

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
IMUNOLOGIA E DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS**

Renata da Costa Barros Silva

**OCORRÊNCIA E ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE BACTÉRIAS
ASSOCIADAS A CARNES VERMELHAS, FRANGO E PEIXES
DISPONÍVEIS VAREJO EM JUIZ DE FORA, MG: SUSCEPTIBILIDADE A
DROGAS, TOLERÂNCIA A METAIS E EXPRESSÃO
DE BOMBAS DE EFLUXO**

Juiz de Fora

2022

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
IMUNOLOGIA E DOENÇAS INFECTO-PARASITÁRIAS**

Renata da Costa Barros Silva

**OCORRÊNCIA E ASPECTOS FISIOLÓGICOS DE BACTÉRIAS
ASSOCIADAS A CARNES VERMELHAS, FRANGO E PEIXES
DISPONÍVEIS VAREJO EM JUIZ DE FORA, MG: SUSCEPTIBILIDADE A
DROGAS, TOLERÂNCIA A METAIS E EXPRESSÃO DE BOMBAS DE
EFLUXO**

Tese de doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

**Orientador: Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz
Coorientadoras: Profa. Vânia Lúcia da Silva
Profa. Vanessa Cordeiro Dias**

Juiz de Fora

2022

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

da Costa Barros Silva, Renata .

OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS A CORTES DE CARNES E PEIXES DISPONÍVEIS NO VAREJO: SUSCETIBILIDADE A DROGAS, TOLERÂNCIA A METAIS E EXPRESSÃO DE BOMBAS DE EFLUXO / Renata da Costa Barros Silva. -- 2022.

101 p.

Orientador: Cláudio Galuppo Diniz

Coorientadoras: Vânia Lúcia da Silva, Vanessa Cordeiro Dias

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2022.

1. Carne. 2. Resistência. 3. Antimicrobianos. 4. Enterobacterales.
I. Galuppo Diniz, Cláudio , orient. II. Lúcia da Silva, Vânia, coorient.
III. Cordeiro Dias, Vanessa, coorient. IV. Título.

Renata da Costa Barros Silva

**OCORRÊNCIA DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS A CORTES DE CARNES E
PEIXES DISPONÍVEIS NO VAREJO: SUSCETIBILIDADE A DROGAS, TOLERÂNCIA A METAIS
E EXPRESSÃO DE BOMBAS DE EFLUXO**

Dissertação
apresentada ao
Programa de Pós-
graduação em
Ciências Biológicas
da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Doutor em
Ciências Biológicas.
Área de
concentração:
Imunologia &
Doenças
Infectoparasitárias.

Aprovada em 18 de novembro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz - Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profª. Drª. Vânia Lúcia da Silva - Coorientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profª. Drª. Vanessa Cordeiro Dias - Coorientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Thiago César Nascimento
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profª. Drª. Cláudia Oliveira Fontes
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profª. Drª. Carla Afonso da Silva
Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública

Profª. Drª. Juliana Alves Resende
Universidade Federal do Espírito Santo

Juiz de Fora, 03/11/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Juliana Alves Resende, Usuário Externo**, em 18/11/2022, às 12:01, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Claudio Galuppo Diniz, Professor(a)**, em 18/11/2022, às 12:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carla Afonso da Silva, Usuário Externo**, em 18/11/2022, às 12:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thiago Cesar Nascimento, Professor(a)**, em 18/11/2022, às 12:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Claudia Oliveira Fontes, Professor(a)**, em 18/11/2022, às 12:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vania Lucia da Silva, Chefe de Departamento**, em 18/11/2022, às 12:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa Cordeiro Dias, Professor(a)**, em 18/11/2022, às 13:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1022704** e o código CRC **5BAA8AD0**.

Você nunca precisou de fantasia
para ser minha heroína!

AGRADECIMENTOS

Antes de qualquer coisa, agradeço à minha mãe, exemplo de vida, perseverança, caráter e força. Muito obrigada pela confiança e apoio em todos os aspectos da minha vida. Que Deus me conceda a benção de ser ao menos um pouco como você!

