

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

**Detecção fenotípica e genotípica de bactérias resistentes aos antibióticos em sucos
de frutas *in natura* provenientes de um hospital público do Rio de Janeiro**

NATHALIA DIOGO TROCADO

RIO DE JANEIRO – RJ

JULHO/2020

NATHALIA DIOGO TROCADO

DETECÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE BACTÉRIAS
RESISTENTES AOS ANTIBIÓTICOS EM SUCOS DE FRUTAS *IN NATURA*
PROVENIENTES DE UM HOSPITAL PÚBLICO DO RIO DE JANEIRO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para aquisição do título de mestre em Ciência dos Alimentos.

Orientador: Victor Augustus Marin

Catálogo informatizado pelo(a) autor(a)

T843 Trocado, Nathalia Diogo
Detecção fenotípica e genotípica de bactérias resistentes aos antibióticos em sucos de frutas in natura provenientes de um hospital público do Rio de Janeiro / Nathalia Diogo Trocado. -- Rio de Janeiro, 2020.
49 f.

Orientador: Victor Augustus Marin.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, 2020.

1. Resistência aos antibióticos. 2. Sucos de frutas. 3. Bactérias gram-negativas. I. Marin, Victor Augustus, orient. II. Título.

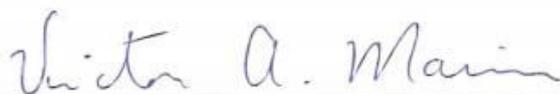
Nathalia Diogo Trocado

**DETECÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE BACTÉRIAS
RESISTENTES AOS ANTIBIÓTICOS EM SUCOS DE FRUTAS *IN NATURA*
PROVENIENTES DE UM HOSPITAL PÚBLICO DO RIO DE JANEIRO**

APROVADA EM: 09/07/2020

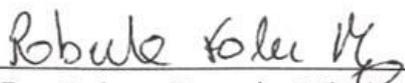
Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito para aquisição do título de Mestre em Ciência dos Alimentos.

BANCA EXAMINADORA



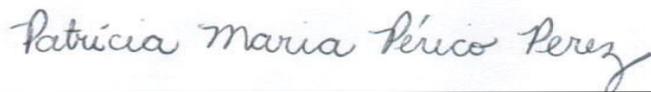
Orientador: Prof. Dr. Victor Augustus Marin

Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO)



Profa. Dra. Roberta Fontanive Miyahira

Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)



Profa. Dra. Patrícia Maria Périco Perez

Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Victor Marin, pela paciência, boa vontade e disponibilidade na condução desta pesquisa. Agradeço também à equipe do LACOMEN, em especial os doutorandos Cristiane e Marcelo e a graduanda Lilian, por todo apoio e ajuda sempre que precisei.

Finalizo agradecendo ao PPGAN/UNIRIO por me permitirem evoluir nessa trajetória profissional e à CAPES pela contemplação da bolsa de mestrado.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 : Resumo esquemático do mecanismo de ação dos antibióticos	16
FIGURA 2: Comparativo entre tubo controle e tubo resultado negativo	29
FIGURA 3: Comparativo entre tubo controle e tubo resultado positivo	29
FIGURA 4: Teste de disco difusão frente à tetraciclina	30
GRÁFICO 1: Resumo do resultado fenotípico por amostra	31
GRÁFICO 2: Comparativo entre as medições dos halos de inibição de acordo com os parâmetros do CLSI e Br CAST	32
GRÁFICO 3: Comparativo entre parâmetros do CLSI e BrCAST no total de amostras	33

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1: Resumo das características dos antibióticos a serem utilizados	24
QUADRO 2: Sequência de nucleotídeos, tamanho dos genes e referências	25
QUADRO 3: : Descrição de genes encontrados em cada isolado	35
TABELA 1: Genes de resistência encontrados no total de amostras e isolados	34

RESUMO

O surgimento rápido de bactérias resistentes ocorre em todo o mundo, colocando em risco a eficácia dos antibióticos. O excesso e uso inadequado de antibióticos pela população e na agricultura são fatores preponderantes para a rápida formação de resistência. As bactérias Gram-negativas são preocupantes porque estão se tornando resistentes a quase todas as opções de antibióticos disponíveis, principalmente em ambiente hospitalar. Diversos estudos observaram a presença de bactérias produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), com presença de genes de resistência a antibióticos, em vegetais e frutas *in natura*. Dessa forma, estes alimentos crus tornam-se potenciais veículos de bactérias produtoras de ESBL e, conseqüentemente, veículos de resistências aos antibióticos. Estudos de detecção da resistência a antibióticos em frutas ou sucos de frutas *in natura* são muito escassos, em especial a detecção genotípica. Este estudo detectou a presença de resistência fenotípica e genotípica em sucos de frutas *in natura* servidos a pacientes internados em um hospital do Rio de Janeiro. Os genes *shv*, *tem*, *ctx*, *tetA*, *tetB* e *oxa-48* foram encontrados nas amostras, inclusive, a presença de integrons de classe 2 e 3. Podemos concluir que a metodologia de isolamento permite a detecção de um maior número de genes e alerta sobre o risco do consumo deste alimento em hospitais.

Palavras -chave: resistência à antibiótico, bactérias Gram- negativas, sucos de frutas

ABSTRACT

The rapid emergence of resistant bacteria occurs worldwide, endangering the effectiveness of antibiotics. The excess and inappropriate use of antibiotics by the population and in agriculture are preponderant factors for the rapid formation of resistance. Gram-negative bacteria are worrisome because they are becoming resistant to almost all antibiotic available options, mainly in hospital environment. Several studies have noted the presence of bacteria producing extended-spectrum beta-lactamase (ESBL), with the presence of antibiotic resistance genes in fresh vegetables and fruits. In this way, this raw foods become potential vehicles of ESBL-producing bacteria and, consequently, resistance to antibiotics. Studies with detection of antibiotic resistance in fresh fruits or fruit juices are very scarce, especially genotypic detection. This study detected the presence of phenotypic and genotypic resistance in fresh fruit juices served to patients admitted to a hospital in Rio de Janeiro. The *shv*, *tem*, *ctx*, *tetA*, *tetB* and *oxa-48* genes were found in the samples, including the presence of class 2 and 3 integrons. We can conclude that the isolation methodology allows the detection of a greater number of genes and warns about the risk of consuming this foods in hospitals.

Keywords: antibiotic resistance , Gram-negative bacteria, fresh fruits juices

SUMÁRIO

1. Introdução	10
2. Revisão Bibliográfica	11
2.1. Produção e consumo brasileiros de frutas	11
2.2. Resistências aos antibióticos	12
2.2.1. Uso de antibióticos na agricultura	13
2.2.2. Antibióticos e seus mecanismos de ação	14
2.2.3. Mecanismos de resistência aos antibióticos	16
2.3. Bactérias gram- negativas e ESBL	17
2.4. Vegetais como veículos de bactérias resistentes	19
3. Justificativa	21
4. Objetivos	21
4.1. Objetivos gerais	21
4.2. Objetivos específicos	21
5. Materiais e Métodos	22
5.1. Amostragem	22
5.2. Métodos	22
5.2.1. Extração de DNA	24
5.2.2. Identificação dos genes de resistência/Reação em cadeia da polimerase	25
5.2.3. Eletroforese em gel de agarose	28
6. Resultados	28
6.1. Etapa de pré- seleção	28
6.2. Etapa de Disco difusão	29
6.3. CLSI x BrCAST	31
6.4. Resistência Genotípica	33
7. Discussão	36
7.1. Genes de resistência	39
7.1.1. Beta- lactamases	39
7.1.2. Carbapenamases	40

7.1.3. Integrons	40
7.1.4. Genes de resistência a tetraciclina	41
8. Conclusão	42
9.Referências bibliográficas	43

1. INTRODUÇÃO

O surgimento rápido de bactérias resistentes aos antibióticos ocorre em todo o mundo, colocando em risco a eficácia desses medicamentos. A crise de resistência aos antibióticos foi atribuída ao uso excessivo e uso indevido dos mesmos, bem como à falta do desenvolvimento de novas drogas pela indústria farmacêutica (VENTOLA, 2015; WANG, 2012).

Um relatório escrito pelo economista Jim O’neill (*The Review on Antimicrobial resistance*), estimou que cerca de 700.000 pessoas morrem todos os anos devido a HIV, tuberculose, malária e, inclusive, devido à cepas resistentes aos antibióticos em infecções bacterianas comuns. A utilização inadequada dos antimicrobianos pela população, o uso em animais de criação nas áreas rurais e nos plantios tem contribuído para o aumento da resistência aos antibióticos. A exemplo das bactérias produtoras de beta-lactamases, enzimas que conferem genes de resistência a antibióticos, tem como fontes animais de fazenda, água residual, humanos saudáveis e vegetais (CDDEP, 2015; SILVEIRA et al., 2006; VENTOLA, 2015; SAID et al., 2015; MAIA, 2009; O’Neil, 2016).

Diversos estudos demonstraram que vegetais crus, prontos para consumo tem apresentado agentes produtores de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), tornando-se principais veículos de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) e reservatórios de bactérias resistentes a antibióticos (CDDEP, 2015; DA MATA, 2013; SAID et al., 2015, KIM et al., 2015; MARGOT et al., 2016; JACKSON et al., 2013).

As bactérias Gram-negativas são preocupantes porque estão se tornando resistentes a quase todas as opções de antibióticos disponíveis, criando situações que remanesçam a era pré-antibiótico. (VENTOLA, 2015) Enterobactérias foram descritas em mais da metade de isolados clínicos de hospitais brasileiros, parte sendo produtoras de ESBL e apresentando resistência a antibióticos de última geração (LAGO et al, 2016). Isolados clínicos de um hospital brasileiro apresentaram presença de enterobactérias em 54,2% dos isolados e, desses, 24,8% eram positivas para produção de ESBL, sendo que 100% das cepas isoladas e produtoras de ESBL foram resistentes a todas as cefalosporinas e aztreonam e 71,6% resistentes a trimetoprim- sulfametoxazol. A produção de ESBLs foi detectada em cinco gêneros diferentes de enterobactérias, além de *E. coli* e *Klebsiella* sp., mostrando a

disseminação desse mecanismo de resistência na família *Enterobacteriaceae* (LAGO et al, 2016).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. PRODUÇÃO E CONSUMO BRASILEIROS DE FRUTAS

O novo guia alimentar para a população brasileira recomenda o consumo de alimentos *in natura* ou minimamente processados em grande variedade e predominantemente de origem vegetal como base da alimentação do brasileiro, frutas frescas e sucos de frutas frescas sem adição de açúcar ou outras substâncias são indicados (BRASIL, 2014). Frutas e hortaliças são alimentos considerados indispensáveis à prevenção e manutenção da saúde por conterem diversos componentes essenciais para a saúde, como vitaminas, minerais, fibras e compostos bioativos. O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, estando atrás apenas da China e Índia, ocupando a vigésima-terceira posição entre os principais exportadores mundiais do setor. O consumo de frutas por adultos teve aumento significativo no período de 2006-2018 no percentual de consumo regular de frutas no Brasil (COMEX, 2017; SILVA & CLARO, 2019).

