de Enterobacterales em várias regiões do mundo. Entre as variantes genéticas, o gene *blaCTX-M-15* (da subfamília CTX-M-1) é o mais amplamente distribuído, enquanto o gene *blaCTX-M-14* (da subfamília CTX-M-9) é predominante em várias partes da Ásia, incluindo China, Japão e Coreia do Sul (Peirano e Pitout., 2019).

A nomenclatura das β -lactamases é baseada em dois atributos principais das enzimas de relevância fisiológica: estrutura e função. A classificação estrutural é a mais utilizada e foi proposta por Ambler em 1980, que se baseou nas quatro sequências de aminoácidos de β -lactamases conhecidas na época para estabelecer as classes dessas enzimas. A classe A inclui enzimas que possuem uma serina no sítio ativo, enquanto a classe B é formada pelas metalo- β -lactamases (MBLs), que necessitam de íons de zinco para sua atividade catalítica. Desde então, outras classes de β -lactamases serina-dependentes, como as classes C e D, foram descritas com base em características como tamanho molecular e motivos homólogos específicos nas sequências de aminoácidos (Bush., 2023).

As ESBLs são enzimas que mostram resistência à maioria dos antibióticos β -lactâmicos, são frequentemente observadas em combinação com outros mecanismos de resistência, ocasionando uma multirresistência. Essa resistência vem sendo constantemente relatada na saúde pública, tanto no meio hospitalar, na comunidade, no meio ambiente e também nos alimentos (Kurittu *et al.*, 2021). Isso torna o tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras de ESBL ainda mais desafiador, pois a presença dessas enzimas agrava o problema da RAM, restringindo significativamente as opções terapêuticas disponíveis (Tseng *et al.*, 2023).

Algumas mutações acontecem em genes bacterianos que permitem o aumento de ESBL. Esses genes atualmente já estão disseminados por todo o mundo e podem estar localizados em plasmídeos bacterianos. A capacidade de produção de ESBL pode ser transferida através do material genético por conjugação e também por transformação bacteriana, sendo transmitida de uma bactéria para a outra (Van *et al.*, 2020).

2.3.2 Resistência aos aminoglicosídeos

O primeiro representante dos aminoglicosídeos, é a estreptomicina que foi obtida a partir de *Streptomyces griseus* e demonstrou grande eficácia no tratamento da tuberculose, além de infecções causadas por bactérias Gram-negativas. Contudo, o uso clínico dos aminoglicosídeos é limitado pelos seus efeitos colaterais, principalmente a nefrotoxicidade e a ototoxicidade. Essas complicações ocorrem em proporções variáveis, geralmente entre 3% e 15% dos casos, embora a incidência exata depende de fatores como o perfil do paciente e o tipo de infecção tratada (Foster; Tekin., 2016).

O uso de aminoglicosídeos diminuiu com a introdução de novos tratamentos, com a classe das fluoroquinolonas e cefalosporinas. No entanto, esses antibióticos estão voltando a ganhar interesse devido ao seu amplo espectro de eficácia e ao desenvolvimento de derivados semissintéticos (Serio *et al.*, 2018). Os aminoglicosídeos são classificados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma classe criticamente importante de antimicrobianos (WHO, 2018), especialmente com a chegada do plazomicina, o mais recente representante do grupo aprovado nos Estados Unidos (2018) desde a amicacina, em 1981. O plazomicina apresenta atividade contra Enterobacterales multirresistentes (MDR), incluindo aquelas produtoras de carbapenemases (Eljaaly *et al.*, 2019).

Os mecanismos gerais de resistência aos aminoglicosídeos incluem a produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs), alterações nos sítios-alvo, redução da

permeabilidade, ação de bombas de efluxo e metilação do RNA ribossômico 16S (Wachino *et al.*, 2020). As AMEs são classificadas em três grupos conforme as modificações: acetiltransferases (AACs), fosfotransferases (APHs), nucleotidiltransferases (ANTs ou AADs). Essas enzimas estão frequentemente associadas a elementos transponíveis, como transposons e plasmídeos, que possibilitam a transferência horizontal de resistência entre bactérias (Garneau e Labby., 2016).

2.3.3 Resistência às quinolonas

As quinolonas são agentes antimicrobianos sintéticos amplamente utilizados na medicina em todo o mundo. A primeira quinolona, o ácido nalidíxico, foi descoberta em 1962 e tornou-se o único antibiótico disponível para o tratamento de infecções do trato urinário (Popiołek., 2015). Posteriormente, a introdução de um átomo de flúor na posição 6 e a substituição do anel principal na posição 7 da molécula de quinolona foram fundamentais para o desenvolvimento das fluoroquinolonas (FQs), uma nova geração de antibióticos com um espectro de atividade mais amplo. As FQs demonstraram eficácia contra uma vasta gama de bactérias patogênicas Gram-negativas e Gram-positivas (Correia *et al.*, 2017).

As FQs passaram a ser amplamente utilizadas no tratamento de uma variedade de infecções, sendo, portanto, eficazes no tratamento de infecções do trato respiratório, doenças sexualmente transmissíveis, infecções de pele e tecidos moles, além de infecções do trato urinário, ósseas e articulares (Naeem *et al.*, 2016). A ciprofloxacina, uma das FQs mais utilizadas na prática clínica, é especialmente eficaz no tratamento de infecções do trato urinário causadas por bactérias gram-negativas, como Enterobacterales, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *Moraxella catarrhalis*, mas apresenta atividade relativamente menor contra infecções causadas por bactérias Gram-positivas (Bisacchi, 2015).

Após quase 30 anos de uso clínico, a ciprofloxacina é considerada pela OMS um dos melhores antibióticos disponíveis (Conley *et al.*, 2018). As FQs atuam interferindo nas enzimas DNA girase e topoisomerase IV bacterianas, incluindo as proteínas ParC e ParE, levando à inibição da síntese de DNA bacteriano (Varughese *et al.*, 2018). No entanto, devido ao uso generalizado das FQs tanto na medicina humana quanto veterinária, a resistência a esses antibióticos aumentou em diversas espécies bacterianas (Seyfi *et al.*, 2019).

Os mecanismos de resistência às FQs são geralmente atribuídos a mutações cromossômicas nos genes alvo, responsáveis pela codificação das enzimas DNA girase e

topoisomerase IV, ou a mutações que resultam na diminuição da acumulação do fármaco, seja por superexpressão de bombas de efluxo ou redução da captação, além da presença de genes de resistência mediada por plasmídeos (PMQR) (Fàbrega *et al.*, 2009).

A PMQR foi identificada em 1998 em um isolado multirresistente de *K. pneumoniae*. Esse isolado apresentava a capacidade de transferir resistência ao ácido nalidíxico, ciprofloxacino e outras quinolonas para várias cepas Gram-negativas (Martínez-Martínez *et al.*, 1998). O gene responsável por essa resistência foi inicialmente denominado *qnr*, e posteriormente renomeado para *qnrA*, à medida que novos alelos do gene foram descobertos. A investigação de um plasmídeo *qnrA* isolado, que conferia resistência mais alta ao ciprofloxacino do que o esperado, levou à descoberta, em 2006, de um segundo mecanismo de PMQR: a modificação de quinolonas por uma acetiltransferase de aminoglicosídeo específica, denominada AAC(6')-Ib-cr (Robicsek *et al.*, 2006).

A descoberta dos genes *qnr* teve início com o sequenciamento do gene *qnrA*, que codifica uma proteína contendo uma repetição de cinco aminoácidos. Com o conhecimento da sequência, foi possível identificar o *qnrA* em diversas bactérias, como *K. pneumoniae*, *E. coli* e *S. enterica*, por meio de PCR. Após a identificação do *qnrA*, outros genes de resistência, como *qnrS*, *qnrB*, *qnrC* e *qnrD*, foram descobertos. Esses genes apresentam sequências semelhantes, mas com diferenças de até 35%. Foram encontrados tanto em plasmídeos quanto no cromossomo de várias bactérias, tanto de fontes clínicas quanto ambientais, o que ampliou a compreensão sobre a resistência a quinolonas (Jacoby *et al.*, 2014).

Na última década, a PMQR foi identificada em isolados bacterianos ao redor do mundo e tem sido frequentemente estudados. Esses genes reduzem a suscetibilidade das bactérias às quinolonas, geralmente sem causar uma resistência total, mas promovendo a seleção de mutantes mais resistentes e aumentando a probabilidade de falhas terapêuticas (Guan *et al.*, 2013). Uma das principais preocupações em relação à resistência às FQs é a sua associação com a produção de ESBL em Enterobacterales (Eyvaziet *et al.*, 2018). Estudos indicam que de um a dois terços das Enterobacterales produtoras de ESBL são resistentes às FQs, o que torna o tratamento de infecções causadas por essas bactérias ainda mais desafiador (Dalhoff, 2012).

2.4 Saúde Única (*One Health*) e resistência aos antimicrobianos

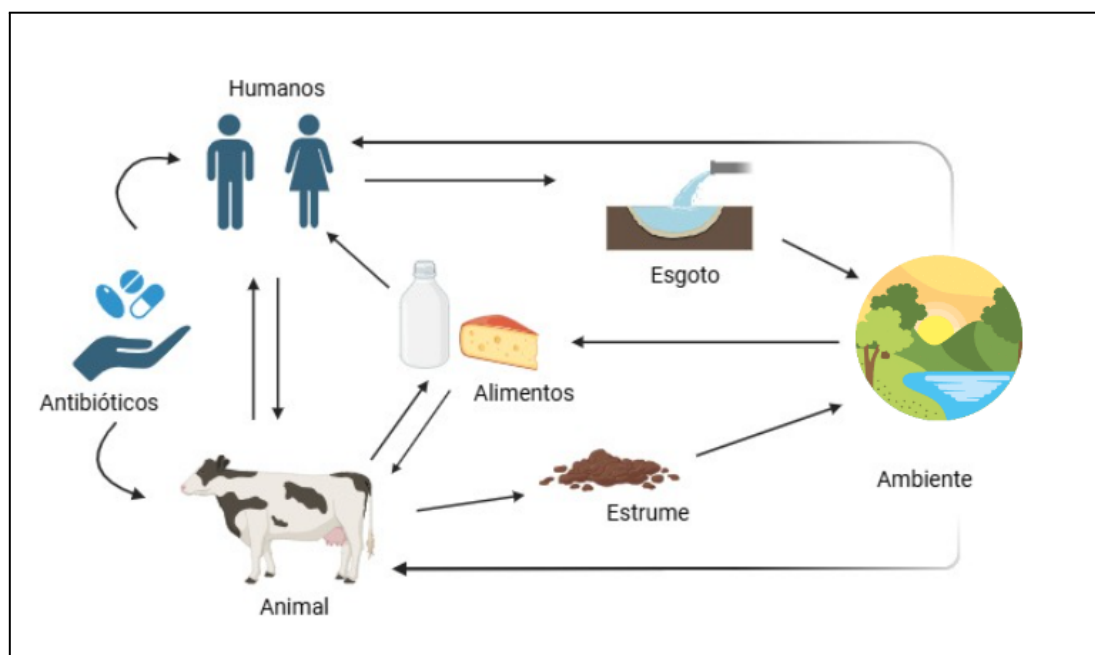
Saúde única é uma abordagem integrada, intersetorial e interdisciplinar, a níveis local, regional, nacional e global, com o objetivo de alcançar resultados ideais de saúde, reconhecendo a interconexão entre pessoas, animais, plantas e o ambiente (CDC., 2019). Entre outras áreas importantes onde este conceito pode ser aplicado, estão a RAM e a segurança de alimentos. O plano de Ação Global contra a Resistência a Antimicrobianos da OMS reconheceu a importância de uma abordagem de Saúde Única no combate à RAM, onde diferentes setores estão envolvidos, entre eles a medicina humana e veterinária, meio ambiente e consumidores (WHO., 2015).