Agradeço aos meus orientadores de longa data Cláudio e Vânia. Sem vocês, eu não teria chegado onde cheguei! Obrigada por todo o conhecimento, paciência, ensinamentos, incentivo e parceria.

Agradeço à professora Vanessa, com quem aprendi e continuo aprendendo muito. Obrigada pela amizade e pelo papel tão importante que teve na minha formação, desde meus anos como sua IC até hoje!

Agradeço a todos os professores do CEMIC pela ajuda, conselhos, ideias e ensinamentos durante todos esses anos.

Agradeço à UFJF, instituição que foi meu segundo lar desde a graduação e me proporcionou um ensino de alta qualidade.

Agradeço a todos os mestres que durante todos esses anos contribuíram com minha formação acadêmica e profissional.

Agradeço aos colegas de laboratório com quem convivi intensamente durante os últimos anos, pelo companheirismo e pela troca de experiências que me permitiram crescer não só como pessoa, mas também como formanda.

Agradeço à todas as instituições de fomento que tornaram a realização deste trabalho possível com apoio financeiro e interesse pelo projeto.

RESUMO

Enterobacterales multirresistentes à antimicrobianos (MDR) são um problema de saúde pública e sua disseminação de alimentos de origem animal para humanos é de grande preocupação em todo o mundo. Portanto, o objetivo deste estudo foi analisar os aspectos fisiológicos, perfil de susceptibilidade a drogas, tolerância a metais tóxicos e expressão de mecanismos de efluxo de linhagens de *Enterobacterales* isoladas de diferentes tipos de carne. Amostras de carne de frango, bovino, suíno e peixe foram coletadas em estabelecimentos do comércio varejista da cidade de Juiz de Fora – MG e analisadas quanto a sua contagem de microrganismos aeróbios mesófilos totais, cocos Gram-positivos e bastonetes Gram-negativos. O isolamento seletivo de membros da ordem *Enterobacterales* foi realizado, e a partir desses isolados foi avaliada a susceptibilidade a antimicrobianos, tolerância a metais tóxicos e expressão de mecanismos de efluxo. O estudo revelou que a carne de peixe apresentava significativamente menos cocos Gram-positivos em comparação às outras carnes, possivelmente devido ao fato de ser menos manipulada por funcionários nos estabelecimentos do varejo comparado aos outros tipos de carne. Das 436 *Enterobacterales* isoladas, 271 (62,9%) eram resistentes a ao menos um dos antimicrobianos testados, 32,3% das quais eram resistentes a um e 8,1% a dois. *Enterobacterales* MDR compreenderam 22,7% dos isolados obtidos, 7,9% das quais eram resistentes a três das drogas testadas, 11,4% a quatro, 2,3% a cinco e 0,9% a seis. A carne de frango foi a que apresentou mais isolados considerados MDR, e a de peixe, a que apresentou menos. Não foi possível distinguir entre os diferentes tipos de carne de acordo com o perfil de resistência a antimicrobianos apresentado pelas bactérias isoladas, indicando que a resistência no presente estudo é disseminada e mais parâmetros são necessários de forma a separar as carnes. A análise dos tamanhos das zonas de inibição formadas pelos isolados em resposta à presença de antimicrobianos mostrou que as bactérias provenientes da carne de frango possuem uma média dos tamanhos das zonas de inibição significativamente menor para a ceftazidima e ceftriaxona comparado às outras carnes, evidenciando maior pressão seletiva em seu ambiente. Todas as *Enterobacterales* MDR demonstraram maior tolerância ao mercúrio e cádmio, provavelmente devido ao fato de que genes de tolerância a esses metais frequentemente se encontram junto a genes de resistência a drogas. Atividade de efluxo foi observada em microrganismos MDR, não-susceptíveis e susceptíveis, indicando que além de antimicrobianos, seus substratos podem compreender também biocidas e íons tóxicos. Conclui-se que o frango é a carne de maior risco associado a seu consumo do ponto de vista da resistência bacteriana aos antimicrobianos.