Diversos estudos demonstraram a presença de frutas em dietas hospitalares oferecidas a pacientes internados, funcionários e acompanhantes, em cidades brasileiras, nas formas *in natura*, papa ou purê de fruta, suco ou vitamina (PEREIRA, 2017; ROCHA, 2019; FERNANDES, 2018).

2.2. RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS

A resistência aos antibióticos é um processo natural que tem sido observada desde a descoberta dos primeiros antibióticos regida pelo princípio evolutivo da adaptação genética de organismos a mudanças no seu meio ambiente (SILVEIRA et al., 2006; O'Neill, 2016). Assim, as bactérias tornam-se resistentes aos antibióticos devido a pressão seletiva exercida pela frequente exposição das mesmas aos fármacos. (LOUREIRO et al, 2016)

A resistência bacteriana aos antibióticos se tornou um dos problemas de saúde pública mais relevantes atualmente, uma vez que estes microrganismos sobrevivem a exposição aos medicamentos que deveriam causar a lise ou inibição de seu crescimento. Isso permite que as cepas sobreviventes cresçam e se espalhem devido, também, à falta de concorrência com outras cepas, gerando as popularmente chamadas "superbactérias". Dessa forma, as bactérias anteriormente susceptíveis aos antibióticos usualmente utilizados, passam a deixar de responder efetivamente a esses fármacos (LOUREIRO et al, 2016; O'Neill, 2016).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2010), a resistência aos antibióticos tem crescido perigosamente em diversas partes do mundo, ameaçando o tratamento de infecções comuns. A organização alerta ainda, que mesmo com o desenvolvimento de novos medicamentos, se não houver mudança no comportamento da população, como ações de higiene básica, lavagem das mãos, uso de preservativos e higiene dos alimentos, por exemplo, a resistência permanecerá como uma grande ameaça (OMS, 2010).

Uma efetiva redução da população bacteriana obtida pelo agente quimioterápico é suficiente para o combate aos invasores, porém se a infecção for causada por uma população de bactérias inteiramente resistentes ao fármaco ou se as defesas humanas estiverem momentaneamente deficientes o combate natural do organismo não ocorrerá (SILVEIRA et al, 2006). Diversas mortes por infecções onde houve resistência bacteriana já foram relatadas em algumas regiões do mundo como na União Europeia, Índia, Tailândia, e Estados Unidos, registrando de 25.000 a mais de 38.000 mortes por ano, além do tempo de hospitalização aumentado (CDC, 2017).

A resistência aos antibióticos é resultado do seu uso crescente e indiscriminado. Um medicamento que ao mesmo tempo que salva vidas, também gera resistência quando usado de forma desnecessária. (CDDEP, 2015) O CDC (2017) lista diversas causas para a ocorrência da resistência bacteriana aos antibióticos, são elas: prescrição excessiva de antibióticos, o uso

incorreto do antibiótico prescrito por parte do paciente, a utilização desnecessária do medicamento na agricultura, falha no controle de infecções em hospitais e clínicas, higiene e saneamento deficientes e falta de testes laboratoriais rápidos.

2.2.1. USO DE ANTIBIÓTICOS NA AGRICULTURA

Antimicrobianos têm sido utilizados para o controle de certas doenças de origem bacteriana em frutos e vegetais. No plantio em campo e em ambientes protegidos, face ao problema causado por agentes fitopatogênicos como as bactérias, além de outros como insetos, ácaros e fungos, têm-se usado principalmente substâncias químicas para o controle como também para a preservação das colheitas. Porém a aplicação de maneira repetida e frequente leva à seleção e predominância, na população bacteriana, de indivíduos com resistência aos princípios ativos (MAIA, 2009).

Outro fato pertinente é a alta demanda por consumo de proteína animal. O uso de doses sub-terapêuticas a animais de criação são fatores preponderantes para a rápida formação de resistência. (CDDEP, 2015; SILEIRA et al., 2006) O uso de antibióticos em animais é necessário para o tratamento de doenças e para segurança alimentar, porém o objetivo principal de uso não tem sido este. Os antibióticos são utilizados como suplementos de crescimento nos animais, tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento. Nos EUA, por exemplo, aproximadamente 80% dos antibióticos vendidos são utilizados em animais para promover crescimento e prevenir infecções (O'Neil, 2016; VENTOLA, 2015). Justifica-se o uso de antibióticos no gado para melhorar a saúde geral dos animais, produzindo um maior rendimento e, conseqüentemente, um produto de qualidade superior (O'Neil, 2016; VENTOLA, 2015).

Até 90% dos antibióticos administrados ao gado são excretados em urina e fezes, amplamente dispersos através de fertilizantes, águas subterrâneas e escoamento superficial. Um grande número de animais que vivem em proximidade de humanos ou em condições não higiênicas podem atuar como reservatório de resistência e acelerar sua propagação (O'Neil, 2016; VENTOLA, 2015).

O principal risco à saúde humana decorrente do uso de antibióticos em animais e vegetais é que as bactérias podem desenvolver resistência aos mesmos, seja por mutação,

aquisição de genes ou a combinação de ambos. Bactérias resistentes a antibióticos preocupam uma vez que também podem ser transmitidas ao homem pela ingestão de alimentos contaminados (BAMBUI, ANCHIETA, 2004; MAIA, 2009).

Segundo o CDDEP (2015), o Brasil é o terceiro maior consumidor de antibióticos para criação de animais, estando atrás apenas da China e dos Estados Unidos.

2.2.2. ANTIBIÓTICOS E SEUS MECANISMOS DE AÇÃO

BETA-LACTÂMICOS

Os antibióticos beta-lactâmicos possuem em sua estrutura o anel beta-lactâmico, o qual confere ao fármaco ação bactericida. Os beta-lactâmicos têm como mecanismo de ação a inibição da síntese da parede celular através da ligação do anel beta-lactâmico às proteínas ligadoras de penicilina (PBPs, Penicillin-Binding Proteins). As PBPs são enzimas bacterianas que atuam no processo de transpeptidação durante a biossíntese da parede celular das bactérias e são inativadas após os beta-lactâmicos ligarem-se nelas, ocorrendo assim a inibição da síntese da parede celular e lise osmótica da bactéria. Estruturas anelares adicionais ou grupos substituintes acrescentados ao anel β -lactâmico determinam se o agente é: penicilina (espectro de atividade da penicilina inclui principalmente bactérias gram-negativas, que não produzem β lactamase) e combinações penicilina com inibidor de beta-lactamases (incluem uma penicilina e um segundo agente que possui atividade antibacteriana mínima, mas funciona como inibidor de algumas β -lactamases), cefens (principalmente as subclasses das cefalosporinas e cefamicinas), combinações cefalosporinas com inibidor de beta-lactamases, monobactâmico (aztreonam) e penens (principalmente a sub classe dos carbapenêmicos) (ANDRADE & DARINI, 2017; BAPTISTA, 2013; DOS SANTOS et al, 2018, CLSI, 2003).

QUINOLONAS

Os antibióticos da classe das quinolonas tem como mecanismo de ação a inibição da síntese do ácido nucléico. O fármaco age inibindo a enzima DNA girase ou topoisomerase II, essencial à sobrevivência da bactéria. A inibição dessa enzima impede a duplicação do DNA, ficando sua estrutura tridimensional modificada. As fluoroquinolonas foram desenvolvidas a partir do acréscimo de um átomo de flúor na posição 6 do anel quinolônico, aumentando o espectro de ação para os bacilos gram-negativos, sendo a ciprofloxacina principal representante (ANVISA, 2007; BAPTISTA, 2013; DOS SANTOS et al, 2018).

AMINOGLICOSÍDEOS E TETRACICLINAS

Os aminoglicosídeos são usados, principalmente, para tratar infecções contra bacilos gram-negativos, enquanto que as tetraciclina têm espectro de ação para gram-negativos e gram-positivos, ambos atuando como inibidores da síntese protéica bacteriana em nível ribossômico, na subunidade 30S (CLSI, 2003; DOS SANTOS et al, 2018).

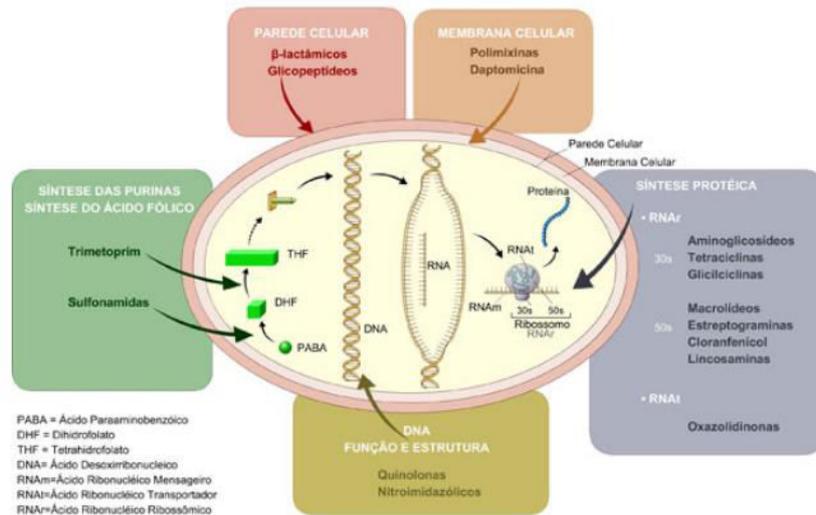
CLORANFENICOL

O cloranfenicol faz parte de uma classe chamada “classe de dose única”. Representam agentes antimicrobianos para os quais não há produtos relacionados que sejam apropriados para testes in vitro. Este agente, assim como os aminoglicosídeos e tetraciclina, atua inibindo a síntese protéica, porém na subunidade 50S do ribossomo (CLSI, 2003, DOS SANTOS et al, 2018).

SULFONAMIDA + DIAMINO PIRIMIDINA

Essa combinação faz parte de um grupo que abrange vários agentes quimioterápicos com espectros de atividade similares que resultam na inibição da via metabólica do folato nas bactérias. Em geral, a sulfametoxazol é testada em combinação com o trimetoprim, com ação pelo seu efeito sinérgico, aumento o poder bacteriostático (ANVISA, 2007; CLSI, 2003).

Um resumo dos mecanismos de ação dos antibióticos está representado na figura 1.



ANVISA, 2007

Figura 1: Resumo esquemático do mecanismo de ação dos antibióticos

2.2.3. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS

Os principais mecanismos de resistência aos antibióticos são: redução ou defeito na permeabilidade da membrana externa, sistemas de efluxo hiperexpressos, alteração do sítio alvo, proteção ou bloqueio do sítio alvo e produção de enzimas que degradam ou modificam antibióticos (ANDRADE & DARINI, 2017).

A modificação da permeabilidade do antibiótico pela membrana pode dever-se às alterações estruturais, do número, da seletividade ou do tamanho das porinas. Os antibióticos como os β-lactâmicos, fluoroquinolonas e tetraciclínas penetram no interior da célula através de porinas presentes na membrana externa. Modificações genéticas podem causar diminuição na função ou diminuição da quantidade de porinas e levar à resistência da bactéria ao antibiótico. (BAPTISTA, 2013; CASTANHEIRA, 2013)

Uma das formas de resistência é a modificação do alvo específico, interferindo com a síntese de proteínas (aminoglicosídeos, tetraciclínas). Caracteriza-se pela diminuição ou até ausência de afinidade do antibiótico ao local de ligação. Esta ocorre por alteração da estrutura do peptidoglicano, interferência na síntese de proteínas ou na síntese de DNA (BAPTISTA, 2013; CASTANHEIRA, 2013).