Na América do Sul, assim como em outras regiões do mundo, estudos clínicos em humanos sobre ESBL em *E. coli* são abundantes. No entanto, o crescimento da resistência aos β -lactâmicos em contexto não clínicos, como em matrizes alimentares, animais e no meio ambiente ainda é limitado. Na América do Sul a prevalência de *E. coli* produtora de ESBL nos níveis de animais, alimentar e ambiental é superior a prevalência encontrada em fontes humanas (casos clínicos ou portadores saudáveis). No Brasil o isolamento desse patógeno em amostras clínicas humanas corresponde 1,3% dentre das amostras analisadas, enquanto que essa frequência aumenta para 20,6% em amostras de alimento (Bastidas-Caldes *et al.*, 2022).

Portanto, disseminação da RAM é um problema crescente, intensificado pelo uso excessivo de antimicrobianos. Esse cenário tem favorecido o aumento da transmissão de cepas bacterianas multirresistentes em alimentos de origem animal, comprometendo a segurança alimentar. Outro fator preocupante é o descarte inadequado desses medicamentos, que provocam a contaminação do solo, rede de esgoto e água (Bungau *et al.*, 2021).

Diversos antimicrobianos apresentam baixa taxa de degradação, acumulando-se no ambiente e nos tecidos animais, facilitando a sua entrada na cadeia alimentar. Além disso, o uso das fezes dos animais como fertilizantes, também atua como um potencial vetor de contaminação no solo (Figura 1), sendo capaz de propagar cepas resistentes nos vegetais, aumentando o risco para a saúde pública, segurança alimentar e comunidade (Bungau *et al.*, 2021).

Figura 1. Representação das rotas de transmissão da resistência antimicrobiana entre animais de fazenda, o ambiente mais amplo e os seres humanos.



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

Concentrações baixas e subletais de antibióticos estão constantemente presentes no trato gastrointestinal de animais, o que leva a seleção de genes de RAM, que são liberados no meio ambiente, geralmente por meio de esterco e outros resíduos animais. Diversos estudos demonstram, de fato, que genes são encontrados amplamente nos resíduos de indústrias associadas à pecuária (Ma *et al.*, 2019; Markland *et al.*, 2019).

Diante dessas evidências é essencial a implementação de sistemas eficazes de segurança alimentar e melhorar continuamente a segurança dos alimentos em escala global. Para alcançar esse objetivo, é essencial desenvolver ferramentas rápidas e precisas para a detecção e identificação de patógenos em alimentos. Essas ferramentas tornam o controle preventivo mais eficiente e agilizam a implementação de medidas corretivas rápidas o que, por sua vez, contribui significativamente para o aprimoramento do gerenciamento da segurança alimentar como um todo (Panwar *et al.*, 2022).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Realizar caracterização fenotípica e molecular de Enterobacterales produtoras de ESBL isoladas de produtos lácteos na região semiárida brasileira.

3.2 Objetivos específicos

- Isolar bactérias da ordem Enterobacterales multirresistentes presentes em produtos lácteos;
- Identificar as espécies de Enterobacterales isoladas dos produtos lácteos;
- Avaliar o perfil de resistência a antimicrobianos das cepas isoladas;
- Detectar a presença de genes resistência a antimicrobianos em cepas de Enterobacterales.

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta das amostras

Foram coletadas 70 amostras de produtos lácteos entre junho de 2022 a fevereiro de 2024 a partir do Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal – LIPOA da Universidade Federal Rural do Semi-árido (UFERSA) e na Central de Abastecimento Prefeito Raimundo Soares (COBAL), provenientes do semiárido brasileiro. Entre as amostras estão leite (22), queijo industrial (31), queijo artesanal (7), manteiga da terra (3) e bebidas lácteas (7). Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em caixas térmicas, mantendo sob refrigeração durante o transporte, e direcionadas para análises no Laboratório de Microbiologia Clínica (LABMIC) do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da UFERSA.

4.2 Processamento, seleção e armazenamento das amostras

A seleção de bactérias da ordem Enterobacterales foi realizada de acordo com a metodologia estabelecida por Loeza-Lara *et al.* (2023), com algumas modificações. Inicialmente, 25g das amostras de queijo e manteiga foram diluídas em 225 mL de água peptonada, enquanto 10 mL de leite e bebidas lácteas foram diluídos em 90 mL do mesmo diluente, ou seja, todas as amostras foram diluídas na proporção de 1/10. As amostras foram incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida, 100µL das culturas enriquecidas foram inoculados em placas de ágar MacConkey suplementadas com ceftriaxona (4 µg/mL). As placas foram incubadas a 37°C por mais 24 horas, após esse período, foram observadas colônias de Enterobacterales lactose positivas, apresentando coloração rosa típica da fermentação de lactose no ágar MacConkey, conforme ilustrado na Figura 2.

Quando havia crescimento bacteriano, pelo menos uma colônia morfologicamente distinta era repicada isoladamente com auxílio de alça bacteriológica estéril em meio MacConkey com ceftriaxona (4 µg/mL) e incubadas por 24h a 37°C, para se obter colônias puras. Após a obtenção das culturas puras, estas foram semeadas e incubadas em ágar nutriente por 24h a 37°C, seguido de transferência em triplicata para microtubos de 1,5 ml contendo caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) suplementado com 20% de glicerol, um criopreservador extracelular. Os microtubos contendo os isolados foram acondicionados em caixas apropriadas e armazenados em um ultra-freezer a -80 °C.

Figura 2 - Isolamento de Enterobacterales lactose positiva em Ágar MacConkey, com destaque para colônia de *Klebsiella pneumoniae*, proveniente de amostras de produtos lácteos coletados no semiárido brasileiro.



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

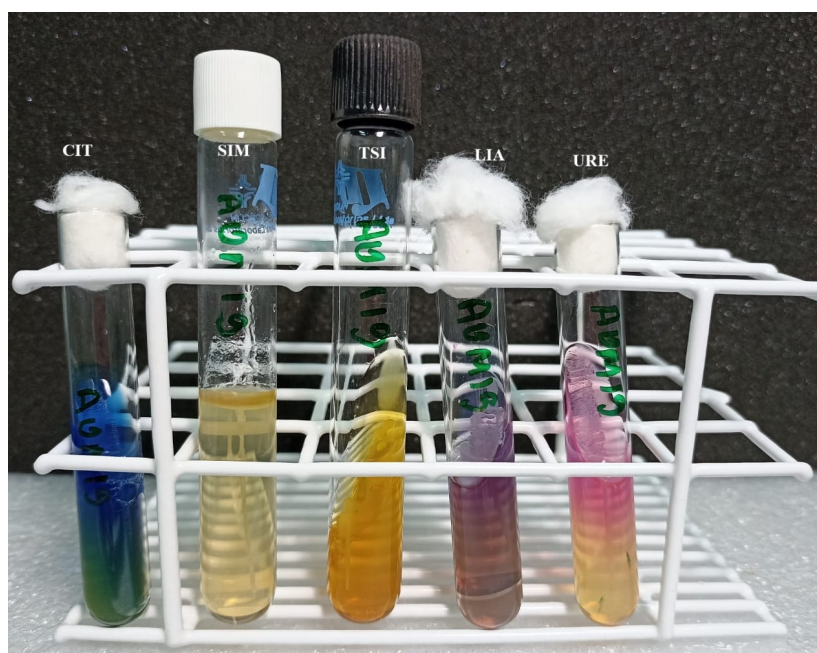
4.3 Provas bioquímicas para identificação de Enterobacterales

As provas bioquímicas foram escolhidas com base nas características dos microrganismos isolados. Uma primeira triagem foi realizada para identificar a ordem Enterobacterales, onde as colônias foram submetidas inicialmente ao teste de Ágar Ferro Triplo Açúcar (TSI) e oxidase. O ágar TSI indica a utilização de carboidratos por via fermentativa, diferenciando de bactérias Gram-negativas não fermentadoras de glicose. Já o teste de oxidase indica a presença da enzima citocromo-oxidase utilizada em vias metabólicas oxidativas, diferenciando Enterobacterales (negativas) de espécies *Aeromonas* sp. (positivas).

Em seguida, os isolados sugestivos dessa ordem foram submetidos a uma identificação mais completa por meio de provas bioquímicas: Ágar Citrato de Simmons (CIT); Ágar Sulfeto de Hidrogênio, Indol e Motilidade (SIM); Ágar Ferro Triplo Açúcar

(TSI); Ágar Lisina Ferro (LIA) e Urease (URE), conforme ilustrado na Figura 3. Esses testes permitiram avaliar as capacidades metabólicas das cepas isoladas, auxiliando na identificação das espécies ou gêneros bacterianos, conforme descrito por Koneman et al. (2008).

Figura 3 - Provas bioquímicas utilizadas para identificação de Enterobacterales isoladas de produtos lácteos oriundos da região semiárida brasileira: Citrato de Simmons (CIT), Sulfeto de Hidrogênio, Indol e Motilidade (SIM), Ferro Tríplice Açúcar (TSI), Lisina Ferro (LIA) e Urease (URE).



Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

4.4 Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Os testes de sensibilidade aos antimicrobianos foram realizados utilizando a metodologia de disco-difusão descrita por Kirby-Bauer (1966), seguindo as atualizações estabelecidas pelo Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (BrCAST, 2023). Os discos de antimicrobianos utilizados no teste foram: amoxicilina (30 µg), cefotaxima (5 µg), ceftriaxona (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefepima (30 µg), cefoxitina (30 µg), meropenem (10 µg), imipenem (10 µg), aztreonam (30 µg), ampicilina (30 µg), ciprofloxacino (5 µg), gentamicina (10 µg) e sulfametoxazol/trimetoprima (25 µg), conforme especificado pelo BrCAST (2023).

Para a realização do teste, foram preparados inóculos padronizados na concentração de 0,5 da escala de McFarland, ajustados visualmente com os isolados de Enterobacterales

em solução salina a 0,85%. Os inóculos foram então semeados pela técnica de espalhamento em placas de ágar Mueller-Hinton utilizando swabs estéreis. Em seguida, os discos de antimicrobianos foram aplicados na superfície do ágar com o auxílio de uma pinça estéril. As placas foram incubadas em estufa a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 16 a 20 horas.

Após o período de incubação, as placas foram analisadas quanto à presença ou ausência de halos de inibição. Os halos formados foram medidos com uma régua milimétrica, e os resultados obtidos foram registrados em uma planilha no Microsoft Word. A partir da comparação dos valores observados com os pontos de corte estabelecidos pelo BrCAST (2023), os isolados foram classificados como suscetíveis, intermediários ou resistentes.

4.5 Teste de gota modificado

A determinação da suscetibilidade presuntiva da polimixina B foi realizada pelo teste de gota modificado traduzido do inglês *modified drop test* (DTM), conforme adaptação do método original descrito por Shinohara et al. (2020). No procedimento, foram utilizados oito discos de 300 UI diluídos em 15 ml de caldo Mueller Hinton II (cátion ajustado) para obter uma solução final de polimixina a $16 \mu\text{g/ml}$. O tubo contendo os discos foram incubados à temperatura ambiente por 1 hora para permitir a eluição do antibiótico antes de prosseguir para a próxima etapa. Após esse período, os discos foram removidos assepticamente.