Palavras-chave: Carne. Resistência. Antimicrobianos. *Enterobacterales*.

ABSTRACT

Multidrug-resistant (MDR) *Enterobacterales* are a public health issue and their spread from animal source foods to humans is of great concern all over the world. Hence, the aim of this study was to analyze the physiological aspects, drug susceptibility profile, tolerance to toxic metals and expression of efflux mechanisms in *Enterobacterales* strains isolated from different types of meat. Chicken, beef, pork and fish samples were acquired in retail establishments in the city of Juiz de Fora – MG and analyzed regarding their mesophilic aerobic bacteria total viable counts, Gram-negative rods selective counts and Gram-positive cocci selective counts. Selective isolation of the *Enterobacterales* order members was carried out, and their susceptibility to antimicrobials, tolerance to toxic metals and expression of efflux mechanisms were evaluated. The study revealed that fish presented significantly less Gram-positive cocci compared to other types of meat, possibly due to the fact that it goes through less handling by retail employees. Out of 436 *Enterobacterales* isolated, 271 (62.9%) were resistant to at least one of the antimicrobials tested, 32.3% of which was resistant to one and 8.1% to two. MDR *Enterobacterales* comprised 22.7% of obtained isolates, 7.9% of which was resistant to three of the tested drugs, 11.4% to four, 2.3% to five and 0.9% to six. Chicken was the meat with the most isolates considered MDR, and fish was the one with the least. It was not possible to distinguish among the different types of meat based on the antimicrobial resistance profile presented by the isolated bacteria, suggesting that resistance in the present study is widespread and more parameters are needed so as to separately classify the meats. Analysis of inhibition zone sizes resulting from the isolates' response to the presence of antimicrobial drugs showed that the bacteria derived from chicken have a inhibition zone size mean for ceftazidime and ceftriaxone significantly smaller compared to other meats, indicating higher selective pressure in their environment. All MDR *Enterobacterales* showed higher tolerance to mercury and cadmium, probably due to the fact that the tolerance genes to these metals are frequently found in association with drug resistance genes. Efflux activity was observed in MDR, non-susceptible and susceptible microorganisms, suggesting that apart from antimicrobials, their target substrates could comprise biocides and toxic ions. It is concluded that chicken is the meat with higher associated risk to its consumption from the point of view of bacterial resistance to antimicrobials.

Keywords: Meat. Resistance. Antimicrobials. *Enterobacterales*.

Lista de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Previsão para o ano de 2029 do consumo per capita de carne de bovino, suíno, ave e ovino em 35 países, BRICS e mundial..... | 23 |
| Figura 2: Classificação proposta por Adeolu <i>et al.</i> (2016) da ordem <i>Enterobacterales</i> | 28 |
| Figura 3. Vias de exposição humanas e ações antropogênicas que contribuem para os reservatórios ambientais de bactérias resistentes a antimicrobianos, resíduos de drogas e genes de resistência..... | 34 |
| Figura 4. Principais antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos..... | 38 |
| Figura 5. Antimicrobianos da classe das quinolonas..... | 41 |
| Figura 6. Contagens de bastonetes Gram-negativas (EMB), cocos Gram-positivos (AMH) e totais (AS) obtidas a partir das 21 coletas de carne de frango, bovino, suíno e de peixe..... | 53 |
| Figura 7. Perfil geral de susceptibilidade a antimicrobianos das enterobactérias isoladas..... | 55 |
| Figura 8. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das enterobactérias isoladas da carne de frango..... | 58 |
| Figura 9. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das enterobactérias isoladas da carne bovina..... | 60 |
| Figura 10. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das enterobactérias isoladas da carne suína..... | 62 |
| Figura 11. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das enterobactérias isoladas da carne de peixe..... | 64 |
| Figura 12. Clustering Hierárquico Aglomerativo com agrupamento UPGMA a partir de matriz de similaridade dos perfis de susceptibilidade a antimicrobianos apresentados pelos isolados..... | 67 |
| Figura 13. Distribuição dos halos de inibição da amoxicilina/ácido clavulânico e ampicilina para os isolados provenientes das carnes de frango, bovino, suíno e de peixe..... | 68 |
| Figura 14. Distribuição dos halos de inibição da cefazolina e cefoxitina para os isolados provenientes das carnes de frango, bovino, suíno e de peixe..... | 69 |