As bombas de efluxo são proteínas presentes nas membranas e neste tipo de resistência ocorre um efluxo, ou seja, o transporte ativo dos antibióticos do meio intracelular para o meio extracelular, o que resulta numa diminuição da concentração do antibiótico no interior da célula. Este mecanismo afeta todas as classes de antibióticos, principalmente macrolídeos, tetraciclina e fluoroquinolona (PEREIRA- MAIA, 2010; BAPTISTA, 2013; CASTANHEIRA, 2013).

O mecanismo enzimático de resistência devido a inativação do fármaco resulta da produção, pela bactéria, de enzimas que degradam ou inativam o antibiótico, como é o caso das enzimas beta- lactamases, ocorrendo hidrólise do anel beta-lactâmico. As beta- lactamases podem atuar utilizando íons de zinco, as chamadas metalobetalactamases, causando a ruptura do anel ou pela via éster-serina. (BAPTISTA, 2013; DIAS, 2009)

2.3.BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS E ESBL

Os microrganismos mais frequentemente envolvidos em infecções hospitalares são as bactérias gram-negativas, estando presentes em mais de 80% dos isolados clínicos, sendo comuns os relatos de eventos de resistência a antibióticos (DA MATA, 2013; ANDRADE E ARAUJO, 2016). As taxas de resistência aos carbapenêmicos e às cefalosporinas de amplo espectro (terceira e/ou quarta gerações) foram de 9,7% para *Escherichia coli*, 43,3% para *Klebsiella pneumoniae* e 21,6% para *Enterobacterspp* em ambiente hospitalar notificados em 2015 (BRASIL, 2017).

Antibióticos do tipo carbapenêmicos (beta-lactâmicos) são normalmente os mais utilizados para tratamentos de infecções ocasionadas por bactérias gram-negativas devido a sua eficácia. São geralmente utilizados como drogas de reserva no tratamento de infecções por cepas resistentes a outros agentes beta-lactâmicos, sendo recomendado o uso restrito do mesmo (DA MATA, 2013).

As beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) são uma família de enzimas produzidas por bactérias gram-negativas que conferem resistência a alguns dos antibióticos mais amplamente prescritos no mundo. Com a pressão seletiva do uso de cefalosporinas de 3ª geração (amplo espectro), mutações em genes como *blaTEM-1*, *blaTEM-2* e *blaSHV-1*

promoveram amplificação e divergência nesses genes e as enzimas codificadas passaram a conferir espectro de hidrólise estendido às cefalosporinas de 3^a e 4^a gerações. As ESBL podem inativar todas as penicilinas e cefalosporinas, incluindo cefalosporinas de terceira geração (ceftriaxona, cefotaxima e ceftazidima) e monobactâmico (aztreonam) (CDDEP, 2015; ANDRADE & DARINI, 2017).

As principais beta-lactamases produzidas por bacilos gram-negativos que apresentam destaque na resistência a antibióticos podem ser agrupadas em quatro classificações, sendo estas, as cefamicinases (AmpCs), cefalosporinases, beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) e carbapenemases. As cefamicinases degradam cefamicinas e cefalosporinas de 1^a e 2^a gerações, porém ao ocorrer a hiperprodução de AmpCs, as cefalosporinas de 3^a geração e monobactâmico (aztreonam) também podem ser degradados. As cefalosporinases são beta-lactamases de espectro restrito, enzimas capazes de degradar penicilinas e cefalosporinas de 1^a e 2^a gerações. Com o uso excessivo de carbapenêmicos, a seleção e disseminação de bactérias resistentes a estes antibióticos passou a ocorrer, entre outros mecanismos, devido à produção de beta-lactamases, denominadas então “carbapenemases”, enzimas com o maior espectro/potencial de degradação de beta-lactâmicos. Esse grupo de enzimas, além dos carbapenêmicos, tem potencial para hidrolisar praticamente todos os beta-lactâmicos (ANDRADE & DARINI, 2017).

Na Europa, a maioria dos países relatou que quase 100% das *E. coli* e *K. pneumoniae* isoladas eram positivas para ESBL. Em países como EUA, Canadá, Nova Zelândia e Austrália também foram relatados presença de *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL (O’Neil, 2016). Algumas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo, tornaram-se capazes de produzir potentes beta-lactamases devido às mutações e seleções naturais relacionadas ao uso excessivo de antibióticos (DA MATA, 2013).

Isolados clínicos de um hospital brasileiro apresentaram presença de enterobactérias em 54,2% dos isolados e, desses, 24,8% eram positivas para produção de ESBL, sendo que 100% das cepas isoladas e produtoras de ESBL foram resistentes a todas as cefalosporinas e aztreonam e 71,6% resistentes a SXT. A produção de ESBLs foi detectada em cinco gêneros diferentes de enterobactérias, além de *E. coli* e *Klebsiella* sp., mostrando a disseminação desse mecanismo de resistência na família *Enterobacteriaceae* (LAGO et al, 2016).

Infecções por bactérias resistentes limitam as opções terapêuticas, conseqüentemente, ocorre aumento no tempo de hospitalização do paciente e na utilização de fármacos de última escolha, contribuindo para a seleção de bactérias resistentes aos antibióticos. Porém, as enterobactérias produtoras de beta-lactamases (ESBL- Eb), não provém somente de contextos hospitalares, mas também são disseminadas em outros ambientes, tendo como fontes, por exemplo, animais de fazenda, água residual, humanos saudáveis e vegetais (SAID et al., 2015; ANDRADE & DARINI, 2017).

2.4. VEGETAIS COMO VEÍCULOS DE BACTÉRIAS RESISTENTES

Os vegetais prontos para consumo são populares devido à sua conveniência e aceitação pelos consumidores. No entanto, também foi reconhecido que esses produtos poderiam levar o risco de iniciar surtos de patógenos transmitidos pelos alimentos (KIM ET et al., 2015). Vegetais *in natura* podem ser potenciais veículos de bactérias causadoras de doenças transmitidas por alimentos (DTAs). Na Europa e nos EUA, surtos foram relatados devido a vegetais frescos (tomate e espinafre) e brotos contaminados por *Escherichia coli* e *Salmonella* (OLAIMAT & HOLLEY, 2012).

Nas áreas rurais, os vegetais podem ser contaminados com ESBL pelo uso de estrume ou por água de irrigação. Esta contaminação pode ocorrer através do contato direto com o solo e através da aplicação de estrume e águas residuais como biofertilizantes (SAID et al., 2015; JONES-DIAS et al., 2016). Sementes germinadas, por exemplo, já foram associadas a vários surtos alimentares, constituindo papel potencial como transportadoras de bactérias resistentes aos antibióticos. As sementes utilizadas na produção de brotos podem ser contaminadas através da aplicação de água contaminada que é usada para irrigação (MARGOT et al., 2016). ESBL já foram detectadas em amostras de água residual para irrigação agrícola, no solo e em vegetais (SAID et al, 2015).

Já foi comprovada a presença de beta lactamases de espectro estendido (ESBL) em amostras de vegetais ao redor do mundo. Sementes e brotos originárias na Suíça foram positivas para Enterobactérias produtoras de ESBL (*Klebsiella variicola*, *Enterobacter cloacae* e *E. coli*). Os isolados *Klebsiella variicola* e *Escherichia coli* abrigaram o gene blaCTX-M-14 clinicamente importante, enquanto o blaCTX-M-3 estava presente no isolado

Enterobacter cloacae, sendo as três amostras resistentes à ampicilina, cefalotina e cefotaxima. O isolamento de *E. coli* foi adicionalmente resistente à tetraciclina e ao isolado *Enterobacter cloacae* para amoxicilina-ácido clavulânico (MARGOT et al., 2016). A presença de *Klebsiella variicola* produtora de carbapenamase foi detectada em vegetais frescos provenientes de mercados locais na Suíça, importados da Ásia, comparável à situação encontrada com *Enterobacteriaceae* produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (ZURFLUH et al., 2015; QUEENAN, 2007). Na Europa ainda, verificou-se a presença de bactérias produtoras de ESBL em vegetais importados da Índia, Vietnã, República Dominicana e Tailândia. Destas, 43,3% foram identificados como *E. coli*, 43,3% foram classificados como *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, 10% foram *Enterobacter cloacae*, 1,7% foi *Enterobacter aerogenes* e 1,7% foi *C. sakazakii* (ZURFLUH et al., 2015).

Em Portugal, 86% das amostras de vegetais prontos para consumo analisados, apresentaram condições microbiológicas insatisfatórias, de acordo com os parâmetros do país, e sugere que o comércio internacional de produtos alimentícios contribua para a disseminação de microrganismos patogênicos. E a presença da família *Enterobacteriaceae* foi detectada em 184 amostras de frutas e vegetais *in natura*, apresentando resistência aos antibióticos ampicilina, aminoglicosídeos, cloranfenicol e sulfonamidas (CAMPOS et al., 2013; JONES-DIAS et al., 2016). Recentemente, genes de resistência bacteriana (*citrobacter* spp) a diversos antibióticos incluindo tetraciclina, gentamicina, cefotaxime (beta-lactâmico) e imipenem (beta-lactâmico) foram descritos em frutas e vegetais na Nigéria (ADEGUN et al., 2019).

A presença de genes de resistência a antibióticos que codificam para beta-lactamases (SHV e CTX) e carbapenemases (OXA-48), produzidas por bactérias gram-negativas, inclusive com a presença de integron 1, presentes em solos brasileiros de cultivo de frutas e vegetais foram descritos recentemente (FURLAN et al., 2019).

3. JUSTIFICATIVA

O consumo de frutas e sucos de frutas *in natura* e minimamente processados é altamente recomendado no Brasil, devido a seus benefícios nutricionais, fazendo parte de dietas hospitalares. Muitos estudos ao redor do mundo demonstraram a presença de bactérias gram-negativas resistentes a antibióticos e produtoras de beta-lactamases em vegetais e frutas a serem consumidos crus. Dessa forma, estes alimentos podem tornar-se veículos de

bactérias resistentes aos antibióticos contribuindo para a disseminação da resistência. No entanto, estudos de avaliação da resistência a antibióticos em frutas ou sucos de frutas realizados até o presente momento são escassos. A coleta e o compartilhamento de dados a respeito da presença de bactérias resistentes a antibióticos são algumas das demandas requeridas por órgãos internacionais a fim de monitorar e contribuir para decisões políticas relacionadas ao tema.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Detectar fenotípica e genotipicamente bactérias resistentes aos antibióticos em sucos de frutas *in natura*, preparados em unidade de serviço de nutrição de um hospital do Rio de Janeiro.