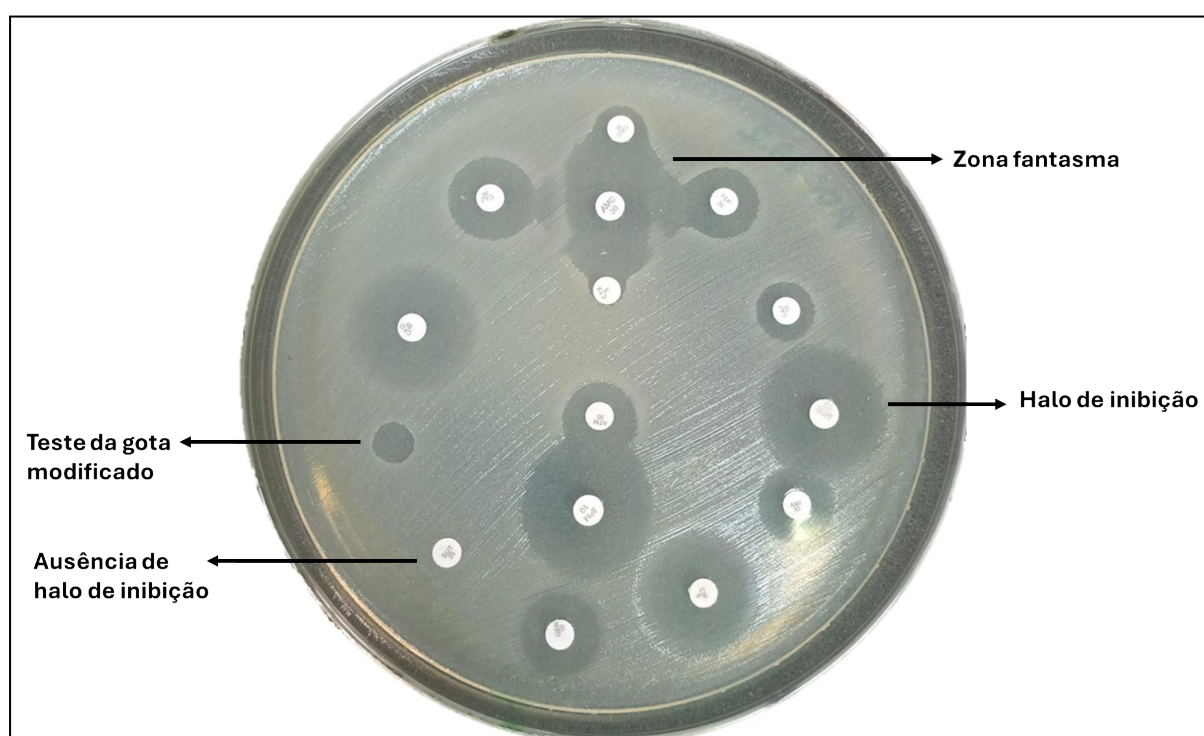
A solução foi esterilizada por filtração com um filtro de seringa de $0,22 \mu\text{m}$ antes do uso e armazenada sob refrigeração a 4°C . Uma única gota de $10 \mu\text{l}$ da solução de Polimixina B a $16 \mu\text{g/ml}$ foi depositada em uma placa de Mueller-Hinton ágar previamente semeada com um inóculo (como visto em item 4.4). As placas gotejadas foram deixadas por 15 minutos à temperatura ambiente (a gota foi completamente absorvida antes de mover a placa), então foram invertidas e incubadas de 16 a 20 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Um isolado foi categorizado como suscetível à polimixina B se qualquer zona de inibição fosse observada, sendo considerado o resistente à polimixina B quando não havia halo ao redor da gota ou quando colônias dentro da zona de inibição, indicativas de subpopulações resistentes, eram observadas.

4.6 Teste de sinergismo de disco duplo

O teste fenotípico para detecção de cepas produtoras de ESBL foi realizado por meio do teste de sinergia de disco duplo através da metodologia descrita por Brun-Buisson *et al.*, (1987). Os discos contendo cefotaxima ($5 \mu\text{g}$), ceftazidima ($30 \mu\text{g}$), ceftriaxona ($30 \mu\text{g}$) e

Cefepime (30 µg) foram distribuídos a uma distância de 20 mm de um disco contendo amoxicilina + clavulanato (20/10 µg). A formação da zona fantasma (ghost zone) que é qualquer aumento ou distorção da zona de inibição de um dos antibióticos em direção ao disco de amoxicilina + clavulanato foi considerado sugestivo da produção de ESBL (Figura 4).

Figura 4 - Placa de ágar Mueller-Hinton demonstrando os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos, teste de sinergismo de disco duplo e o teste da gota modificado.



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

4.7 Extração do Ácido desoxirribonucleico (DNA)

Para a extração do DNA, uma suspensão de colônias em água destilada estéril foi submetida a lise mecânica por banho ultrassônico em três ciclos de 30 segundos. Após isso, foi submetido à centrifugação a 13.000 rpm por dois minutos, e o DNA foi coletado a partir do sobrenadante com auxílio de micropipeta (Ribeiro, 2016).

4.8 Detecção dos genes de resistência e de identificação de espécies

A detecção dos genes de resistência *bla*_{CTX-M} (geral e seus grupos 1, 2, 8 e 9), *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *aac*(6')-Ib, *aac*(3)-Ia, ant(3'')-Ia, ant(2'')-Ia, *mcr-1* e os

genes de identificação das espécies *uspA* (*universal stress protein*) e *khe* (hemolisina de *K. pneumoniae*) foi realizada por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em termociclador BIO-RAD T100. Para as reações de amplificação dos genes, foram usados 12,5 µl de Master mix GoTaq® (Promega), 1 µl de oligonucleotídeo *forward* e 1 µl de oligonucleotídeo *reverse* específicos para os genes em questão e 9,5 µl de água ultrapura e 1 µl de DNA molde, resultando em um volume final de 25 µl. As condições de ciclagem foram ajustadas com base na temperatura de anelamento ideal para cada par de oligonucleotídeo (Quadro 2).

Quadro 1- Características dos Oligonucleotídeos utilizados para detecção dos genes de resistência em Enterobacterales aos antimicrobianos.

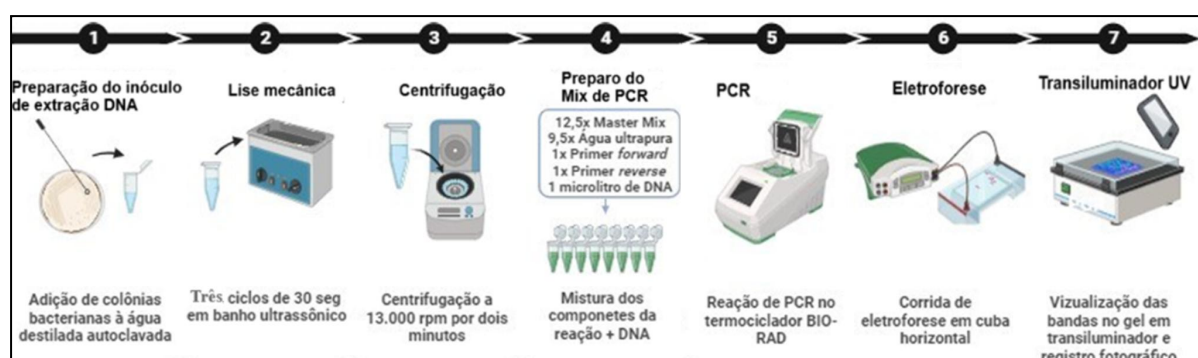
Genes alvo	Sequência	Tamanho do fragmento	Temperatura de anelamento	Referência
<i>bla</i> _{CTX-M}	F: 5'– TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA – 3' R: 5' – CGATATCGTTGGTGGTGCCATA – 3'	544-pb	51°C	Edelstein et al. 2003
<i>bla</i> _{CTX-M-grupo 1}	F: 5' – GACGATGTCACTGGCTGAGC – 3' R: 5' – AGCCGCCGACGCTAATACA – 3'	499-pb	55°C	Pitout et al. 2004
<i>bla</i> _{CTX-M-grupo 2}	F: 5' – ATGATGACTCAGAGCATTTCG – 3' R: 5' – TGGGTTACGATTTTCGCCGC – 3'	866-pb	55°C	Saladin et al. 2002
<i>bla</i> _{CTX-M-grupo 9}	F: 5' – ATGGTGACAAAGAGAGTGCA – 3' R: 5' – CCCTTCGGCGATGATTCTC – 3'	870-pb	55°C	Saladin et al. 2002
<i>bla</i> _{CTX-M-grupo 8}	F: 5' – CTGGAGAAAAGCAGCGGGG – 3' R: 5' – ACCCACGATGTGGGTAGCCC – 3'	581-pb	51°C	Minarini et al. 2007
<i>bla</i> _{TEM}	F: 5' – ATAAAATTCTTGAAGACGAAA – 3' R: 5' – GACAGTTACCAATGCTTAATC – 3'	1080-bp	50°C	Reich et al. 2013
<i>bla</i> _{SHV}	F: 5' – ATAAAATTCTTGAAGACGAAA – 3' R: 5' – GACAGTTACCAATGCTTAATC – 3'	928-pb	56°C	Reich et al. 2013
<i>qnrA</i>	F: 5' – AGAGGATTTCTCACGCCAGG – 3' R: 5' – TGCCAGGCACAGATCTTGAC – 3'	580-pb	58°C	Kraychete et al. 2016
<i>qnrB</i>	F: 5' – GGMATHGAAATTCGCCACTG – 3' R: 5' – TTTGCGYGYCGCCAGTCGAA – 3'	264-pb	58°C	Kraychete et al. 2016
<i>qnrC</i>	F: 5' – GCGAATTCCAAGGGGCAAA – 3' R: 5' – ACCCGTAATGTAAGCAGAGCAA – 3'	135-pb	58°C	Kraychete et al. 2016
<i>qnrD</i>	F: 5' – AGGTGTAGCATGTATGAAAAGC – 3' R: 5' – ACATTGGGGCATTAGGCGTT – 3'	691-pb	58°C	Kraychete et al. 2016
<i>qnrS</i>	R: 5' – GCAAGTTCATTGAACAGGGT – 3' R: 5' – TCTAAACCGTCGAGTTTCGGCG – 3'	428-pb	58°C	Kraychete et al. 2016
<i>aac(3)-la</i>	F: 5' – ATGGGCATCATTCGCACATGTAGG – 3' R: 5' – TTAGGTGGCGGTACTTGGGTC – 3'	456-pb	53–55°C	Mortazavi et al. 2020

<i>ant(3'')-Ia</i>	F: 5' – ATGAGGGAAGCGGTGATCG – 3' R: 5' – TTATTTGCCGACTACCTTGGTG – 3'	792-pb	53–55°C	Mortazavi et al. 2020
<i>ant(2'')-Ia</i>	F: 5' – ATGGACACAACGCAGGTCGC – 3' R: 5' – TTAGGCCGCATATCGCGACC – 3'	534-pb	53–55°C	Mortazavi et al. 2020
<i>aac(6')-Ib</i>	F: 5' – TTGCGATGCTCTATGAGTGGCTA – 3' R: 5' – CTCGAATGCCTGGCGTGTTT – 3'	482-pb	55°C	Szabó et al.2018
<i>mcr-1</i>	F: 5' – AGTCCGTTTGTCTTGTGGC – 3' R: 5' – AGATCCTTGGTCTCGGCTTG – 3'	320-pb	58°C	Rebelo et al. 2018
<i>uspA</i>	F: 5' CCGATACGCTGCCAATCAGT 3' R: 5' ACGCAGACCGTGGGCCAGGAT 3'	884-pb	55,2°C	Godambe et al. 2017
<i>khe</i>	F: 5' CCGGAGCGTTTTTCAATCGGCG 3' R: 5' CGCTTCGCCCTCACCTGAAAT 3'	441-pb	60°C	Yu et al.2018

Legenda: pb - Pares de base.Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Os produtos da amplificação da PCR (amplicons) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,5%) corado com GelRed® (BioTium). As condições de corrida foram 120V, 500mA, 150W por 60 minutos em cuba horizontal em tampão Tris/Borato/EDTA (TBE) 1X. Após o término da eletroforese o gel foi retirado da cuba, depositado sobre um transiluminador UV e fotografado para registro dos resultados obtidos. Todas as corridas apresentavam um marcador de peso molecular de 100pb (Class five) e amostras de controle negativo e positivo. Portanto, o tamanho dos fragmentos visualizados foi comparado aos fragmentos dos controles positivos, juntamente com a comparação do tamanho esperado para a banda no marcador de peso molecular (Figura 5).