| | |
|--|----|
| Figura 15. Distribuição dos halos de inibição da ceftazidima e ceftriaxona para os isolados provenientes das carnes de frango, bovino, suíno e de peixe..... | 69 |
| Figura 16. Emissão de fluorescência (vermelho) sob incidência de radiação UV por <i>Enterobacterales</i> isoladas de carne de frango, bovino, suíno e peixe após crescimento em meio Mueller-Hinton contendo 1,5 µg/mL de brometo de etídio..... | 72 |

Lista de Tabelas

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Identificação presuntiva dos membros da ordem <i>Enterobacterales</i> isolados..... | 54 |
| Tabela 2. Porcentagem de resistência simultânea a antimicrobianos de diferentes classes encontradas nas <i>Enterobacterales</i> isoladas de cada tipo de carne..... | 56 |
| Tabela 3. Distribuição dos fenótipos de resistência aos antimicrobianos selecionados para o estudo..... | 56 |
| Tabela 4. Distribuição dos fenótipos de resistência dos membros da ordem <i>Enterobacterales</i> isolados da carne de frango..... | 59 |
| Tabela 5. Distribuição dos fenótipos de resistência dos membros da ordem <i>Enterobacterales</i> isolados da carne bovina..... | 61 |
| Tabela 6. Distribuição dos fenótipos de resistência dos membros da ordem <i>Enterobacterales</i> isolados da carne suína..... | 63 |
| Tabela 7. Distribuição dos fenótipos de resistência dos membros da ordem <i>Enterobacterales</i> isolados da carne de peixe..... | 65 |
| Tabela 8. Tolerância a metais tóxicos de <i>Enterobacterales</i> isoladas de carne de frango, bovino, suíno e peixe na cidade de Juiz de Fora – Brasil..... | 71 |

Lista de abreviaturas, siglas e acrônimos

| | |
|----------|--|
| AMC | Amoxicilina/Ácido Clavulânico |
| AME | “Aminoglycoside Modifying Enzyme” Enzima Modificadora de Aminoglicosídeo |
| AMH | Ágar Manitol Hipertônico |
| AMI | Amicacina |
| AMP | Ampicilina |
| AMP-c | “Ampicillin-Resistance Gene Group C” Gene de Resistência à Ampicilina Tipo C |
| AMS | Ágar Manitol Salgado |
| AS | Ágar Sangue |
| ATM | Aztreonam |
| BHI | “Brain Heart Infusion” Infusão Cérebro Coração |
| CAT | Cloranfenicol Acetiltransferases |
| CAZ | Ceftazidima |
| CDC | “Centers for Disease Control” Centros de Controle de Doenças |
| CEMIC | Centro de Estudos em Microbiologia |
| CFO | Cefoxitina |
| CFZ | Cefazolina |
| CIM | Concentração Inibitória Mínima |
| CIP | Ciprofloxacino |
| CLO | Cloranfenicol |
| CLSI | “Clinical and Laboratory Standards Institute” Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais |
| COVID-19 | “Coronavirus Disease 2019” Doença do Coronavírus 2019 |
| CPM | Cefepime |
| CRO | Ceftriaxona |
| CTX-M | Enzima “Cefotaxima de Monique” |
| DAEC | <i>E. coli</i> de Aderência Difusa |
| DHPS | Dihidroopteroato Sintetase |