4.2. Objetivos específicos

- Identificar fenotipicamente a presença de bactérias gram-negativas resistentes aos antibióticos em sucos de frutas;
- Identificar a presença de genes que conferem resistência aos antibióticos em bactérias presentes em sucos de frutas e detectar a presença da família *Enterobacteriaceae*;
- Realizar comparação entre os parâmetros do CLSI e BrCAST de medição dos halos nos testes de disco difusão.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 AMOSTRAGEM

Foram analisadas oito amostras de isolados de bactérias de sucos de frutas naturais, sendo 3 unidades de sucos de laranja, 2 de caju, 2 de manga e 1 de abacaxi, provenientes de um hospital público da cidade do Rio de Janeiro, produzidos na unidade de alimentação e nutrição do próprio hospital, os quais seriam destinados a pacientes internados.

Cada unidade de suco foi coletada em dias e horários diferentes. A coleta das amostras no local não foi previamente informada ao setor e colaboradores, a fim de não provocar alterações na rotina de preparo.

5.2 MÉTODOS

Foram analisados isolados de bactérias de sucos de frutas "in natura" de estudos anteriores armazenados em laboratório à temperatura de -18°C.

O perfil da resistência a antimicrobianos foi identificado através da técnica de difusão em disco, de acordo com protocolos M02-A12 (2015) e M100-S27 (2017) do Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Os agentes antimicrobianos a serem empregados estão descritos no quadro 1.

Foi adicionado 50 microlitros dos isolados em estoque à 5mL de Caldo GN (Gram-negativo) que tem por finalidade o enriquecimento seletivo para o cultivo de organismos Gram-negativos (Himedia, Índia) e incubados por 24 horas a 35°C ± 2°C para pré-enriquecimento.

Objetivando a pré-seleção de microbiota resistente, após 24 horas, 50 microlitros do caldo foram retirados e colocados em tubos contendo 5 mL de Caldo tripton de soja- TSB (Oxoid, Reino Unido) juntamente com os discos de antibióticos descritos no quadro 1 (Oxoid, Reino Unido) (CDC, 2008). Foram selecionados 11 antibióticos, um de cada classe, totalizando 88 possíveis isolados. Os antibióticos usados foram: Cefepima (30µg), Ertapenem (10 µg), Gentamicina (10 µg), Ampicilina (10 µg), Ampicilina Sulbactam (10/10 µg),

Cloranfenicol (30 µg), Tetraciclina (30 µg), Ciprofloxacina (5 µg), Ceftazidima (30 µg) e Trimetoprima Sulfametoxazol (1.25/ 23.75 µg) e Aztreonam (30 µg). A etapa de pré-seleção foi realizada em triplicata para cada antibiótico testado.

Após 24 horas, todos os tubos que apresentaram crescimento (turvação) foram inoculados em placa de Agar MacConkey, sendo a utilização deste meio uma adaptação do protocolo original, o qual seria usado Agar Mueller Hinton, com o objetivo de selecionar bactérias gram- negativas apenas. O disco de antibiótico de cada classe foi colocado na superfície da placa recém-semeada e esta colocada a $35^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C por 16-18 horas (CDC, 2008; CLSI M02-A12, 2015). Também foi realizada triplicata para cada antibiótico nesta etapa.

Após 16-18 horas de incubação, cada placa foi examinada e os diâmetros dos halos de inibição mensurados e avaliados de acordo com a tabela do CLSI (CLSI M100-S27, 2017). Os valores de referência se encontram resumidos no quadro 1.

Quadro 1: Resumo das características dos antibióticos a serem utilizados (CLSI, 2017).

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

5.2.1. EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA dos isolados considerados resistentes e intermediários após mensuração dos halos, foi realizada de acordo com as instruções do fabricante do kit

comercial para extração de DNA genômico de bactérias Gram-negativas Easy Pure Micro Genomic DNA KIT (TransGen Biotech Co., China).

5.2.2. IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA/REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

Isolados intermediários e resistentes foram analisados por PCR para os genes descritos no quadro 2. Os primers foram sintetizados pela Eurofins Genomics (Ebersberg, Alemanha) e Invitrogen Thermo Fisher Scientific (California, EUA) baseados em sequências de oligonucleotídeos previamente publicadas.

Quadro 2: Sequência de nucleotídeos, tamanho dos genes e referências.

Primer	Sequência (5' - 3')	Condições da PCR	Produto	Referência
tem (F)	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	10 min a 94 °C; 30 ciclos de 40s a 94 °C, 40 s a 60 °C, 60 s a 72 °C; e 7 min de extensão final a 72 °C.	800	Dallenne, 2010
tem (R)	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC			
shv (F)	AGCCGCTTGAGCAAATTAAC	10 min a 94 °C; 30 ciclos de 40s a 94 °C, 40 s a 60 °C, 60 s a 72 °C; e 7 min de extensão final a 72 °C.	713	Dallenne, 2010
shv (R)	ATCCCGCAGATAAATCACCA			
oxa (F)	GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG	10 min a 94 °C; 30 ciclos de 40s a 94 °C, 40 s a 60 °C, 60 s a 72 °C; e 7 min de extensão final a 72 °C.	564	Dallenne, 2010
oxa (R)	GGCACCAGATTCAACTTCAAG			
int - 1 (F)	CTGCGTTCGGTCAAGTTCT	03 min a 94 °C; 35 ciclos de 60s a 94 °C, 60 s a 68 °C, 60 s a 72 °C; e 7 min de extensão final a 72 °C.	882	Lanz, 2003
int - 1(R)	GGAATGGCCGAGCAGATCCT			

int - 2 (F)	CACGGATATGCGACAAAAAGG	03 min a 94 °C; 35 ciclos de 60s a 94 °C, 60 s a 68 °C, 60 s a 72 °C; e 7 min de extensão final a 72 °C.	788	Lanz, 2003
int - 2 (R)	GTAGCAAACGAGTGACGAAATG			
int - 3 (F)	GCCTCCGGCAGCGACTTTCAG	03 min a 94 °C; 35 ciclos de 60s a 94 °C, 60 s a 68 °C, 60 s a 72 °C; e 7 min de extensão final a 72 °C.	979	Lanz, 2003
int - 3 (R)	ACGGATCTGCCAAACCTGACT			
ctx - M (F)	ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC	15 min a 95 °C; 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 60 °C, 2 min a 72 °C; e 10 min de extensão final a 72 °C.	593	Monstein, 2007
ctx - M (R)	TGGGTRAARTARGTSACCAGAAAYCAGCGG			
kpc (F)	GTATCGCCGTCTAGTTCTGC	05 min a 95 °C; 30 ciclos de 60 s a 95 °C, 60 s a 56 °C, 60 s a 72 °C; e 05 min de extensão final a 72 °C.	635	Azimi, 2013 (34)
kpc (R)	GGTCGTGTTTCCCTTTAGCC			
ndm (F)	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	10 min a 94 °C; 36 ciclos de 30 s a 94 °C, 40 s a 58 °C, 50 s a 72 °C; e 05 min de extensão final a 72 °C.	621	Poirel, 2011
ndm (R)	CGGAATGGCTCATCACGATC			
tet - a (F)	GGCCTCAATTCCTGACG	01 min a 94 °C; 30 ciclos de 60 s a 94 °C, 60 s a 55 °C, 2 min a 72 °C; e 10 min de extensão final a 72 °C.	372	Guillaume, 2000
tet - a (R)	AAGCAGGATGTAGCCTGTGC			
tet - b (F)	GAGACGCAATCGAATTCGG	01 min a 94 °C; 30 ciclos de 60 s a 94 °C, 60 s a 56 °C, 2 min a 72 °C; e 10 min de extensão final a 72 °C.	228	Guillaume, 2000
tet - b (R)	TTTAGTGGCTATTCTTCCTGCC			

ges-1 to 9, 11 (F)	AGTCGGCTAGACCGGAAAG	10 min a 94 °C; 30 ciclos de 40 s a 94 °C, 40 s a 60 °C, 01 min a 72 °C; e 07 min de extensão final a 72 °C	399	Dallene, 2010
ges-1 to 9, 11 (R)	TTTGTCCGTGCTCAGGAT			
per-1, 3 (F)	GCTCCGATAATGAAAGCGT	10 min a 94 °C; 30 ciclos de 40 s a 94 °C, 40 s a 60 °C, 01 min a 72 °C; and 07 min de extensão final a 72 °C	520	Dallene, 2010
per-1, 3 (R)	TTCGGCTTGACTCGGCTGA			
veb -1,6 (F)	CATTCCCGATGCAAAGCGT	10 min a 94 °C; 30 ciclos de 40 s a 94 °C, 40 s a 60 °C, 01 min a 72 °C; e 07 min de extensão final a 72 °C	648	Dallene, 2010
veb -1,6 (R)	CGAAGTTTCTTTGGACTCTG			
imp (F)	GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC	05 min a 94 °C; 35 ciclos de 50 s a 94 °C, 60 s a 50 °C, 01 min a 72 °C; e 08 min de extensão final a 72 °C	188	Zeighami, 2014
imp (R)	CCAAACCACTACGTTATCT			
vim (F)	GATGGTGTTTGGTCGCATA	15 min a 95 °C; 36 ciclos de 30 s a 94 °C, 20 s a 57 °C, 50 s a 72 °C; e 05 min de extensão final a 72 °C.	390	Karuniawati, 2013
vim (R)	CGAATGCGCAGCACCAG			
oxa 48 (F)	GCGTGGTTAAGGATGAACAC	10 min a 94 °C; 36 ciclos de 30 s a 94 °C, 40 s a 54 °C, 50 s a 72 °C; e 05 min de extensão final a 72 °C.	438	Poirel, 2011
oxa 48 (R)	CATCAAGTTCAACCCAACCG			
uni515 (F)	GTGCCAGCMGCCGCGGTA	03 min a 95 °C; 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 60 s a 67 °C, 01 min a 72 °C; e 05 min de extensão final a 72 °C.	320pb	Barman, 2008
ent826 (R)	GCCTCAAGGGCACAACCTCCAAG			

As condições de reação foram baseadas nos protocolos dos autores descritos na tabela.

5.2.3. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Todos os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% (Hexapur Bio Lab, Holanda) com Tris-Borato-EDTA (Promega, EUA) em voltagem de 90V. A visualização do gel foi realizada em transiluminador de UV (Forlab, Brasil).

6. RESULTADOS

6.1. ETAPA DE PRÉ-SELEÇÃO

Como descrito anteriormente em materiais e métodos, a etapa de pré seleção foi realizada a fim de selecionar a microbiota resistente de cada amostra frente aos 11 antibióticos antes dos testes de disco difusão. Dessa forma, foram realizados 88 pools e desses, 64 apresentaram crescimento microbiano (turvação no tubo), representando 72,7%. Os isolados que não apresentaram turvação para nenhuma das 8 amostras foram os testados para os antibióticos ertapenem, cefepime e aztreonam. As figuras 2 e 3 ilustram a etapa de pré-seleção.



Figura 2: Comparativo entre tubo controle e tubo resultado negativo (cefepime).



Figura 3: Comparativo entre tubo controle e tubo resultado positivo (tetraciclina).