Figura 5- Ilustração dos procedimentos para extração do DNA, utilizando a técnica de PCR e eletroforese.



Fonte: Amaral, 2023

5 RESULTADOS

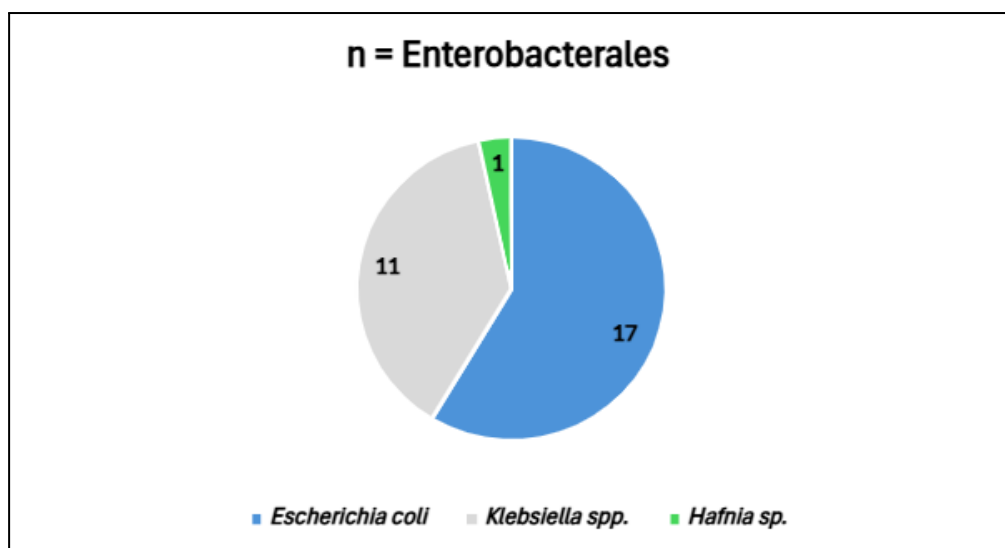
5.1 Enterobacterales identificadas nas amostras de produtos lácteos

Das 70 amostras de produtos lácteos obtidas, 26 (37%) apresentaram crescimento de bactérias pertencentes à ordem Enterobacterales sob seleção de antibiótico ceftriaxona, com um total de 29 isolados identificados. Em três amostras, foram detectadas duas bactérias distintas. Um total de 24 (92%) amostras de queijo foi categorizada como contaminada com Enterobacterales resistentes, sendo 17 queijos industriais e sete queijos artesanais. Outros produtos lácteos, como leite e manteiga da terra, apresentaram apenas uma (4%) amostra contaminada cada. Já as bebidas lácteas não revelaram a presença de Enterobacterales.

5.2 Identificação dos Isolados

Dos 29 isolados obtidos, os testes bioquímicos revelaram uma predominância de *E. coli* em 17 dos isolados (59%), além da identificação de 11 isolados (38%) pertencentes ao gênero *Klebsiella* e um isolado (3%) da espécie *Hafnia alvei* (Gráfico 1). A amplificação por PCR também confirmou a identificação das espécies *K. pneumoniae* e *E. coli*. Dos 11 isolados de *Klebsiella* spp, nove foram identificados como *K. pneumoniae*, enquanto dois não amplificaram para esta espécie e foram classificados através dos testes bioquímicos como *K. aerogenes* e *K. oxytoca* evidenciando a diversidade genética das cepas de *Klebsiella* isoladas. Os 17 isolados de *E. coli* também tiveram sua identificação confirmada.

Gráfico 1 - Espécies isoladas pertencentes ao grupo Enterobacterales identificadas em amostras de produtos lácteos obtidos no semiárido brasileiro, no período de junho de 2022 a fevereiro de 2024.

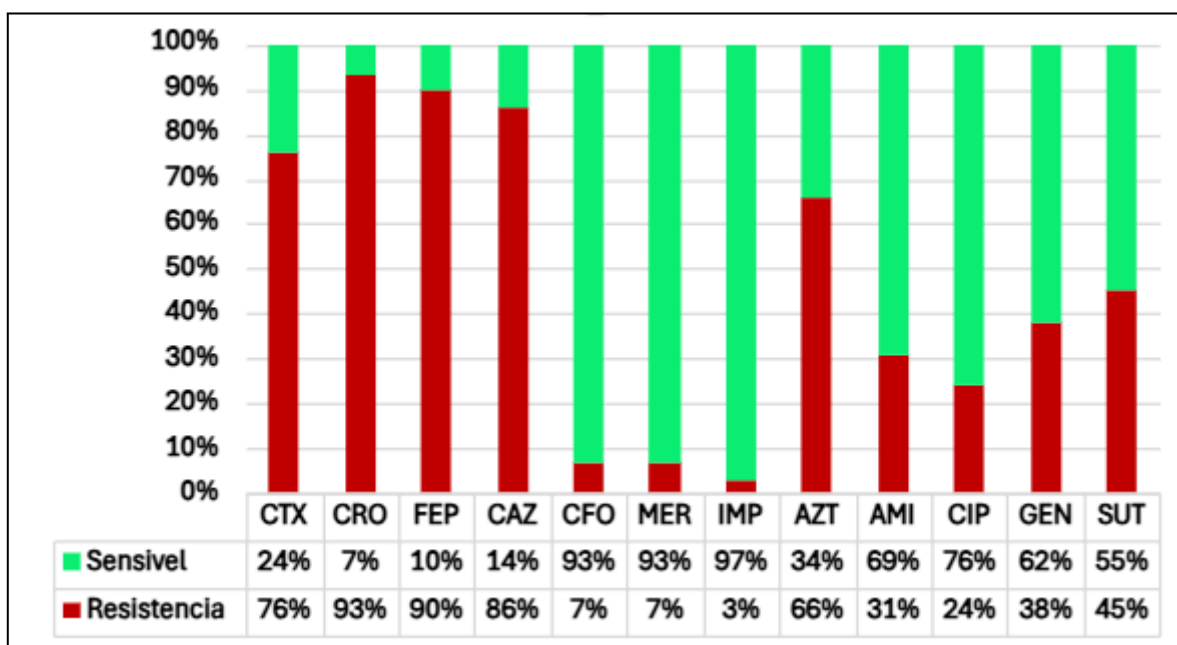


Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

5.3 Perfil de resistência antimicrobiana e produção fenotípica de β -Lactamases

A análise do perfil de resistência dos isolados bacterianos revelou que, entre os antibióticos testados, as maiores taxas de resistência foram observadas para ceftriaxona, cefepime, ceftazidima, cefotaxima e aztreonam. Por outro lado, os antibióticos da classe dos carbapenêmicos, juntamente com a cefoxitina, demonstraram maior atividade antimicrobiana, apresentando melhores resultados de suscetibilidade (Gráfico 2). Em relação à Polimixina B, a triagem foi sugestiva para resistência em um (3%) isolado, pertencente à espécie *H. alvei*. Entre os 29 isolados, 25 (87%) demonstraram produção fenotípica de ESBL, enquanto quatro (13%) foram negativos.

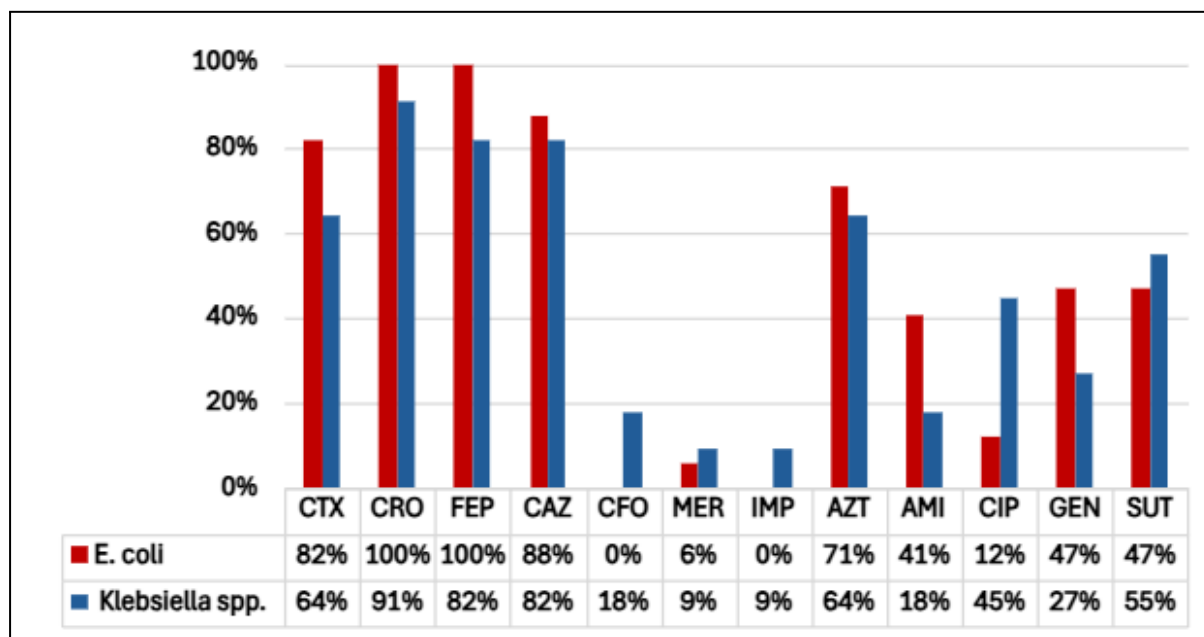
Gráfico 2 - Porcentagem dos isolados classificados como resistentes e sensíveis aos antibióticos testados, com base nos resultados dos testes de sensibilidade antimicrobiana.



Legenda: CTX: Cefotaxima; CRO: Ceftriaxona; FEP: Cefepime; CAZ: Ceftazidima; CFO: Cefoxitina; MER: Meropenem; IMP: Imipenem; AZT: Aztreonam; AMI: Amicacina; CIP: Ciprofloxacino; GEN: Gentamicina; SUT: Sulfametoxazol/Trimetoprima.

Quando analisadas individualmente, as cepas isoladas de *E. coli* e *Klebsiella* spp. apresentaram maior taxa de resistência aos antibióticos cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima e aztreonam (Gráfico 3), destacando resistência às cefalosporinas de terceira geração. Em contrapartida, os antibióticos Meropenem e Imipenem apresentaram baixas taxas de resistência, indicando que esses fármacos ainda mantêm eficácia contra as cepas isoladas. Além disso, a cefoxitina também demonstrou baixa taxa de resistência em *Klebsiella* spp, enquanto nenhuma resistência à cefoxitina foi observada em isolados de *E. coli*.

Gráfico 3 - Porcentagem de isolados de *E. coli* e *Klebsiella* spp. resistentes aos antibióticos testados, com base nos resultados dos testes de sensibilidade antimicrobiana.



Legenda: CTX: Cefotaxima; CRO: Ceftriaxona; FEP: Cefepime; CAZ: Ceftazidima; CFO: Cefoxitina; MER: Meropenem; IMP: Imipenem; AZT: Aztreonam; AMI: Amicacina; CIP: Ciprofloxacino; GEN: Gentamicina; SUT: Sulfametoxazol/Trimetoprima.