| | |
|------|--|
| DNA | “Desoxyribonucleic Acid” Ácido Desoxirribonucleico |
| EAEC | <i>E. coli</i> Enteroagregativa |
| EHEC | <i>E. coli</i> Enterohemorrágica |
| EIEC | <i>E. coli</i> Enteroinvasiva |
| EMB | “Eosin Methylen Blue Agar” Ágar Eosina Azul de Metileno |
| EPEC | <i>E. coli</i> Enteropatogênica |
| ERC | “Carbapenem-Resistant <i>Enterobacterales</i> ” <i>Enterobacterales</i> Resistentes a Carbapenêmicos |
| ESBL | “Extended Spectrum Beta-Lactamase” Beta-Lactamase de Espectro Estendido |
| EtBr | Brometo de Etídio |
| ETEC | <i>E. coli</i> Enterotoxigênica |
| FAO | “Food and Agriculture Organization” Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação |
| FDA | “Food and Drugs Administration” Autoridade Americana para a Alimentação e Medicamentos |
| GEN | Gentamicina |
| IRAS | Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde |
| ITU | Infecção do Trato Urinário |
| KPC | <i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase |
| LEV | Levofloxacino |
| MDR | Multirresistência |
| MFS | “Major Facilitator Superfamily” Superfamília de Facilitadores |
| MPM | Meropenem |
| MRSA | <i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a Meticilina |
| OIE | “World Organization for Animal Health” Organização Mundial de Saúde Animal |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| OXA | Enzima “Oxacilina” |
| PBP | “Penicillin-Binding Protein” Proteína Ligadora de Penicilina |
| PDR | “Pan Drug-Resistant” Pan-Resistente à Drogas |

| | |
|-------|---|
| RPP | “Ribosomal Protection Proteins” Proteínas de Proteção Ribossomal |
| rRNA | RNA ribossômico |
| SHV | “Sulfhydryl Reagent Variable” Sulfidrina Reagente Variável |
| SIM | Serviço de Inspeção Municipal |
| SPI-1 | “Salmonella Pathogenicity Island 1” Ilha de Patogenicidade de Salmonella 1 |
| SPI-2 | “Salmonella Pathogenicity Island 2” Ilha de Patogenicidade de Salmonella 2 |
| STEC | <i>E. coli</i> Produtora de Toxina Shiga |
| SUT | Sulfazotrim |
| T3SS | “Type III Shigella Secretion System” Sistema de Secreção do Tipo III de Shigella |
| TEM | Enzima “Temonieta” |
| TET | Tetraciclina |
| TGI | Trato Gastrointestinal |
| tRNA | RNA transportador |
| TSI | “Triple Sugar Iron” Ágar Tríplice Açúcar Ferro |
| UFJF | Universidade Federal de Juiz de Fora |
| UPGMA | “Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages” Método de Grupo de Pares Não Ponderados usando Médias Aritiméticas |
| XDR | “Extensively Drug-Resistant” Extensivamente Resistente à Drogas |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA..... | 19 |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA..... | 22 |
| 2.1 A importância e consumo da carne na alimentação humana..... | 22 |
| 2.2 Segurança alimentar e a contaminação de alimentos por microrganismos de interesse clínico..... | 23 |
| 2.2.1 A ordem <i>Enterobacterales</i> | 26 |
| 2.3 A resistência bacteriana aos antimicrobianos e sua interface no contexto da saúde única..... | 31 |
| 2.3.1 A resistência a antimicrobianos em <i>Enterobacterales</i> | 36 |
| 2.3.1.1 Resistência aos β-Lactâmicos | 37 |
| 2.3.1.2 Resistência às quinolonas..... | 40 |
| 2.3.1.3 Resistência às tetraciclinas..... | 41 |
| 2.3.1.4 Resistência às sulfonamidas..... | 42 |
| 2.3.1.5 Resistência aos anfenicóis..... | 43 |
| 2.3.1.6 Resistência aos aminoglicosídeos..... | 44 |
| 3 OBJETIVOS..... | 46 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 46 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 46 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 48 |
| 4.1 Amostragem..... | 48 |
| 4.2 Isolamento e contagem dos microrganismos..... | 48 |
| 4.3 Seleção e identificação presuntiva dos membros da ordem <i>Enterobacterales</i> | 49 |
| 4.4 Teste de susceptibilidade a antimicrobianos..... | 49 |
| 4.5 Teste de tolerância à metais tóxicos..... | 49 |
| 4.6 Determinação da expressão fenotípica de mecanismos de efluxo..... | 50 |
| 4.7 Análise estatística..... | 50 |
| 5 RESULTADOS..... | 52 |
| 5.1 Isolamento e contagem bacteriana..... | 52 |