6.2. ETAPA DE DISCO DIFUSÃO

Como descrito na etapa anterior, das 88 análises realizadas, apenas três dos onze antibióticos testados para cada suco, totalizando 24 pools, não apresentaram crescimento microbiano no tubo, sendo, dessa forma excluídos do teste de disco difusão. São eles: ertapenem (carbapenêmico), cefepime (cefalosporina de 4^a geração) e aztreonam (monobactâmico), todos beta-lactâmicos.

Dos 64 pools com turvação, 75% (n= 48) apresentaram resistência fenotípica, 10,9% (n=7) foram considerados como intermediários e 14% (n=9) sensíveis, após teste de disco difusão, tendo as medições de halos do CLSI como parâmetro. Em 100% das amostras houve resistência frente aos antibióticos gentamicina e ampicilina. Para cloranfenicol, ampicilina + sulbactam e tetraciclina ocorreram 87,5% (7 amostras) de resistências (figura 4) e 75% (6 amostras) para ceftazidima e trimetoprim + sulfametoxazol. Já para ciprofloxacina, nenhum dos isolados mostrou-se resistente fenotipicamente, mas em 3 amostras diferentes classificaram-se como intermediários.

Sendo assim, com a exceção dos antibióticos ertapenem, cefepime e aztreonam, todas as amostras de sucros apresentaram resistência fenotípica para, no mínimo 6 dos outros 8

antibióticos testados, podendo assim, ser constatada a presença de multirresistência. O resumo do resultado fenotípico por amostra está representado no gráfico 1.

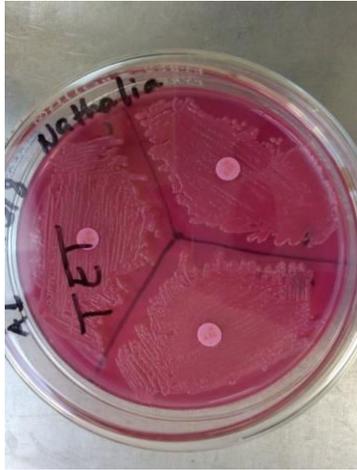
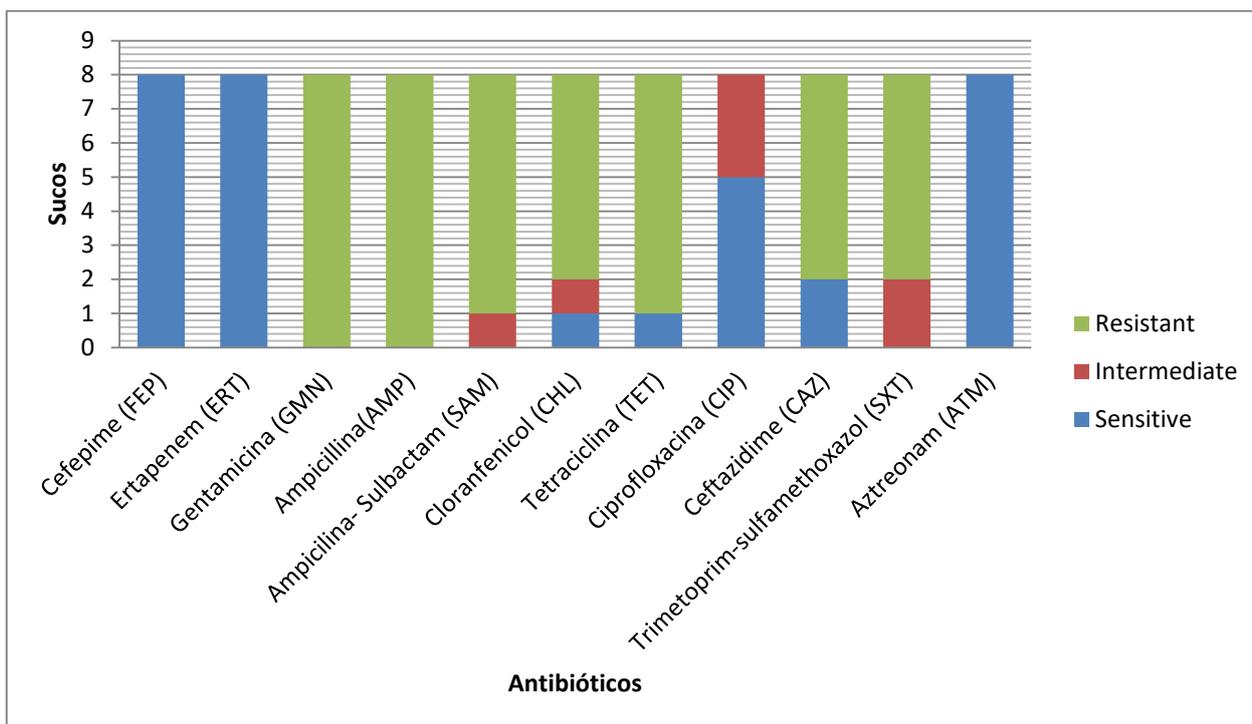


Figura 4: Teste de disco difusão frente à tetraciclina

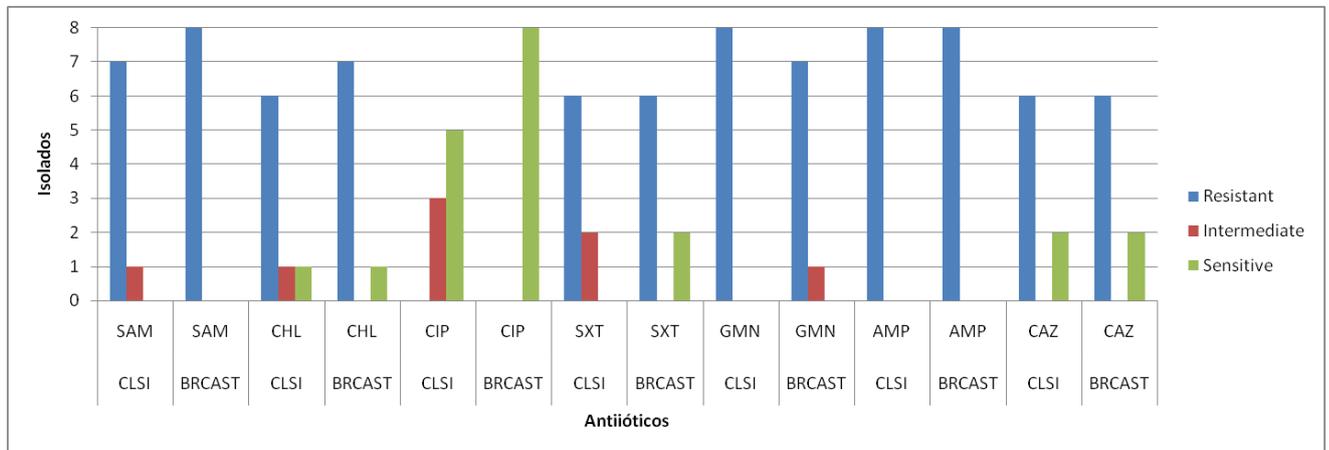
Gráfico 1: Resultado fenotípico por amostra



6.3. CLSI x BrCAST

Comparando as medições dos halos entre os protocolos do CLSI e do Comitê Brasileiro sobre Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana (BrCAST), baseado no Comitê Europeu de Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana (EUCAST), observou-se classificações diferentes em 5 amostras (A, C, E, F e G) frente a 5 antibióticos (gentamicina, ampicilina + sulbactam, cloranfenicol, ciprofloxacina e trimetoprim + sulfametoxazol). Estas diferenças mantiveram-se entre as classificações de "intermediário" e "resistente" na amostra E para os antibióticos ampicilina + sulbactam e cloranfenicol e na amostra F para gentamicina e entre a classificação de "sensível" e "intermediário" na amostra A, C e G para ciprofloxacina, nas amostras F e G para trimetoprim + sulfametoxazol. No gráfico 2 está representado o comparativo entre os parâmetros do CLSI e BrCAST de acordo com número de isolados por antibiótico por amostra.

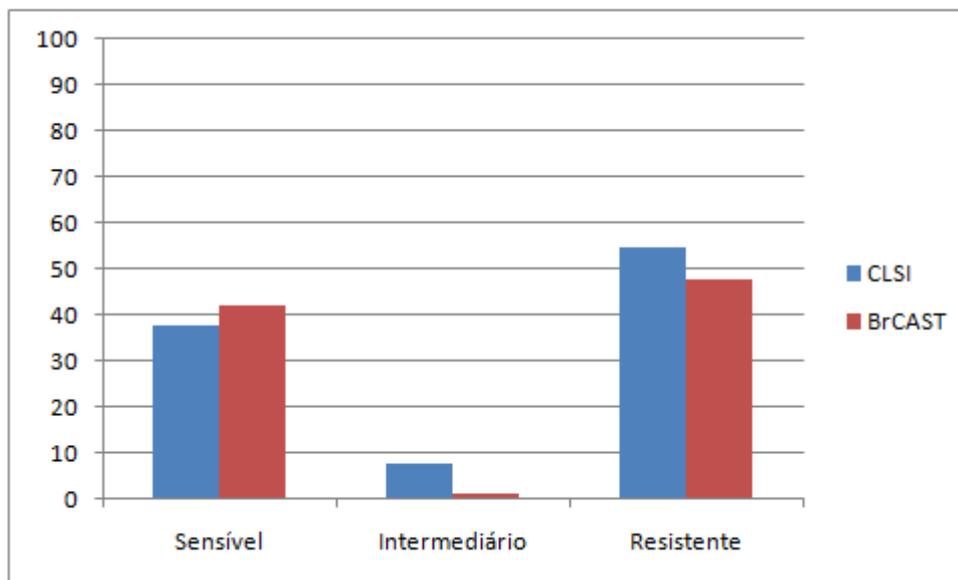
Gráfico 2: Comparativo entre as medições dos halos de inibição de acordo com os parâmetros do CLSI e Br CAST



SAM: ampicilina + sulbactam; CHL: cloranfenicol; CIP: ciprofloxacina; SXT: trimetoprim + sulfametoxazol; GMN: gentamicina; AMP: ampicilina; CAZ: ceftazidime

Para os antibióticos CAZ e AMP a classificação manteve-se semelhante. Os parâmetros do CLSI foram mais rigorosos em CIP, SXT, e GMN, apresentando maior número de isolados resistentes e intermediários. Para SAM e CHL o BrCAST demonstrou maior rigor na classificação como resistente. A tetraciclina não está incluída no gráfico pois não há parâmetro do BrCAST para este antibiótico. O gráfico 3 ilustra essa diferença em porcentagem de isolados por amostra.

Gráfico 3: Comparativo entre parâmetros do CLSI e BrCAST no total de amostras



Eixo Y valores em porcentagem

Avaliando o gráfico 3, é possível observar que os pontos de corte dos halos do protocolo do CLSI, em geral, são mais rígidos quando comparados com os pontos de corte dos halos do BrCAST.

6.4. RESISTÊNCIA GENOTÍPICA

Após os testes de disco difusão, foi realizada extração de DNA dos isolados considerados resistentes e intermediários, totalizando 55 isolados. Para cada um desses foi testada a presença de 17 genes de resistência previamente citados em literatura, além do gene da família *Enterobacteriaceae*.