5.4 Detecção de genes de resistência antimicrobiana

Dentre os isolados positivos para produção fenotípica de ESBL, 24 (96%) apresentaram pelo menos um dos genes estudados associados à produção de β -lactamases. O gene *bla*_{CTX-M} foi detectado em 23 isolados (79%), sendo o mais frequente entre os analisados. Desses, 20 pertenciam ao grupo 1 e um ao grupo 2. No entanto, a Figura 6 apresenta a análise de 20 amostras no gel de agarose, representando parte dos isolados nos quais o gene *bla*_{CTX-M} foi identificado.

Figura 6 - Gel de agarose demonstrando a presença de fragmentos amplificados correspondentes ao gene *bla*_{CTX-M}. Controles utilizados: positivo (C+) e negativo (C-). Amostras testadas: isolados 1 a 20. L: marcador de peso molecular (ladder), com banda de referência em 544 pb.



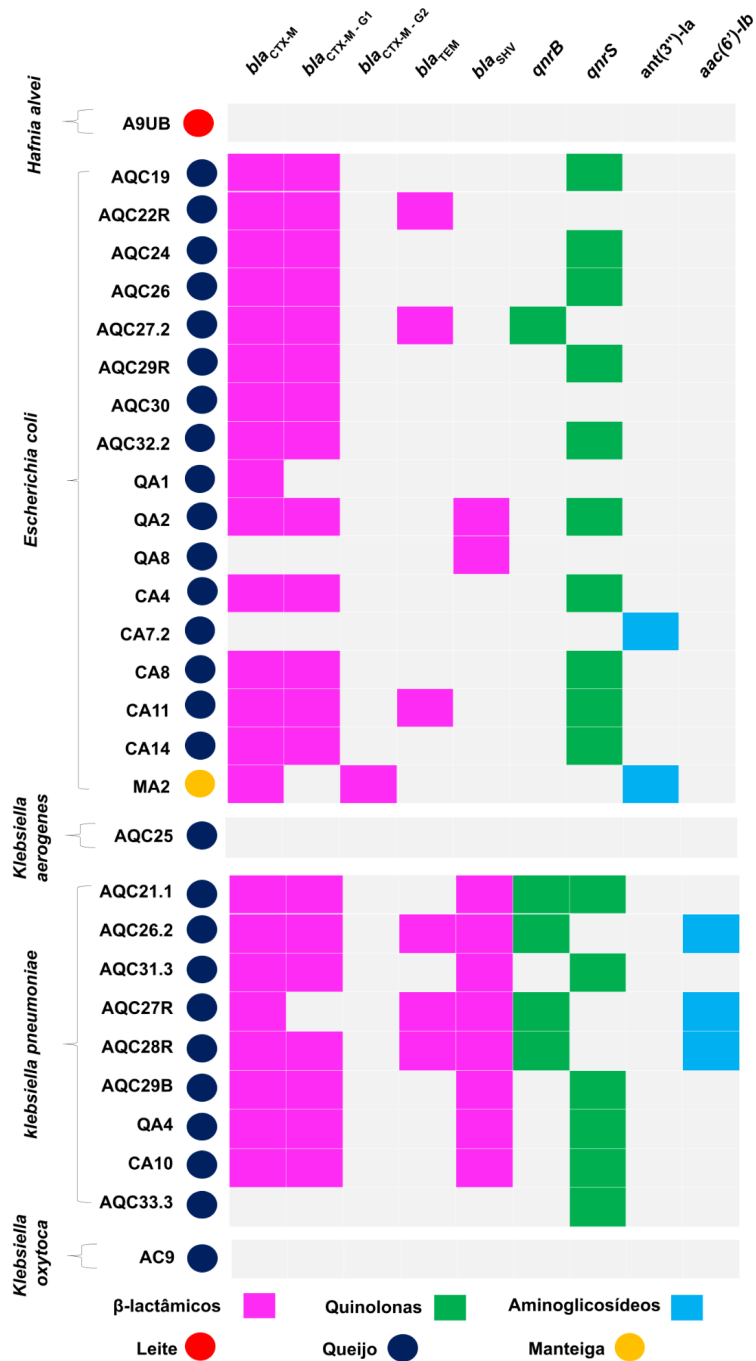
Fonte: Elaborado pela autora, 2024.

O gene *bla*_{SHV} foi detectado em 10 isolados (33%) e o gene *bla*_{TEM} em seis (20%). Entre os isolados positivos para *bla*_{CTX-M}, 10 (41,7%) apresentaram exclusivamente esse gene, enquanto três (13%) apresentaram uma combinação de *bla*_{CTX-M} e *bla*_{TEM}, seis (25%) possuíam *bla*_{CTX-M} e *bla*_{SHV}, e três (13%) apresentaram simultaneamente os três genes (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}). Apenas uma amostra (4%) apresentou unicamente o gene *bla*_{SHV}.

O gene *qnrS* foi identificado em 16 isolados (55%) e o gene *qnrB* em cinco isolados (17%). Apenas um isolado (3%) apresentou simultaneamente os dois genes (*qnrS* e *qnrB*), totalizando 20 isolados (69%) com pelo menos um gene associado à resistência a quinolonas. Fenotipicamente, oito (40%) desses isolados apresentaram resistência ao ciprofloxacino, um antibiótico da classe das fluoroquinolonas.

Dos genes relacionados à resistência a aminoglicosídeos, o gene *ant(3'')-Ia* foi identificado em dois isolados (7%), enquanto o gene *aac(6')-Ib* foi detectado em três isolados (10%), todos localizados em amostras distintas (Figura 7). Desses, quatro isolados, portadores de genes relacionados à resistência a aminoglicosídeos, demonstraram resistência fenotípica à gentamicina e à ampicacina, antibióticos desta classe. No entanto, um isolado que possuía o gene *ant(3'')-Ia* não apresentou resistência a esses antibióticos.

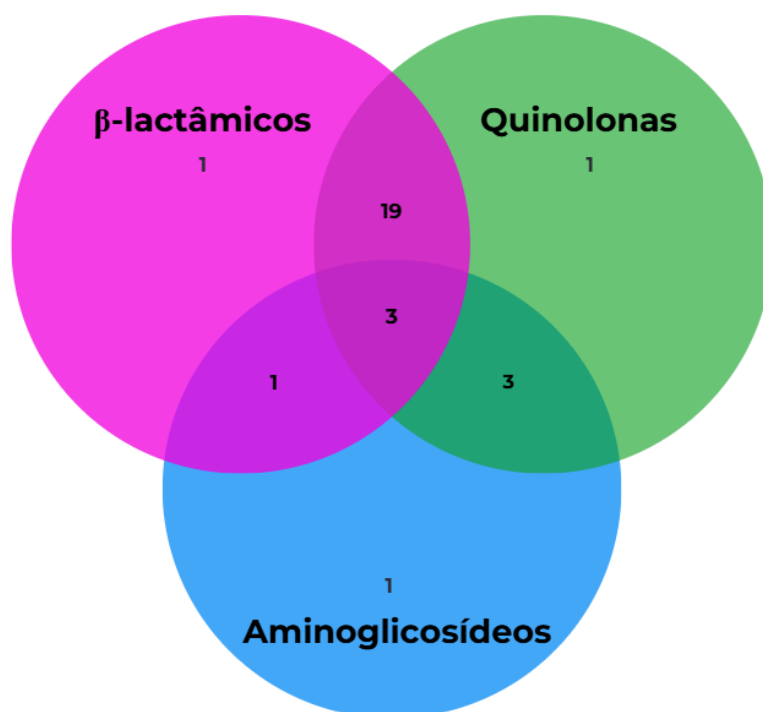
Figura 7 - Heatmap ilustrando a presença e ausência dos genes de resistência nas amostras lácteas, obtidas no semiárido brasileiro.



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

Três isolados de *K. pneumoniae* apresentaram pelo menos um gene de resistência em cada uma das classes de antibióticos analisadas: β -lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas (figura 8). Em contraste, três isolados das espécies *H. alvei*, *K. aerogenes* e *K. oxytoca* não apresentaram nenhum dos genes de resistência investigados.

Figura 8 - Diagrama de Venn ilustrando a distribuição dos genes associados à resistência aos antibióticos β -lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos.



Fonte: Elaborado pela autora, 2025.

6. DISCUSSÃO

A contaminação por Enterobacterales nas amostras de queijo pode ser explicada pelo alto teor de nutrientes e umidade do produto, condições que favorecem o crescimento de microrganismos, tanto benéficos quanto patogênicos, originados do leite ou adquiridos durante o processo de fabricação (Chávez-Martínez *et al.*, 2019). A ausência de pasteurização eficaz torna as etapas de produção e maturação insuficientes para garantir a inativação completa desses microrganismos patogênicos (Bellio *et al.*, 2018).

Além disso, a análise dos resultados demonstrou que todos os queijos provenientes de locais com produção artesanal apresentaram genes de resistência a antimicrobianos, o que se relaciona à ausência de padronização nos processos de fabricação, especialmente nas práticas higiênico-sanitárias. Esses ambientes, comuns na região semiárida, apresentam infraestrutura limitada e manejo pecuário rudimentar, comprometendo a qualidade do produto final.

A transmissão de bactérias patogênicas por alimentos comercializados *in natura* ou de forma artesanal está intimamente relacionada a condições ambientais e aos métodos de produção, como a inadequada higienização dos equipamentos e o manuseio incorreto, que favorecem a contaminação microbiológica. A implementação de controles de qualidade, o manuseio higiênico e a adequação das condições ambientais são determinantes para a obtenção de alimentos seguros (Freivogel *et al.*, 2022).

Nesse contexto, destaca-se a presença de *E. coli*, especialmente as cepas produtoras de ESBL, cuja ampla disseminação em alimentos e animais é motivo de preocupação (Ben *et al.*, 2015). Essas cepas possuem mecanismos de virulência e resistência que aumentam a capacidade de causar infecções graves. Além disso, o substrato do leite cru favorece a troca de genes de resistência, o que intensifica a virulência das cepas e representa um risco maior para a saúde do hospedeiro (Liao *et al.*, 2021).

Além de *E. coli*, outros gêneros bacterianos com potencial patogênico e resistência antimicrobiana também foram identificados nas amostras analisadas. O gênero *Klebsiella spp.* foi identificado entre os isolados, e algumas cepas apresentaram, simultaneamente, genes associados à resistência a β -lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos. Esse fenômeno ocorre devido à capacidade dessas bactérias de acumular mutações genéticas e adquirir elementos genéticos móveis, permitindo-lhes desenvolver resistência a diferentes classes de medicamentos, incluindo aqueles que são a última linha de defesa (De Oliveira *et al.*, 2020).

Outro achado relevante foi a detecção da espécie *Hafnia alvei*, que foi o único isolado a demonstrar resistência presumida à polimixina B por meio do teste de gota modificado.

Estudos prévios já relataram casos de resistência de *Hafnia* spp. às polimixinas. Em junho de 2021, o Subcomitê do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) sobre Testes de Sensibilidade Antimicrobiana votou para incluir as polimixinas (polimixina E/colistina e polimixina B) na lista de agentes aos quais *Hafnia* spp. é considerada intrinsecamente resistente (Turbett *et al.*, 2023).

Cepas de *H. alvei* foram consideradas como patógenos oportunistas em várias espécies animais (Lang *et al.*, 2022), e são suspeitas de causar uma variedade de distúrbios em humanos (Ionescu *et al.*, 2022). *Hafnia* spp. já foi relatada em uma ampla gama de ambientes, incluindo alimentos fermentados e laticínios (Ramos-vivas *et al.*, 2022). Estudos feitos por Fontana *et al.*, (2024), encontraram cepas de *Hafnia* spp. em alimentos lácteos, destacando a importância do potencial metabólico e enzimático desse gênero, provavelmente ligado à sua capacidade de prosperar em uma ampla gama de nichos ecológicos.