| | |
|---|-----------|
| 5.2 Identificação presuntiva dos membros da ordem <i>Enterobacterales</i> | 53 |
| 5.3 Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos..... | 54 |
| 5.4 Tolerância a metais tóxicos..... | 70 |
| 5.5 Expressão fenotípica de mecanismos de efluxo..... | 72 |
| 6 DISCUSSÃO | 73 |
| 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 81 |
| 8 CONCLUSÃO | 82 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 83 |
| ANEXO I | |

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

De acordo com a OMS (Organização Mundial de Saúde), a resistência aos antimicrobianos é um problema global, urgente e complexo, que configura como um dos maiores desafios da saúde pública na atualidade. O surgimento de microrganismos multirresistentes resulta em infecções que respondem a poucos ou nenhum dos agentes antimicrobianos disponíveis no mercado, o que leva alguns autores a acreditarem na eminência de uma segunda era pré-antibiótica.

Apesar da resistência a antimicrobianos não ser um fenômeno moderno, ocorrendo naturalmente como resultado da seleção natural, atividades antropogênicas têm contribuído para o aumento da frequência com que ela ocorre. A emergência e disseminação de linhagens resistentes estão relacionadas a fenômenos de seleção natural em decorrência do uso indiscriminado, por vezes abusivo dessas substâncias. Esse uso tem sido relacionado não apenas à prescrição excessiva de antimicrobianos ou seu mal uso por pacientes, mas também à sua segregação, descarte e aplicação exagerada nos diferentes setores econômicos, sobretudo na cadeia produtiva de alimentos. Microrganismos tornam-se resistentes aos antimicrobianos em decorrência de mutações e, sobretudo, em decorrência de transferência horizontal de genes, que pode ocorrer entre procariotos de mesma espécie, e até mesmo entre representantes de espécies diferentes. O uso de antimicrobianos, no entanto, exerce pressão seletiva sem distinção, tanto em patógenos e microrganismos comensais, o que favorece a propagação de marcadores moleculares de resistência, sobretudo fora da dimensão clínica. Desta forma, são necessários esforços coordenados para a implementar novas políticas, intensificar pesquisas e elaborar planos de ação para a abordagem do problema de forma eficaz.

Em 2019, o FDA (Food and Drug Administration - EUA) concluiu que 11,4 mil toneladas de antimicrobianos estavam sendo empregados anualmente na indústria de produção animal. O uso não terapêutico de agentes antimicrobianos na criação de animais foi estabelecido na década de 1950 e sua administração tem o intuito de aumentar a eficiência alimentar, fazer os animais ganharem peso e mantê-los saudáveis. Esta prática, porém, pode promover a resistência em bactérias presentes na microbiota

animal e estar relacionada ao aumento na incidência de microrganismos patogênicos resistentes isolados de cortes de carne.

O uso de antimicrobianos como aditivos zootécnicos melhoradores de desempenho em animais produtores de alimentos foi banido na União Europeia em 2003, e em 2012 o FDA proibiu o uso desses aditivos na pecuária, sem prescrição veterinária, nos Estados Unidos. Apesar disso, a prática no Brasil ainda é permitida pelo Ministério da Agricultura. Em sua maioria, os antimicrobianos utilizados são de uso animal exclusivo, porém esta não é uma regra. Assim, o uso extensivo desses agentes na pecuária aumenta a probabilidade de que esses microrganismos contaminantes sejam portadores de genes de resistência. Através da cadeia alimentar, é possível que eles alcancem o trato gastrintestinal (TGI) humano, onde podem atuar como reservatórios de genes de resistência ou se disseminar para outros sítios corporais, resultando em infecções de difícil tratamento.