Foram encontrados 8 genes de resistência diferentes, são eles: shv, tem, int2, int3, ctx, oxa-48, tetA e tetB. Considerando a soma das amostras, foram encontrados 102 genes no total. Todas as amostras apresentaram, pelo menos, 1 destes 8 genes de resistência pesquisados. Os genes não encontrados foram: int1, ges, per, veb, oxa, ndm, vim e imp. A quantidade de genes encontrados em amostras e isolados está descrita na tabela 1.

Tabela 1: Genes de resistência encontrados no total de amostras e isolados

Gene	Amostras	Isolados
Int 2	25% (2/8)	5,4% (3/55)
Int 3	12,5% (1/8)	1,8% (1/55)
shv	62,5% (5/8)	30,9% (17/55)
tem	37,5% (3/8)	12,7% (7/55)
tet A	37,5% (3/8)	14,5% (8/55)
tet B	37,5% (3/8)	9% (5/55)
ctx	25% (2/8)	7,2% (4/55)
Oxa- 48	37,5% (3/8)	16,3% (9/55)

O gene que mais apareceu nos isolados foi o shv, encontrado em 62,5% das amostras (5/8) e em 30,9% dos isolados (17/55), seguido do oxa- 48 (16,3% dos isolados) e do tet A (14,5% dos isolados). O gene menos encontrado foi o integron classe 3 (Int3) em apenas 1 isolado de 1 amostra.

Fazendo um link com o item 6.3 (CLSIxBrCAST), vale ressaltar que foi detectado o gene shv em dois isolados considerados intermediários, segundo CLSI, no teste fenotípico, amostra C (suco de manga) para CIP e amostra G (suco de manga) para SXT. Nestes dois casos, o ponto de corte do BrCAST considerou os isolados como sensíveis, o que reforça a conclusão de que os parâmetros do CLSI tendem a ser mais rigorosos. Além disso, também é um dado preocupante no caso de um teste de resistência a antibióticos for realizado a nível fenotípico levando em consideração somente um parâmetro e sem detecção de genes. Os demais isolados considerados intermediários apresentaram apenas o gene para família *Enterobacteriaceae* ou nenhum dos genes testados.

No quadro 3 é possível observar a descrição dos genes encontrados em cada isolado.

Quadro 3: Descrição de genes encontrados em cada isolado

Sucos/Antibióticos	CIP	SAM	GMN	CHL	TET	SXT	CAZ	AMP
A	Laranja	I Uni826/Ent515	Uni826/Ent515	int 2 Uni826/Ent515	Uni826/Ent515	Uni826/Ent515		Uni826/Ent515
B	Laranja	*	shv int2 ctx	Uni826/Ent515	shv Uni826/Ent515	int 2 tet A tet B Uni826/Ent515	Uni826/Ent515	shv int 2 tet B ctx
C	Manga	I shv	shv	shv Uni826/Ent515	shv Uni826/Ent515	shv Uni826/Ent515	Uni826/Ent515	shv Uni826/Ent515
D	Caju	*	shv tem tet A Oxa-48 Uni826/Ent515	tem shv Uni826/Ent515	shv Uni826/Ent515	tem tet A Uni826/Ent515	Uni826/Ent515	tet A Oxa- 48 Uni826/Ent515
E	Laranja	*	I Uni826/Ent515	tet B Uni826/Ent515	I Uni826/Ent515	tet B Uni826/Ent515	tem int3 Uni826/Ent515	tem Uni826/Ent515
F	Abacaxi	*	Uni826/Ent515	ctx Uni826/Ent515	Uni826/Ent515	Uni826/Ent515	I Uni826/Ent515	ctx Uni826/Ent515
G	Manga	I	Uni826/Ent515 shv	Uni826/Ent515 Oxa - 48	*	*	I Uni826/Ent515 shv	*
H	Caju	*	Uni826/Ent515 Oxa- 48	Uni826/Ent515 Oxa - 48 shv	Uni826/Ent515	Uni826/Ent515 Oxa- 48 shv tem tet B tet A	Uni826/Ent515 Oxa- 48 tet A	*

(*) isolados considerados sensíveis no teste fenotípico; Quadro em branco representa isolados resistentes no teste de disco difusão, porém, não foi detectada a presença de nenhum dos genes testados; (I) representa isolados classificados como "intermediários" no teste fenotípico.

Os isolados resistentes para o antibiótico ceftazidima (CAZ), apesar de apresentarem resistência fenotípica, não apresentaram nenhum dos genes testados, apenas detectada a presença da família *Enterobacteriaceae* (gene Uni 826/Ent 515) em 4 isolados de 4 amostras diferentes (B, C, D e F).

Dos dois isolados considerados resistentes para ciprofloxacina (CIP), em apenas 1 (amostra C - Manga) foi detectado gene de resistência *shv*, porém ausente para família *Enterobacteriaceae*. Ao contrário, o isolado para CIP (amostra A - Laranja) não apresentou nenhum dos genes de resistência testados, apenas o Uni 826/Ent 515.

O gene *shv* também foi o único gene de resistência presente nos isolados do antibiótico cloranfenicol (CHL), aparecendo em três amostras diferentes (B, C e D) e, neste caso, ao gene da família *Enterobacteriaceae* também foi detectado nos mesmos isolados. Fazendo uma análise horizontal do quadro 3, pode-se observar que na amostra C - manga, o gene *shv* foi predominante em 7 dos 8 isolados. Cinco desses com presença da família *Enterobacteriaceae* e dois com sua ausência.

Nesta mesma linha de pensamento, é possível verificar em relação ao gene *ctx* a sua presença em apenas duas amostras (B - laranja e F - abacaxi), na primeira estando a família *Enterobacteriaceae* ausente e na segunda presente.

Em resumo, a presença da família *Enterobacteriaceae* foi detectada em 48 dos 64 isolados, sendo ausente em 6 deles.

7. DISCUSSÃO

A partir da análise dos dados, podemos compreender que, apesar de um número reduzido de amostras, todas apresentaram resistência fenotípica e genotípica. Uma diversidade de genes de resistência mostrou-se presente nas amostras, sendo no mínimo 1 gene encontrado e no máximo 5 genes diferentes.

Muitos estudos realizados com frutas ou suco de frutas para detecção de resistência bacteriana não contemplaram a análise genotípica da resistência, apenas a fenotípica, não identificando os genes de resistência presentes e a susceptibilidade aos antimicrobianos foi

testada nessas pesquisas para isolados de bactérias específicas como *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, entre outras (LATEEF, 2004; SHARAFATI- CHALESHTORI et al, 2010; NAEEM, 2012; GETA et al, 2019; KEBEDE et al, 2018). Dessa forma, cria-se uma limitação dos resultados quanto à sua abrangência, tendo em vista a vasta microbiota possivelmente presente nas frutas. É possível, assim, reforçar que a metodologia adotada no presente estudo favorece a detecção da presença de resistência bacteriana e seus genes, mesmo limitando-se apenas ao genes escolhidos, nas amostras.

O suco de manga *in natura* estava entre os sucos de frutas preparados em estabelecimentos comerciais, os quais, apresentaram condições microbiológicas inadequadas com a presença de *E. coli* e *Shigella* spp, e resistência fenotípica a diversos antibióticos, dentre eles ciprofloxacina, gentamicina, ampicilina, cloranfenicol e tetraciclina, porém a identificação de genes de resistência não foi realizada (GETA et al, 2019; KEBEDE et al, 2018). Na presente pesquisa também foi verificada a resistência fenotípica do suco de manga frente aos antibióticos gentamicina, ampicilina, tetraciclina e cloranfenicol estando de acordo com os estudos citados acima.

No Reino Unido, um estudo analisou diversos alimentos de origem animal e vegetal, sendo mais de 400 amostras e frutas e vegetais testadas para presença de *E.coli* e genes produtores de ESBL como oxa, shv, tem e ctx, porém estes não foram detectados em nenhum dos isolados de *E. coli* em vegetais e frutas (RANDALL et al, 2017). O que não significa que não havia a presença de tais genes de resistência nas amostras em si, a ausência foi relatada apenas nos isolados de *E. coli*.

Segundo a RDC 216/2004, que dispõe sobre o regulamento técnico de boas práticas para serviços de alimentos, ainda utilizada atualmente, os alimentos a serem consumidos crus, devem ser submetidos a processo de higienização a fim de reduzir a contaminação superficial. Ressaltamos que as amostras foram coletadas em dias e horários diferentes, o que descarta a possibilidade de ter havido uma falha em um único dia específico na manipulação e produção dos sucos, porém pode indicar sim um processo de controle de qualidade ineficiente. Kebede et al, (2018), demonstraram a presença de coliformes fecais em 80 amostras de sucos de frutas, evidenciando falhas em diversos fatores durante a produção desses sucos como a má qualidade da água utilizada para diluição, inadequada higiene pessoal, das frutas e utensílios e estocagem imprópria, além da falta de treinamento dos colaboradores em segurança alimentar.

Estes mesmos autores encontraram a presença de *E. coli* nas bebidas, resistente à ciprofloxacina, gentamicina, ampicilina, cloranfenicol e tetraciclina e *Shigella* spp apresentando resistência a gentamicina e tetraciclina.

A contaminação de utensílios e equipamentos deve-se a fatores extrínsecos combinados a higiene inadequada e presença de matéria orgânica. A presença da família *Enterobacteriaceae* foi descrita em 100% das superfícies de manipulação de alimentos, como bancadas e tábuas de corte de vegetais, por exemplo, em uma unidade de nutrição hospitalar no Brasil, sendo um dado preocupante tendo em vista que vegetais e frutas são muitas vezes consumidos crus (PIENIZ et al, 2019).

Entretanto, a presença de bactérias endofíticas apresentando resistência a antibióticos já foi relatada, por exemplo, em São Paulo, onde foi identificada a presença de *K. pneumoniae* endofítica produtora de ESBL (CTX-M-15) em amostras de alface comercial. Isolados de *E. coli* em amostras de saladas cruas e cozidas apresentaram resistência a nove de quinze antibióticos testados, entre eles trimetoprim/sulfametoxazol, tetraciclina, ampicilina e cloranfenicol. (LIMA et al., 2017) Algumas bactérias endofíticas estão presentes tanto no tecido vascular quanto nos espaços intercelulares dos vegetais, originando-se do solo em torno das raízes da planta ou da superfície da folha. Bactérias associadas à planta também podem ser patógenos humanos e bactérias patogênicas podem existir como endófitos. ESBLs poderiam persistir na superfície das plantas ou mesmo chegar ao seu interior e poderiam ser transmitidas para seres humanos ou animais. (SAID et al., 2015; JACKSON et al., 2013) Populações de patógenos endofíticos foram associadas a surtos de doenças transmitidas por alimentos envolvendo espinafres e alface ensacados. Este fato demonstra que apesar da esterilização superficial diminuir significativamente o número de bactérias, as populações bacterianas endofíticas não podem ser removidas e, portanto, são ingeridas pelo consumo de vegetais crus (JACKSON et al., 2013). Trazendo assim o questionamento sobre a segurança do consumo de alimentos crus para hospitalizados.