Nosso estudo mostrou que a maioria dos isolados de Enterobacterales eram produtores de ESBL, o que sugere uma ampla disseminação desse mecanismo de resistência, comprometendo a eficácia de antibióticos β -lactâmicos amplamente utilizados. Estudos anteriores também demonstraram a ocorrência de bactérias produtoras de ESBL em produtos lácteos em diferentes países. No Egito, por exemplo, 19% (42/222) das amostras de leite e queijo estavam contaminadas com *E. coli* produtora de ESBL (Ombarak *et al.*, 2018). Já no Brasil, estudo realizado por Sierra *et al.* (2023) indicou que 61,54% (16/26) dos isolados provenientes de leite cru foram positivos no teste de triagem para *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL.

Os isolados do estudo apresentaram maior taxa de resistência à ceftriaxona, cefepime, ceftazidima, cefotaxima e aztreonam. Além da resistência observada aos β -lactâmicos, também foram identificados isolados resistentes à gentamicina e à ciprofloxacina, pertencentes, respectivamente, às classes dos aminoglicosídeos e das fluoroquinolonas. Esses resultados destacam a preocupação com a eficácia das principais classes de antimicrobianos utilizadas no tratamento de doenças em vacas leiteiras, como β -lactâmicos, aminoglicosídeos, lincosamidas, macrolídeos, polimixinas, quinolonas, sulfamicinas e tetraciclina (Zanela *et al.*, 2022).

Além disso, a presença constante de resíduos desses antibióticos no leite contribui para a resistência bacteriana, refletindo o uso inadequado desses compostos na cadeia produtiva e aumentando os riscos à saúde humana (Farias *et al.*, 2021). No que diz respeito ao leite proveniente de indústrias, Bastos *et al.* (2020) analisaram o volume de descarte realizado

por uma indústria no estado de Minas Gerais entre 2015 e 2018. O estudo revelou uma média de descarte de 40.025,15 litros de leite contaminado com antibióticos β -lactâmicos e 4.772,00 litros com resíduos de tetraciclinas. Já na região Nordeste, no estado do Rio Grande do Norte, Souza *et al.* (2017) avaliaram 112 amostras de leite cru em seis municípios e identificaram a presença de resíduos de β -lactâmicos e tetraciclinas em três localidades analisadas.

Os carbapenêmicos e a cefoxitina apresentaram as maiores taxas de suscetibilidade, no entanto, ainda foram observados isolados resistentes. Isso evidencia que a presença de bactérias resistentes, incluindo antibióticos estratégicos como os carbapenêmicos, não está mais restrita aos ambientes hospitalares, mas se espalha para outros contextos, como o agropecuário e alimentos (Jelic *et al.*, 2019).

O gene de ESBL mais frequente encontrado neste estudo foi o *bla*_{CTX-M}, identificado em 23 isolados (79%), seguido pelo o gene *bla*_{SHV} em 10 isolados (33%), e *bla*_{TEM} em seis isolados (20%). De maneira similar, o trabalho de Loeza-Lara *et al.* (2023) também apontou *bla*_{CTX-M} como o tipo de ESBL mais frequente, presente em 77% isolados, seguido por combinações com os genes TEM e SHV. Além disso, em um estudo realizado no Egito com ESBLs isoladas de produtos lácteos, os genes mais prevalentes foram o *bla*_{CTX-M} (48%), seguido pelo *bla*_{TEM} (44%) e, em menor frequência, o *bla*_{SHV} (14,8%) (Gaffer *et al.*, 2019).

Os genes *qnrS* e *qnrB* foram detectados em 16 (55%) e 5 (17%) isolados, respectivamente, com um isolado (3%) apresentando ambos, totalizando 20 (69%) dos isolados com pelo menos um gene de resistência a quinolonas. Desses, 8 (40%) mostraram resistência ao ciprofloxacino. Para os aminoglicosídeos, *ant(3'')-Ia* e *aac(6')-Ib* foram identificados em 2 (7%) e 3 (10%) isolados, respectivamente, sendo que quatro eram resistentes à gentamicina e à amicacina. No entanto, um isolado com *ant(3'')-Ia* não apresentou resistência fenotípica a esses antibióticos, evidenciando discrepância genotípico-fenotípica.

Essa divergência entre os testes pode ser explicada pelo que Hughes e Andersson (2017) relataram, ao afirmarem que a presença de um gene pode não prever diretamente o traço fenotípico. Isso pode estar relacionado a fatores como condições ambientais que modulam a expressão fenotípica, ou a outros fatores genéticos, incluindo combinações de múltiplos genes de resistência, mutações que afetam a expressão fenotípica e a presença de sequências de inserção. Essas sequências podem influenciar mecanismos de resistência, como inativação do fármaco, alteração do alvo ou produção de bombas de efluxo específicas.

7 CONCLUSÃO

- Enterobacterales resistentes a antibióticos e portadoras de genes de resistência foram detectadas em produtos lácteos do semiárido brasileiro, evidenciando um potencial risco à saúde pública.
- As espécies *Klebsiella* spp., *E. coli* foram as mais importantes associadas à produção de ESBL em produtos lácteos.
- Foram detectados genes de resistência a β -lactâmicos (bla_{CTX-M} , bla_{TEM} e bla_{SHV}), quinolonas ($qnrS$ e $qnrB$) e aminoglicosídeos ($aac(6')-Ib$ e $ant(3'')-Ia$), evidenciando a disseminação de múltiplos mecanismos de resistência.

REFERÊNCIAS

- Araújo, B. O, et al. “Qualidade microbiológica e células somáticas de leite in natura produzido no Estado de Alagoas, Brasil.” **Research, Society and Development**, v. 9, no. 9, 2020.
- Arruda, C. J. et al. "Revisão bibliográfica de antibióticos beta-lactâmicos." **Revista Saúde em Foco**, p. 982–995, 2019.
- Abed Rabba Al-Shuwaili, M., & Saab, Khudhir Z. “Evaluation of the Bacterial Load in the Raw Dairy Products in Baghdad, Iraq.” **Archives of Razi Institute**, v. 77, no. 6, pp. 2319-2328, 2022. DOI: 10.22092/ARI.2022.358618.2268.
- Abebe, E., Gugsu, G., Ahmed, M., Awol, N., Tefera, Y., Abegaz, S., & Sisay, T. “Occurrence and antimicrobial resistance pattern of *E. coli* O157:H7 isolated from foods of bovine origin in Dessie and Kombolcha towns, Ethiopia.” **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 17, no. 1, e0010706, 2023.
- Ahmed, I. M. “Detecção do gene CTX-M em β -lactamases de espectro estendido produzindo Enterobacteriaceae isoladas de leite bovino.” **Jornal Iraquiano de Ciências Veterinárias**, v. 35, pp. 397-402, 2021.
- Aguilar-Bultet, L., et al. “Identification of a cluster of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 101 isolated from food and humans.” **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, pp. 332–335, 2021. DOI: 10.1093/cid/ciaa1164.
- Akinyemi, M. O., Ayeni, K. I., Ogunremi, O. R., Adeleke, R. A., Oguntuyinbo, F. A., Warth, B., & Ezekiel, C. N. “A review of microbes and chemical contaminants in dairy products in sub-Saharan Africa.” **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, no. 2, pp. 1188-1220, Mar. 2021. DOI: 10.1111/1541-4337.12712.
- Amaral, Marcileide Almeida. **Caracterização fenotípica e molecular de *Acinetobacter* spp. resistentes aos carbapenêmicos provenientes de amostras clínicas hospitalares de**

Mossoró-RN. Trabalho de conclusão de curso – Departamento de Biociências, Biotecnologia, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, 2023.

Argudín, A., Deplano, A., Meghraoui, A., Dodémont, M., Heinrichs, A., Denis, O., Nonhoff, C., & Roisin, S. “Bacteria from animals as a pool of antimicrobial resistance genes.” **Antibiotics (Basel)**, v. 6, no. 2, p. 12, 2017.

Bauer, A. W. “Kirby Bauer method antimicrobial susceptibility testing by a standardized single disk method.” *American Journal of Clinical Pathology*, v. 45, no. 4, pp. 493-496, 1966.

Ben Said, L. et al. "Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia." **International Journal of Food Microbiology**, v. 203, p. 86–92, 2015.

Brun-Buisson, C., Philippon, A., Ansquer, M., Legrand, P., Montravers, F., & Duval, J. “Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*.” **The Lancet**, v. 330, pp. 302–306, 1987.

Bastos, E. C., et al. “Descarte de leite devido à presença de resíduos de antibióticos no Sul de Minas Gerais.” **Research, Society and Development**, v. 9, no. 11, p. e72791110347, 2 Dez. 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i11.10347>.

Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. “Tabela de pontos de corte clínicos BrCAST 15-03-2023.” Disponível em: <https://brcast.org.br/wp-content/uploads/2022/09/Tabela-pontos-de-corte-BrCAST-15-03-2023.pdf>. Acesso em: 27 Dez. 2024.

Brown, K., Mugoh, M., Call, D., & Omulo, S. “Antibiotic residues and antibiotic-resistant bacteria detected in milk marketed for human consumption in Kibera, Nairobi.” **PLoS One**, v. 15, no. 5, e0233413, 2022.

Bonardi, S., & Pitino, R. “Carbapenemase-producing bacteria in food-producing animals, wildlife and environment: A challenge for human health.” **Ital J Food Saf.**, May 23, 2019; v. 8, no. 2, p. 77. DOI: 10.4081/ijfs.2019.7956.

Bui, T., & Preuss, C.V. "Cephalosporins." Bookshelf ID: NBK551517, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551517/>, 2023.

Bellio, A. et al. "Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of Fontina protected designation of origin cheese." *Journal of Dairy Science*, v. 101, p. 4962–4970, 2018. DOI: 10.3168/jds.2017-13458.

Bungau, S., et al. "Aspects of excessive antibiotic consumption and environmental influences correlated with the occurrence of resistance to antimicrobial agents." *Current Opinion in Environmental Science & Health*, v. 19, p. 100224, 2021. Disponível em: <https://doi:10.1016/j.coesh.2020.10.012>.

Bastidas-Caldes, C., et al. "Extended-spectrum beta-lactamases producing *Escherichia coli* in South America: A systematic review with a One Health perspective." *Infection and Drug Resistance*, v. 15, pp. 5759-5779, 2022.

Baquero, F., et al. "Gene transmission in the One Health microbiosphere and the channels of antimicrobial resistance." *Frontiers in Microbiology*, v. 10, pp. 1-14, 2019.

Bisacchi, G. S. "Origins of the quinolone class of antibacterials: an expanded 'discovery story' miniperspective." *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 58, no. 12, pp. 4874–4882, 2015.

Bush, K.; Jacoby, G. A.; Medeiros, A. A. "A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 39, p. 1211–1233, 1995. DOI: 10.1128/aac.39.6.1211.

Bush, K.; Jacoby, G. A. "Updated functional classification of β -lactamases." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, p. 969–976, 2010. DOI: 10.1128/AAC.01009-09.

Bush, K.; Bradford, P. A. "Epidemiology of β -lactamase-producing pathogens." *Clinical Microbiology Reviews*, v. 33, n. 2, p. 10.1128/cmr.00047-19, 2020.

Bevan, E. R.; Jones, A. M.; Hawkey, P. M. "Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 72, n. 8, p. 2145–2155, 2017. DOI: 10.1093/jac/dkx146.

Conley, Z. C., Bodine, T. J., Chou, A., et al. "Wicked: The untold story of ciprofloxacin." **PLoS Pathogens**, v. 14, no. 3, e1006805, 2018.

Chávez-Martínez, A., et al. "Microbial quality and prevalence of foodborne pathogens of cheeses commercialized at different retail points in Mexico." **Food Science and Technology**, v. 39, Suppl. 2, pp. 703-710, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/fst.30618>.