7.1. GENES DE RESISTÊNCIA

7.1.1. Beta-lactamases

As beta-lactamases codificadas pelos genes blaTEM, blaSHV e blaCTX-M são as mais encontradas ao redor do mundo. Diversos subtipos de SHV e TEM já foram relatadas em diversos países, estando a família *Enterobacteriaceae* incluída entre os achados (OLIVEIRA, 2015; ROCHETTI, 2011). Inicialmente as enzimas SHV e TEM codificavam resistência a apenas penicilinas, cefamicinas e cefalosporinas de 1ª e 2ª gerações, porém variantes dessas foram identificadas posteriormente como promovedoras de resistência também às cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações e monobactâmico (aztreonam), assim como a enzima CTX-M, sendo consideradas a partir de então como ESBL (ANDRADE & DARINI, 2017). No presente estudo, a enzima SHV foi a encontrada em maior número de amostras, representando 62,5% (5/8) e também em maior número de isolados, em 30,9% (17/55) resistentes a 7 antibióticos, sendo prevalente em SAM e AMP. Em seguida o gene *tem* foi o segundo gene produtor de beta-lactamases encontrado, estando presente em 3 das 8 amostras (37,5%) e em 7 dos 55 isolados (12,7%) prevalecendo em antibióticos não beta-lactâmicos como SXT e TET. Já o gene *ctx* apareceu em menor número, em apenas 2 amostras e 4 isolados, sendo 2 destes isolados de AMP e os demais SAM e GMN. YANG et al (2019), encontraram gene variante de *shv* (blaSHV-110) em isolados de *Klebsiella pneumoniae* de amostras de laranjas provenientes de mercados da China. Da mesma forma, também encontramos o gene *shv* em três dos isolados em uma amostra de suco de laranja. Em contrapartida, NUESCH-INDERBINEN et al (2015), não encontraram presença de *ctx* em nenhum dos isolados da família *Enterobacteriaceae*, nas amostras de frutas *in natura* analisadas, incluindo manga e abacaxi, ao contrário do encontrado em nosso estudo, estando o gene *ctx* presente em dois isolados do suco de abacaxi. Já estudos realizados com caju neste tema são quase nulos. O gene blaSHV foi encontrado apenas em solo de cultivo de caju em São Paulo (FURLAN et al, 2019).

A beta-lactamase OXA não foi encontrada em nenhum dos isolados em nosso estudo.

7.1.2. Carbapenamases

Já as enzimas OXA-48 são chamadas carbapenamases, pois possuem potencial hidrolítico para antibióticos carbapenêmicos, mesmo que fracamente, torna-se um tanto preocupante tendo em vista que os carbapenêmicos são os fármacos de última escolha contra infecções causadas por bactérias gram-negativas resistentes (ANDRADE & DARINI, 2017; PITOUT et al, 2019). Apesar de não ter havido resistência ao único antibiótico carbapenêmico testado, o ertapenem, surpreendentemente foi detectada a presença do gene oxa-48 em 9 isolados representando 16,3%, em 3 amostras (D: suco de caju, G: suco de manga e H: suco de caju). Além dos carbapenêmicos, a OXA-48 também tem poder de hidrólise de penicilinas, cefalosporinas, com ação limitada para cefalosporinas de amplo espectro como a ceftazidima e monobactâmico (ANDRADE & DARINI, 2017; PITOUT et al, 2019). Neste estudo o gene oxa-48 foi detectado nas penicilinas SAM e AMP, o que provavelmente contribuiu para a conferência da resistência, mas também em isolados de antibióticos não beta-lactâmicos como gentamicina, tetraciclina e trimetoprim + sulfametoxazol. Estudos de detecção de carbapenamases em frutas são bastante escassos. FURLAN et al (2019), descreveram a presença de OXA-48 em amostra de solo de cultivo de frutas e vegetais no Brasil, a partir de isolados de *Stenotrophomonas maltophilia*, uma bactéria gram-negativa, porém não pertencente à família *Enterobacteriaceae*.

Genes codificadores para as carbapenamases KPC, NDM, IMP e VIM não foram encontrados em nenhum dos isolados.

7.1.3. Integrons

Integrons são elementos genéticos capazes de capturar elementos móveis conhecidos como cassetes gênicos, adquirindo a capacidade de incorporar novos genes em um sítio específico. A classe 1 é a mais amplamente encontrada em bactérias gram-negativas, tanto em isolados clínicos quanto ambientais. A característica de mobilidade dos integrons, o tornam responsáveis pela disseminação dos genes de resistência, facilitando a transferência lateral e integração de genes de resistência a antibióticos a partir de cassetes gênicos móveis mediados por plasmídeos (HALL, 2001; OPAL & POP- VICAS, 2015).

Neste estudo foram testados três classes de integrons, classe 1 (Int1), classe 2 (Int2) e classe 3 (Int3). Porém nenhum dos isolados apresentou a presença do Int1, mas 4 isolados apresentaram o Int 2 (amostras A e B: sucos de laranja) e em apenas 1 isolado foi detectado o Int3 (amostra E: suco de laranja), indo de encontro ao achado de JONES-DIAS, et al (2016), tendo a presença do integron 1 em maior número ao avaliar isolados de bactérias pertencentes a *Enterobacteriaceae* de frutas e vegetais *in natura* e uma representação menor de integron 2 e 3, confirmando a participação também menor das classes 2 e 3 de integrons em multirresistência a antibióticos.

A detecção dos integrons de classe 2 e 3 neste estudo demonstram a presença de resistência adquirida e, notavelmente, ao contrário do estudo citado acima, a presença do Int2 em isolados contendo também dois a três genes de resistência a beta-lactâmicos e a tetraciclinas. O integron 3 também foi detectado juntamente com gene de resistência a beta-lactâmico (TEM), além da presença da família *Enterobacteriaceae*.

7.1.4. Genes de resistência a tetraciclina

O primeiro membro da família das tetraciclinas foi descoberto em 1945 e, a partir de então, o desenvolvimento de novas tetraciclinas passou a ocorrer e a droga se tornou largamente utilizada. Este fármaco possui amplo espectro de ação, baixa toxicidade e baixo custo, o que o torna muito utilizado na prática clínica e também para tratamento de infecções em animais, além do uso para promoção de crescimento destes (PEREIRA-MAIA et al, 2010).

Os genes tetA e tetB estavam presentes em 37,5% das amostras cada (sucos de laranja e caju), o primeiro representando 12,7% (8/55) dos isolados e o segundo representando 9% (5/55) isolados, aparecendo os dois genes simultaneamente em dois do total desses isolados. Já foram descritos diversos genes de resistência à tetraciclina, sendo diferenciados de acordo com o mecanismo de resistência causado. No caso do tetA e tetB, são conhecidos por codificarem resistência através de bombas de efluxo (XIONG et al, 2019).

Estes dois genes foram encontrados em amostras de diversos gêneros alimentícios, incluindo vegetais e frutas, como a laranja por exemplo, sendo o gene tetA presente em maior

número seguido pelo tetB (XIONG et al, 2019). Corrobora, assim, com o achado no presente estudo. CAPASSO (2015), também encontrou tetA e tetB em isolados de bactérias gram-negativas mas não pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, como *Pseudomonas* e *Pantoea* provenientes de pomares nos EUA. Um dos isolados onde o tetB foi detectado em nosso estudo não identificou a presença da família *Enterobacteriaceae*.

8. CONCLUSÃO

A presença de bactérias resistentes aos antibióticos foi detectada nos sucos de frutas *in natura*, preparados em unidade de serviço de nutrição de um hospital do Rio de Janeiro, evidenciada pelos testes fenotípicos em todas as amostras.

Uma diversidade de genes que conferem às bactérias resistência aos antibióticos foi detectada, assim como a presença da família *Enterobacteriaceae* na maior parte dos isolados dos oito sucos de frutas. A metodologia empregada possibilitou a detecção desses genes de forma mais estendida quando comparada à tradicional metodologia de isolamento de um único microrganismo.

A presença de resistência fenotípica e, principalmente, genotípica nos sucos de frutas, em especial a detecção de beta-lactamases, carbapenamases e integrons são preocupantes tendo em vista que destinavam-se a pacientes internados em um hospital, podendo contribuir na aquisição e disseminação desses genes.

Novos estudos com esta linha de metodologia são necessários, principalmente em alimentos vegetais a serem consumidos crus, certamente com maior número de amostras e em diversas fontes de aquisição a fim de avaliar a resistência aos antibióticos de forma mais completa e abrangente.

9. REFERÊNCIAS

- ADEGUN, Busayo R.; OLUDURO, Anthonia O.; AREGBESOLA, Oladipupo A. Isolation and molecular characterization of citrobacter species in fruits and vegetables sold for consumption in ILE-IFE, Nigeria. **Scientific African**, v. 6, p. e00173, 2019.
- ANDRADE, Leonardo Neves; DARINI, Ana Lúcia Costa. Bacilos gram-negativos produtores de beta-lactamases: que bla bla bla é esse?. **Journal of Infection Control**, v. 6, n. 1, p. 16-25, 2017.
- AZIMI, L. et al. Evaluation of Phenotypic Methods for Detection of Klebsiella Pneumoniae Carbapenemase-Producing K . Pneumoniae in Tehran. v. 2, n. 3, p. 26–31, 2013
- BAMBUÍ, Rua; ANCHIETA, B. Perfil de resistência antimicrobiana de cepas de Staphylococcus sp. isoladas de queijo tipo coalho. **Arq. Bras. Med**, v. 56, n. 1, p. 130-133, 2004.
- BAPTISTA, M. G. D. F. M. (2013). Mecanismos de Resistência aos Antibióticos. *Dissertação de Mestrado, Lisboa, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia Faculdade de Ciências e Tecnologias Da Saúde*, 51.
- BARMAN, M.; UNOLD, D.; SHIFLEY, K.; AMIR, E.; HUNG, K.; BOS, N.; SALZMAN, N. Enteric salmonellosis disrupts the microbial ecology of the murine gastrointestinal tract. **Infection and immunity**, v. 76, n. 3, p. 907–15, mar. 2008.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA. Resolução – RDC Nº 216, de 15 de Setembro de 2004. Estabelece procedimentos de boas Práticas para serviço de alimentação, garantindo as condições higiênico-sanitárias do alimento preparado. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 17 setembro de 2004. Disponível em: < Acesso em: 11 de março de 2020
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia alimentar para a população brasileira. 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.
- CAMPOS, Joana et al. Microbiological quality of ready-to-eat salads: an underestimated

vehicle of bacteria and clinically relevant antibiotic resistance genes. **International journal of food microbiology**, v. 166, n. 3, p. 464-470, 2013

CAPASSO, Sarah Jane. Antibiotic Resistance in Pennsylvania Stone Fruit Orchards. 2015.

CASTANHEIRA, Bruno Alexandre Martins Guerreiro et al. **Mecanismos de resistência a antibióticos**. 2013. Dissertação de Mestrado.

CDC. Laboratory Protocol for Detection of Carbapenem-Resistant or Carbapenemase-Producing , *Klebsiella* spp . and *E . coli* from Rectal Swabs. **Centro de Controle e Prevenção de Doenças**, n. 5, p. 1–6, 2008. Disponível em: <https://www.cdc.gov/hai/pdfs/labsettings/klebsiella_or_ecoli.pdf> Acesso em: 10 de jan. 2018.