Correia, S., Poeta, P., Hébraud, M., et al. "Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand?" **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, no. 5, pp. 551–559, 2017.

Conrado, J. A. A. et al. "O manejo da pastagem natural incrementa a biomassa herbácea nativa e exótica e a biodiversidade na Caatinga no Brasil." **Revista Semina**, v. 40, p. 867–884, 2019.

Castanheira, M., Simner, P. J., & Bradford, P. A. "Extended-spectrum beta-lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection." **JAC Antimicrob. Resist.**, v. 3, p. dlab092, 2021.

Cassini, A., et al. "Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European economic area in 2015: a population-level modelling analysis." **Lancet Infect. Dis.**, v. 19, pp. 56–66, 2019. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30605-4.

CDC, C. for D. C. and P. *Antibiotic resistance threats in the United States, 2019*. [S.L.]: Centers for Disease Control and Prevention (U.S.), Nov. 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html>. Acesso em: 21 Ago. 2024.

Davis, G. S., et al. "Intermingled *Klebsiella pneumoniae* populations between retail meats and human urinary tract infections." **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, no. 6, pp. 892–899, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/cid/civ428>.

Dantas Palmeira, J.; Ferreira, H. M. N. "Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae in cattle production - a threat around the world." **Heliyon**, v. 6, p. e03206, 2020.

De Oliveira, D. M. P., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N. A., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Paterson, D. L., Walker, M. J. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 3, e00181-19, 2020. doi: 10.1128/CMR.00181-19.

Du, Bingyao, Meng, Lu, Liu, Huimin, Zheng, Nan, Zhang, Yangdong, Guo, Xiaodong, Zhao, Shengguo, Li, Fadi, & Wang, Jiaqi. “Impacts of Milking and Housing Environment on Milk Microbiota.” **Animals**, v. 10, no. 12, p. 2339, 2020. DOI: 10.3390/ani10122339.

D'Agostino, M., & Cook, N. “Foodborne pathogens.” In: Caballero, B., Finglas, P. M., & Toldrá, F. (Eds.). **Encyclopedia of food and health**. Academic Press, 2016, pp. 83–86. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00326-3>.

Dalhoff, A. “Global fluoroquinolone resistance epidemiology and implications for clinical use.” **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, 2012, p. 976273.

Eyvazi, S., Hakevi-Vala, M., Hashemi, A., et al. “Emergence of NDM-1-producing *Escherichia coli* in Iran.” **Archives of Clinical Infectious Diseases**, v. 13, no. 4, p. e62029, 2018.

Edelstein, M., et al. “Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals.” **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, no. 12, pp. 3724-3732, 2003. DOI: 10.1128/AAC.47.12.3724-3732.2003.

Embrapa. *Mapa do Leite*. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/ptbr/assuntos/producao-animal/mapa-do-leite>. Acesso em: 18 Ago. 2024.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa. Produtos lácteos. 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/tecnologia-de-alimentos/processos/grupos-de-alimentos/lacteos>. Acesso em: 22 Jan. 2025.

Eljaaly, K., et al. “Plazomicin: a novel aminoglycoside for the treatment of resistant gram-negative bacterial infections.” **Drugs**, v. 79, pp. 243–269, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40265-019-1054-3>.

Faria, L. V. de; Lisboa, T. P.; Campos, N. da S.; Alves, G. F.; Matos, M. A. C.; Matos, R. C.; Munoz, R. A. A. Electrochemical methods for the determination of antibiotic residues in milk: A critical review. **Analytica Chimica Acta**, v. 1173, p. 338569, 2021. DOI: [10.1016/j.aca.2021.338569](https://doi.org/10.1016/j.aca.2021.338569).

Foster, J., Tekin, M. “Aminoglycoside induced ototoxicity associated with mitochondrial DNA mutations.” **Egyptian Journal of Medical Human Genetics**, v. 17, pp. 287–293, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmhg.2016.06.001>. Acesso em: 23 Jan. 2025.

Fontana, Federico, et al. “Revealing the genetic traits of the foodborne microbial genus *Hafnia*: Implications for the human gut microbiome.” **Environmental Microbiology**, v. 26, no. 4, p. e16626, 2024.

Ferreira, R. G., et al. “Panorama da ocorrência de resíduos de medicamentos veterinários em leite no Brasil.” **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, v. 19, no. 2, pp. 30–49, 2012.

Freivogel, Claudia, et al. “Tailoring Can Improve Consumers’ Hygienic Food-Handling Behavior to Reduce the Transmission Risk of Antimicrobial-Resistant Bacteria through 60 Food.” **European Journal of Investigation in Health, Psychology and Education**, vol. 12, no. 2, 1 Feb. 2022, pp. 169–192.

Guan, X. et al. “Resistência à quinolona mediada por plasmídeo – conhecimento atual e perspectivas futuras.” **Journal of International Medical Research**, v. 41, p. 20–30, 2013.

Gaffer, W., et al. “Occurrence and molecular characterization of extended spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in milk and some dairy products.” **Slovenian Veterinary Research**, v. 56, no. 22 Suppl., pp. 475–485, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.26873/SVR-785-2019>.

Godambe, L. P., Bandekar, J., Shashidhar, R. “Species specific PCR based detection of *Escherichia coli* from Indian foods.” **Biotech**, v. 7, no. 2, p. 130, 2017. DOI: 10.1007/s13205-017-0784-8.

Garcia, S. N., Osburn, B. I., Cullor, J. S. “A one health perspective on dairy production and dairy food safety.” **One Health**, v. 7, p. 100086, 2019. DOI: 10.1016/j.onehlt.2019.100086.

Gelalcha, B. D.; Kerro Dego, O. "Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing Enterobacteriaceae in the USA Dairy Cattle Farms and Implications for Public Health." **Antibiotics**, v. 11, p. 1313, 2022. DOI: [10.3390/antibiotics11101313](https://doi.org/10.3390/antibiotics11101313).

Garneau-Tsodikova, S.; Labby, K. J. "Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: overview and perspectives." **MedChemComm**, v. 7, p. 11–27, 2016.

Ghosh, C., et al. "Alternatives to conventional antibiotics in the era of antimicrobial resistance." **Trends in Microbiology**, v. 27, no. 4, pp. 323–338, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.12.010>.

Hassani, S., et al. "High prevalence of antibiotic resistance in pathogenic foodborne bacteria isolated from bovine milk." **Scientific Reports**, [S.L.], v. 12, no. 1, 9 mar. 2022.

Huemer, M., Mairpady Shambat, S., Brugger, S. D., Zinkernagel, A. S. "Antibiotic resistance and persistence—implications for human health and treatment perspectives." **EMBO Reports**, v. 21, no. 12, p. e51034, 2020.

Hooshmand, Z., et al. "Survey of the microbiological count of the milk collected from livestock ancient city of Garmsar, Semnan Province, Iran." **Tropical Animal Health and Production**, v. 52, no. 1, pp. 195–201, 2019.

Hughes, D.; Andersson, D. I. "Environmental and genetic modulation of the phenotypic expression of antibiotic resistance." **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, p. 374–391, 2017. DOI: 10.1093/femsre/fux004.

Haulisah, N. A. et al. "High levels of antibiotic resistance in isolates from diseased livestock." **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 652351, 2021.

Husan, O., Çadirci, Ö. "Determinação de Enterobacteriaceae produtoras de γ -lactamases de espectro estendido em amostras de queijo produção – uma ameaça em todo o mundo." **Heliyon**, v. 6, no. 1, p. e03206, 2019.

Harding-Crooks, Richard, et al. "Profiling the Enterobacterales community isolated from retail foods in England." **Journal of Food Protection**, v. 87, no. 11, p. 100369, 2024.

Ionescu, M. I., Neagoe, D. S., Cryciun, A. M., Moldovan, O. T. "Os bacilos gram-negativos isolados de cavernas - *Sphingomonas paucimobilis* e *Hafnia alvei* e uma revisão de seu

envolvimento em infecções humanas.” **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, p. 2324, 2022.

Interagency Coordination Group (IACG). *No Time to Wait: Securing the Future from Drug-Resistant Infections*. **World Health Organization**, 2019. Disponível em: <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/final-report/en/>. Acesso em: 23 jul. 2024.

Janda, J. M., Abbott, S. L. “The changing face of the family Enterobacteriaceae (Order: ‘Enterobacterales’): new members, taxonomic issues, geographic expansion, and new diseases and disease syndromes.” **Clinical Microbiology Reviews**, v. 34, no. 2, e00174-00120, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.00174-20>.

Jelić, M., Hrenović, J., Dekić, S., Goić-Barišić, I., Tamić Andrašević, A. “First evidence of KPC producing ST258 *Klebsiella pneumoniae* in river water.” **J Hosp Infect**, v. 103, no. 2, pp. 147–150, Oct. 2019. DOI: 10.1016/j.jhin.2019.04.001.

Janecko, N., Zamudio, R., Palau, R., Bloomfield, S. J., Mather, A. E. “Repeated cross-sectional study identifies differing risk factors associated with microbial contamination in common food products in the United Kingdom.” **Food Microbiology**, v. 111, p. 104196, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2022.104196>.

Jacoby, G. A.; Strahilevitz, J.; Hooper, D. C. "Plasmid-mediated quinolone resistance." *Microbiology Spectrum*, v. 2, n. 5, 2014. DOI: 10.1128/microbiolspec.PLAS-0006-2013.

Jeena, S., Venkateswaramurthy, N., Sambathkumar, R. “Antibiotic residues in milk products: Impacts on human health.” **Research Journal of Pharmacology and Pharmacodynamics**, v. 12, no. 1, pp. 15–20, 2020.

Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C., Winn, W. C. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

Kurittu, P. et al. “Genes ESBL/AmpC Cromossômicos e Transmitidos por Plasmídeos em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* em Produtos Alimentícios Globais.” **Microbial Frontiers**, 3 fev. 2021, v. 12, p. 592291.

Kraychete, G. B. et al. “Updated Multiplex PCR for Detection of All Six Plasmid-Mediated qnr Gene Families.” **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, no. 12, pp. 7524–7526, 2016. DOI: 10.1128/AAC.01447-16.

Kurittu, P. et al. “Plasmid-borne and chromosomal ESBL/AmpC genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in global food products.” **Frontiers in Microbiology**, v. 12, Artigo 592291, 2021. DOI: 10.3389/fmicb.2021.592291.

Lang, H. et al. “Cepas específicas de *Lactobacillus* do intestino da abelha estimulam o sistema imunológico do hospedeiro para proteger contra *Hafnia alvei* patogênica.” **Microbiology**, 2022, v. 10, p. e0189621.

Loeza-Lara, Pedro Damián et al. “Frequency and characteristics of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from Mexican fresh cheese.” **Food Science and Technology**, v. 43, p. e108222, 2023.

Lima, L.M., Nascimento Monteiro da Silva B., Barbosa G., Barreiro E.J. “ β -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective.” **Eur J Med Chem.**, v. 208, p. 112829, 2020. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112829.

Liao, Cui-Yi et al. “Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from aquaculture farms and their environment in Zhanjiang, China.” **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, 24 dez. 2021.

Mladenović, K. G. et al. “Enterobacteriaceae in food safety with an emphasis on raw milk and meat.” **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, no. 23, p. 8615–8627, 2021. DOI: [10.1007/s00253-021-11655-7](https://doi.org/10.1007/s00253-021-11655-7).

Michael, C. A. et al. “The antimicrobial resistance crisis: an inadvertent, unfortunate but nevertheless informative experiment in evolutionary biology.” **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 9, p. 1–9, 2021. DOI: [10.3389/fevo.2021.692674](https://doi.org/10.3389/fevo.2021.692674).

Mortazavi, S. M. et al. “Evaluating the frequency of carbapenem and aminoglycoside resistance genes among clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from Ahvaz, south-west Iran.” **New Microbes and New Infections**, v. 38, p. 100779, 2020. DOI: 10.1016/j.nmni.2020.100779.

Ma, Z.; Lee, S.; Jeong, K. C. “Mitigating antibiotic resistance at the livestock-environment interface: a review.” **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 29, no. 11, p. 1683-1692, nov. 2019. DOI: [10.4014/jmb.1909.09030](https://doi.org/10.4014/jmb.1909.09030).

Martínez-Martínez, L.; Pascual, A.; Jacoby, G. A. "Quinolone resistance from a transferable plasmid." *The Lancet*, v. 351, p. 797–799, 1998.

Markland, S. et al. “High prevalence of cefotaxime resistant bacteria in grazing beef cattle: a cross-sectional study.” **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 176, 7 fev. 2019. DOI: [10.3389/fmicb.2019.00176](https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00176).

Mendonça, Pedro Henrique Penedo et al. “Farmacorresistência bacteriana em pacientes com pneumonia adquirida na comunidade.” **Brazilian Journal of Health Review**, v. 7, no. 5, p. e73672-e73672, 2024.

Minarini, L. A. et al. “Prevalence of community-occurring extended spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Brazil.” **Current Microbiology**, v. 54, no. 5, p. 335-341, 2007. DOI: 10.1007/s00284-006-0307-z.

Naeem, A.; Badshah, S.; Muska, M.; et al. “The current case of quinolones: synthetic approaches and antibacterial activity.” **Molecules**, v. 21, no. 4, p. 268, 2016.

Nathan, M.; Mugenyi, A.; Amany, M.; et al. “Assessment of bacterial contamination and antibiotic susceptibility patterns of bacteria isolated from milk collected from Biharwe in Mbarara District: Cross-sectional study.” *10.36648/2574-2868.7.2.007*, 2023.

O'Neill, J. *The Review on Antimicrobial Resistance - Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations*. Disponível em: <https://amr-review.org/>. Acesso em: 29 jul. 2024.

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, no. 2, p. 226–232, 2018. DOI: [10.4315/0362-028X.JFP-17-277](https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-277).

OECD/FAO. *Dairy and dairy products*. In: *Agricultural Outlook 2022-2031*. Paris: OECD Publishing, 2022.

Pasteran, Fernando *et al.* "Simple phenotypic tests to improve accuracy in screening chromosomal and plasmid-mediated colistin resistance in Gram-negative bacilli." **Journal of Clinical Microbiology**, v. 59, no. 1, p. e01701-20, 2020. DOI: 10.1128/jcm.01701-20.

Paterson, D. L.; Bonomo, R. A. "Extended-spectrum beta-lactamases: A clinical update." **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, p. 657-686, 2005.

Popiołek, L.; Gawrońska-Grzywacz, M. "The impact of modifying the chemical structure of Nalidixic Acid on the antimicrobial activity of its derivatives: a review." **International Research Journal of Pure and Applied Chemistry**, v. 7, p. 191–202, 2015.

Pesca, W. O. *et al.* "Teste rápido para detectar resíduos de antibióticos no leite UHT: estudo realizado no município de Ji-Paraná, Rondônia, Brasil." **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 8, p. 56809–56820, 2020. DOI: 10.34117/bjdv6n8-188.

Panwar, S. *et al.* "Advanced diagnostic methods for identification of bacterial foodborne pathogens: contemporary and upcoming challenges." **Critical Reviews in Biotechnology**, p. 1–19, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1080/07388551.2022.2095253>.

Pinilla-Redondo, R. *et al.* "Monitoring plasmid-mediated horizontal gene transfer in microbiomes: recent advances and future perspectives." **Plasmid**, v. 99, p. 56-67, 2018.

Pitout, J. D. *et al.* "Phenotypic and molecular detection of CTX-M-beta-lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp." **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5715-5721, 2004. DOI: 10.1128/JCM.42.12.5715-5721.2004.

Peirano, G.; Pitout, J. D. D. "Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: Update on molecular epidemiology and treatment options." **Drugs**, v. 79, n. 14, p. 1529-1541, set. 2019. DOI: 10.1007/s40265-019-01180-3. PMID: 31407238.

Peterson, E.; Kaur, P. "Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens." **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 2928, 2018. DOI: [10.3389/fmicb.2018.02928](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02928).

Paes, C. da S. "Caracterização dos sistemas de produção de leite bovino em um município no semiárido brasileiro." **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 22, n. 2, p. 312–320, 2023.

Rumbold, Penny et al. "The potential nutrition-, physical- and health-related benefits of cow's milk for primary-school-aged children." **Nutrition Research Reviews**, Cambridge University Press, 2021.

Rocha, Denis Teixeira da; Carvalho, Glaucio Rodrigues; Resende, João Cesar de. *Cadeia produtiva do leite no Brasil: produção primária*. **Circular Técnica** 123. Juiz de Fora, MG, ago. 2020.

Ribeiro, P. C. S. et al. "Phenotypic and molecular detection of the *blaKPC* gene in clinical isolates from inpatients at hospitals in São Luis, MA, Brazil." **BMC Infectious Diseases**, v. 16, no. 1, dez. 2016.

Romero-Barrios, P. et al. "Antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates in Canadian broiler chickens and their products." **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 17, no. 11, p. 672–678, 1 nov. 2020.

Ramos-Vivas, J. et al. "A arma molecular produzida pela bactéria *Hafnia alvei* em alimentos." **Moléculas**, v. 27, no. 17, p. 5585, 2022.

Reich, F.; Atanassova, V.; Klein, G. "Extended-spectrum β -lactamase- and AmpC-producing enterobacteria in healthy broiler chickens, Germany." **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 8, p. 1253-1259, 2013. DOI: 10.3201/eid1908.120879.

Robicsek, A. et al. "Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase." **Nature Medicine**, v. 12, p. 83–88, 2006.

Rebelo, A. R. et al. "Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes." **Euro Surveillance**, v. 23, n. 6, p. 17-00672, 2018. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672. Erratum in: *Euro Surveillance*, v. 23, n. 7.

Ruegg, P. L. "Making antibiotic treatment decisions for clinical mastitis." **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 34, p. 413–425, 2018.

Seyfi, R.; Kahaki, F. A.; Ebrahimi, T.; et al. "Antimicrobial peptides (AMPs): roles, functions and mechanism of action." **International Journal of Peptide Research and Therapeutics**, 2019, p. 1–13.

Şanlıbaba, Pınar. "Prevalence, antibiotic resistance, and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* isolated from retail raw beef, sheep, and lamb meat in Turkey." **International Journal of Food Microbiology**, v. 361, Jan. 2022, p. 109461.

Silva Júnior, Abimael E. et al. "Antimicrobial susceptibility profiles of *Staphylococcus* spp. contaminating raw goat milk." **Veterinary World**, 5 maio 2021, pp. 1074–1079.

Silva, D. B. C. et al. "Resíduos de protocolos terapêuticos empregados na Medicina Veterinária." **Investigação**, v. 18, no. 6, p. 45-52, 2019. ISSN 2177-4080.

Scholz-Ahrens, K. E.; Ahrens, F.; Barth, C. A. "Nutritional and health attributes of milk and milk imitations." **European Journal of Nutrition**, v. 59, p. 19–34, 2020.

Souza, L. B. de et al. "Resíduos de antimicrobianos em leite bovino cru no estado do Rio Grande do Norte." **Ciência Animal Brasileira**, v. 18, p. 1-6, 27 nov. 2017. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/18096891v18e-23050>.

Silva, C. R. et al. "Resistome in gram-negative bacteria from soft cheese in Brazil." **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 19, n. 3, p. 430–440, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.9771/cmbio.v19i3.35460>.

Serio, A. W. et al. "Aminoglycoside revival: review of a historically important class of antimicrobials undergoing rejuvenation." **EcoSal Plus**, v. 8, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0002-2018>.

Sierra, T. A. O. et al. "Occurrence of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in raw milk from cows with subclinical mastitis in northeast Brazil." **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 2, p. 1303–1307, 2023. DOI: 10.1007/s42770-023-00955-x.

Saladin, M. *et al.* "Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals." **FEMS Microbiology Letters**, v. 209, n. 2, p. 161-168, 2002. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb11126.x.

Shinohara, D. R. *et al.* "Evaluation of phenotypic methods for detection of polymyxin B-resistant bacteria." **Journal of Microbiological Methods**, v. 199, p. 106531, 2022. DOI: 10.1016/j.mimet.2022.106531.

Szabó, O. *et al.* "Plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Enterobacteriaceae from urine clinical samples." **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 65, n. 3, p. 255-265, 2018. DOI: 10.1556/030.65.2018.012.

Talma, S. V. *et al.* "Contagem de células somáticas e pesquisa de resíduos de antibióticos em leite cru refrigerado." **Anais Semana Nacional de Ciência e Tecnologia (SNCT)**, v. 1, n. 1, p. 575-579, 2019.

Tooke, Catherine L. *et al.* " β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century." **Journal of Molecular Biology**, v. 431, n. 18, p. 3472-3500, 2019.

Turbett, S. E. *et al.* "Intrinsic resistance to colistin in the genus *Hafnia*." *Journal of Clinical Microbiology*, . 61, p. e01326-22, 2023. DOI: [10.1128/jcm.01326-22](https://doi.org/10.1128/jcm.01326-22). Acesso em: 7 jan. 2025.

Velasova, Martina *et al.* "Detection of extended-spectrum β -lactam, AmpC and carbapenem resistance in Enterobacteriaceae in beef cattle in Great Britain in 2015." **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 4, p. 1081-1095, 2019.

Van Hoek, Angela HAM *et al.* "Transmission of ESBL-producing *Escherichia coli* between broilers and humans on broiler farms." **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 75, n. 3, p. 543-549, 2020.

Varughese, L. R.; Rajpoot, M.; Goyal, S.; *et al.* "Analytical profiling of mutations in quinolone resistance determining region of *gyrA* gene among UPEC." **PLoS One**, v. 13, n. 1, e0190729, 2018.

Wesguerber, Tiago *et al.* "A influência do uso de antimicrobianos na produção animal e o impacto nos produtos derivados destinados à alimentação humana e animal." **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 7, n. 3, p. e71369-e71369, 2024.

Wachino JI, Doi Y, Arakawa Y. Aminoglycoside Resistance: Updates with a Focus on Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. **Infect Dis Clin North Am.** 2020 Dec;34(4):887-902. doi: 10.1016/j.idc.2020.06.002.

WHO. *Global action plan on antimicrobial resistance.* [S.L.]: World Health Organization, 26 maio 2015.

WOAH. *Guide to Good Farming Practices for Animal Production Food Safety.* Paris: WOA, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance.* Genebra: WHO, 2014. Disponível em: <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/112642/?sequence=1>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Critically important antimicrobials for human medicine: 6th revision.* 2018. Disponível em: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789241515528>. Acesso em: 1 ago. 2022.

Yang, X. *et al.* "Carbapenem resistance-encoding and virulence-encoding conjugative plasmids in *Klebsiella pneumoniae*." **Trends in Microbiology**, v. 29, p. 65-83, 2021.

Yu, F. *et al.* "Multiplex PCR Analysis for Rapid Detection of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenem-Resistant (Sequence Type 258 [ST258] and ST11) and Hypervirulent (ST23, ST65, ST86, and ST375) Strains." **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 9, p. e00731-18, 2018.

Yu, K. *et al.* "Global spread characteristics of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases: A genomic epidemiology analysis." **Drug Resistance Updates**, v. 73, p. 101036, 2024. DOI: 10.1016/j.drug.2023.101036.

Zanela, M. B. *et al.* "Avaliação de Resíduos de Antimicrobianos no Leite de Vacas Jersey em Lactação: Experimento Piloto." **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, v. 366, p. 12, 2022. ISSN: 1981-5980.