CDC. Laboratory Protocol for Detection of Carbapenem-Resistant or Carbapenemase-Producing , *Klebsiella* spp . and *E . coli* from Rectal Swabs. **Centro de Controle e Prevenção de Doenças**, n. 5, p. 1–6, 2008. Disponível em: <https://www.cdc.gov/hai/pdfs/labsettings/klebsiella_or_ecoli.pdf>. Acesso em: 21 jan. 2018.

CDDEP. State of the World’s Antibiotics, 2015. **Center for Disease Dynamics, Economics & Policy**. 2015. Washington, D.C. Disponível em: <https://issuu.com/cddep/docs/swa_2015_final> Acesso em: 13 jan. 2018.

CLSI. M02-A08 Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; *Approved Standard—Eighth Edition*. NCCLS document M2-A8. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2003.

CLSI. M02-A12 Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; *Approved Standard— Twelfth Edition*. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2015. Disponível em: <<http://www.facm.ucl.ac.be/intranet/CLSI/CLSI-2015-M02-A12-original.pdf>>. Acesso em: 21 jan. 2019.

COMEX DO BRASIL. Notícias do agronegócio. 2017. Disponível em: <<https://www.comexdobrasil.com/terceiro-produtor-de-frutas-do-mundo-brasil-busca-espaco-entre-grandes-exportadores-do-setor/>>. Acesso em 22 jan. 2019.

- DA MATA, Patricia Terron Ghezzi; ABEGG, Maxwel Adriano. Descrição de caso de resistência a antibióticos por *Pseudomonas aeruginosa*. **Arquivos do Museu Dinâmico Interdisciplinar**, v. 11, n. 2, p. 20-25, 2013.
- DALLENNE, C.; DA COSTA, A.; DECRÉ, D.; FAVIER, C.; ARLET, G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 3, p. 490–495, 1 mar. 2010.
- DIAS, Daniela Jones Antunes. **Estudo dos principais mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em bactérias patogênicas de gram negativo**. 2009. Tese de Doutorado. FCT-UNL.
- FERNANDES, Bárbara Victória Nascimento. Avaliação qualitativa dos cardápios ofertados na unidade de alimentação do Hospital Regional de Lagarto-SE. 2018.
- FURLAN, João Pedro Rueda et al. Characterization of acquired antimicrobial resistance genes in environmental *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 4, p. 475-479, 2019.
- GETA, Kindu; KEBEDE, Ameha; CHEMEDISSA, Meseret. Antibiotic Susceptibility Test of Bacteria Isolated From Fruit Juices Sold in Cafes and Restaurants of Debre-Markos Town, North Western Ethiopia. **World News of Natural Sciences**, v. 24, p. 366-372, 2019.
- GUILLAUME, G.; VERBRUGGE, D.; CHASSEUR-LIBOTTE, M.-L.; MOENS, W.; COLLARD, J.-M. PCR typing of tetracycline resistance determinants (Tet A E) in *Salmonella enterica* serotype Hadar and in the microbial community of activated sludges from hospital and urban wastewater treatment facilities in Belgium. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 32, n. 1, p. 77–85, 1 abr. 2000.
- HALL, Ruth M. Integrons. **Encyclopedia of Genetics**, v. 1 , p. 1041–1045, 2001.
- JACKSON, Colin R. et al. Culture dependent and independent analysis of bacterial communities associated with commercial salad leaf vegetables. **BMC microbiology**, v. 13, n. 1, p. 274, 2013.

- JONES-DIAS, Daniela et al. Architecture of class 1, 2, and 3 integrons from gram negative bacteria recovered among fruits and vegetables. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1400, 2016.
- LAGO, Aldalise. Ocorrência de enterobactérias produtoras de β -lactamases de espectro estendido em isolados clínicos no sul do Brasil. **SUPLEMENTO ESPECIAL DE MICROBIOLOGIA E MICOLOGIA**, v. 48, n. 3 supl 1, p. 26-31, 2016.
- LANZ, R.; KUHNERT, P.; BOERLIN, P. Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical Escherichia coli from different animal species in Switzerland. **Veterinary Microbiology**, v. 91, n. 1, p. 73–84, 2 jan. 2003.
- LATEEF, A.; OLOKE, J. K.; GUEGUIM-KANA, E. B. Antimicrobial resistance of bacterial strains isolated from orange juice products. **African journal of Biotechnology**, v. 3, n. 6, p. 334-338, 2004.
- LIMA, Cíntia Matos et al. Antimicrobial resistance in diarrheagenic Escherichia coli from ready-to-eat foods. **Journal of food science and technology**, v. 54, n. 11, p. 3612-3619, 2017.
- LOUREIRO, Rui João et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de saúde pública**, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2016.
- KABIR, Samiha; MEHBISH JAHAN, Sheikh; MAHBOOB, Mahboob. Apple, guava and pineapple fruit extracts as antimicrobial agents against pathogenic bacteria. 2017.
- KARUNIAWATI, A.; SAHARMAN, Y.; LESTARI, D. Detection of Carbapenemase Encoding Genes in Enterobacteriaceae, Pseudomonas aeruginosa, and Acinetobacter baumannii Isolated from Patients at Intensive Care Unit Cipto Mangunkusumo Hospital in 2011. **Acta medica Indonesiana**, v. 45, p. 101–106, 2013.
- KEBEDE, Haftom et al. Public health risks and bacterial safety of fruit juices prepared in Axum town, north Ethiopia. **Journal of Pharmacy Research**, v. 12, n. 4, p. 509, 2018.
- YANG, Fan et al. Plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-1 in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolated from market retail fruits in Guangzhou, China. **Infection and drug resistance**, v. 12, p. 385, 2019.

- MARGOT, Heike et al. Occurrence of Salmonella, L. monocytogenes, Shigatoxin-producing E. coli and ESBL-producing Enterobacteriaceae in sprout samples collected from the Swiss market. **Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v. 11, n. 2, p. 155-157, 2016.
- MONSTEIN, H.-J.; ÖSTHOLM-BALKHED, Å.; NILSSON, M. V.; NILSSON, M.; DORNBUSCH, K.; NILSSON, L. E. Multiplex PCR amplification assay for the detection of bla SHV, bla TEM and bla CTX-M genes in Enterobacteriaceae. **APMIS**, v. 115, n. 12, p. 1400–1408, 1 dez. 2007.
- NAEEM, MAHROSH et al. Isolation characterization and identification of lactic acid bacteria from fruit juices and their efficacy against antibiotics. **Pak J Bot**, v. 44, n. 323, p. 8, 2012.
- NEILL, J. O. '. **Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations The Review on Antimicrobial Resistance Chaired**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[https://amr-review.org/sites/default/files/AMR Review Paper - Tackling a crisis for the health and wealth of nations_1.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/AMR_Review_Paper_-_Tackling_a_crisis_for_the_health_and_wealth_of_nations_1.pdf)>. Acesso em: 10 de janeiro de 2020
- NÜESCH-INDERBINEN, Magdalena et al. Assessment of the prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in ready-to-eat salads, fresh-cut fruit, and sprouts from the Swiss market. **Journal of food protection**, v. 78, n. 6, p.
- OLAIMAT, Amin N.; HOLLEY, Richard A. Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review. **Food microbiology**, v. 32, n. 1, p. 1-19, 2012.
- OPAL, Steve M., POP- VICAS, Aurora. Molecular mechanisms of Antibiotic Resistance in bacteria. **Mendell, Douglas and Benett's Principles and Practice of infectious Diseases**, v. 1, p. 235- 251.e3, 2015.
- PEREIRA-MAIA, Elene Cristina et al. Tetraciclina e gliciliclinas: uma visão geral. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 700-706, 2010.
- PEREIRA, Marcia Amelia Barreto de Cerqueira. Avaliação do consumo de alimentos funcionais em uma unidade hospitalar de alimentação e nutrição na cidade de Aracaju/SE. 2017.

- PIENIZ, S. et al. Avaliação microbiológica e identificação molecular de isolados de equipamentos e superfícies de contato com alimentos em um hospital Unidade de Alimentação e Nutrição. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, n. 2, p. 191-200, 2019.
- PITOUT, Johann DD et al. The global ascendancy of OXA-48-type carbapenemases. **Clinical microbiology reviews**, v. 33, n. 1, 2019.p. 1533-1538, 2010.
- POIREL, L.; REVATHI, G.; BERNABEU, S.; NORDMANN, P. Detection of NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Kenya. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 934–936, 1 fev. 2011a.
- POIREL, L.; WALSH, T. R.; CUVILLIER, V.; NORDMANN, P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 70, n. 1, p. 119–123, 1 maio 2011b.
- QUEENAN, Anne Marie; BUSH, Karen. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. **Clinical microbiology reviews**, v. 20, n. 3, p. 440-458, 2007.
- SAID, Leila Ben 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.
- SILVEIRA, Gustavo Pozza et al. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844, 2006.
- RANDALL, L. P. et al. Evaluation of meat, fruit and vegetables from retail stores in five United Kingdom regions as sources of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing and carbapenem-resistant *Escherichia coli*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 241, p. 283-290, 2017.
- ROCHA, Hemanuelle Hevelyn Santos. Avaliação qualitativa dos quatro níveis de dietas pastosas utilizadas por pacientes internados em um hospital filantrópico e um hospital público da cidade de Porto Velho, RO. 2019.
- SHARAFATI CHALESHTORI, Reza; SHARAFATI CHALESHTORI, Farhad; KARIMI, A. Antibiotic resistance pattern of staphylococcus strains isolated from orange and apple juices in Shahre-kord, Iran. **Pakistan Journal of Medical Sciences**, v. 26, n. 3, p. 615-

618, 2010.

SILVA, Luiza Eunice Sá da; CLARO, Rafael Moreira. Tendências temporais do consumo de frutas e hortaliças entre adultos nas capitais brasileiras e Distrito Federal, 2008-2016.

Cadernos de Saúde Pública, v. 35, p. e00023618, 2019.

Through, A., Approach, T. H. E., Mechanism, O. F., & Bacterial, O. F. (n.d.). *Abordagem Do Mecanismo*. <http://www.cnad.edu.br/revista-ciencia-atual/index.php/cafsj/article/view/240>

VENTOLA, C. Lee. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 40, n. 4, p. 277, 2015.

WANG, H. et al. The transfer of antibiotic resistance from food to humans: facts, implications and future directions. **Revue Scientifique et Technique-OIE**, v. 31, n. 1, p. 249, 2012.

XIONG, Lina et al. Characterization of antimicrobial resistance genes and class 1 integrase gene in raw meat and aquatic product, fresh vegetable and fruit, and swine manure in southern China. **Food Control**, v. 104, p. 240-246, 2019.

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

ZURFLUH, K. et al. First detection of *Klebsiella variicola* producing OXA-181 carbapenemase in fresh vegetable imported from Asia to Switzerland. *Antimicrobial resistance and infection control*, v. 4, n. 1, p. 38, 2015.

ZURFLUH, Katrin et al. Extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae isolated from vegetables imported from the Dominican Republic, India, Thailand, and Vietnam. *Applied and environmental microbiology*, v. 81, n. 9, p. 3115-3120, 2015