A posição do Brasil como um dos maiores consumidores e exportadores de carne do mundo evidencia a importância da manutenção da segurança alimentar. De acordo com a literatura, a análise de cortes de carne suína, bovina e de aves realizada em diferentes países e regiões geográficas tem demonstrado ocorrência de linhagens resistentes de diferentes espécies bacterianas como, por exemplo *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*, incluindo linhagens de *E. coli* resistentes à colistina, um dos antibióticos de último recurso contra Gram-negativos, em cortes de carne de frango importados do Brasil. No entanto, estudos nacionais ainda são escassos no sentido de mapeamento da real dimensão do problema no nosso país. Além disso, de acordo com o Ministério da Saúde (Brasil, 2019), produtos animais estão altamente relacionados a doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo, e a prevenção de surtos depende, entre outros fatores, da qualidade microbiológica da matéria prima utilizada. Não existem legislações sanitárias no nosso País que considerem o parâmetro de resistência bacteriana às drogas como critério de qualidade ou segurança alimentar de produtos cárneos.

Assim, informações sobre a presença de bactérias, não necessariamente patogênicas obrigatórias, e negligenciadas pela legislação sanitária, resistentes aos antimicrobianos, que possam contaminar esses produtos, objetivo central desse estudo,

são de grande importância e uma das maiores justificativas desse projeto. A possibilidade de que cortes de carne disponíveis no varejo sejam uma fonte de microrganismos resistentes a múltiplos antimicrobianos constitui um sério problema no contexto da saúde única que envolve aspectos médicos humanos e animais, além de saúde ambiental.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1. A importância e consumo da carne na alimentação humana

Alimentos de origem animal são uma parte importante da dieta humana e fonte significativa de nutrientes. A carne, em especial, fornece proteínas de alta qualidade, ferro de boa biodisponibilidade e quantidades significativas de outros minerais (potássio, magnésio, sódio e cálcio), além de vitaminas (A, B12, B6 e D) (AHMAD; IMRAN; HUSSAIN, 2018). Ela contém 65 a 80% de umidade, 16 a 30% de proteína, 3 a 23% de gordura e cerca de 1% de carboidratos, representados principalmente pelo glicogênio. Além da elevada concentração proteica e potencial anabólico superior comparado às proteínas vegetais, a carne é um elemento-chave das orientações alimentares de muitos países e o ingrediente central ao redor do qual as refeições são baseadas em diversas culturas (COCKING *et al.*, 2020; VAN VLIET; BURD; VAN LOON, 2015; YANG, YIFAN *et al.*, 2012).

A quantidade de carne presente em dietas humanas de diferentes sociedades e entre seus integrantes é variável, porém, o consumo per capita e total consumido mundialmente estão em contínuo aumento. Fatores como a crescente média da renda individual, urbanização, globalização e expansão demográfica são alguns dos motivos de tal aumento, sendo esperado que esse consumo chegue a 35,6 Kg/pessoa/ano até 2031 (MILFORD *et al.*, 2019; OECD-FAO, 2022). De modo a suprir essa demanda, a produção de carne mundial também vem crescendo ao longo dos anos, com uma produção estimada para o ano de 2031 de 337 Mt (OECD-FAO, 2022).

Nesse contexto, o Brasil é um dos países com maior consumo de carne atualmente. Estima-se que até 2029, ele seja responsável pelo consumo per capita anual de 0,5 kg de carne de ovino, 13,4 kg de carne de suíno, 24,4 kg de carne de bovino e 40,4 kg de carne de aves (Figura 1). Além disso, o país está entre os cinco maiores produtores de carne mundiais e é o maior exportador de carne bovina e de aves (USDA, 2021). A receita gerada a partir da exportação em 2019 chegou a 7,59 bilhões de dólares, sendo uma das principais atividades do agronegócio brasileiro (ABIEC, 2020). Mediante ao exposto, de forma a garantir o sucesso a longo prazo da influência do Brasil no mercado de carne internacional e a qualidade do produto comercializado internamente,

medidas preventivas para otimizar a segurança alimentar como um todo são fundamentais.

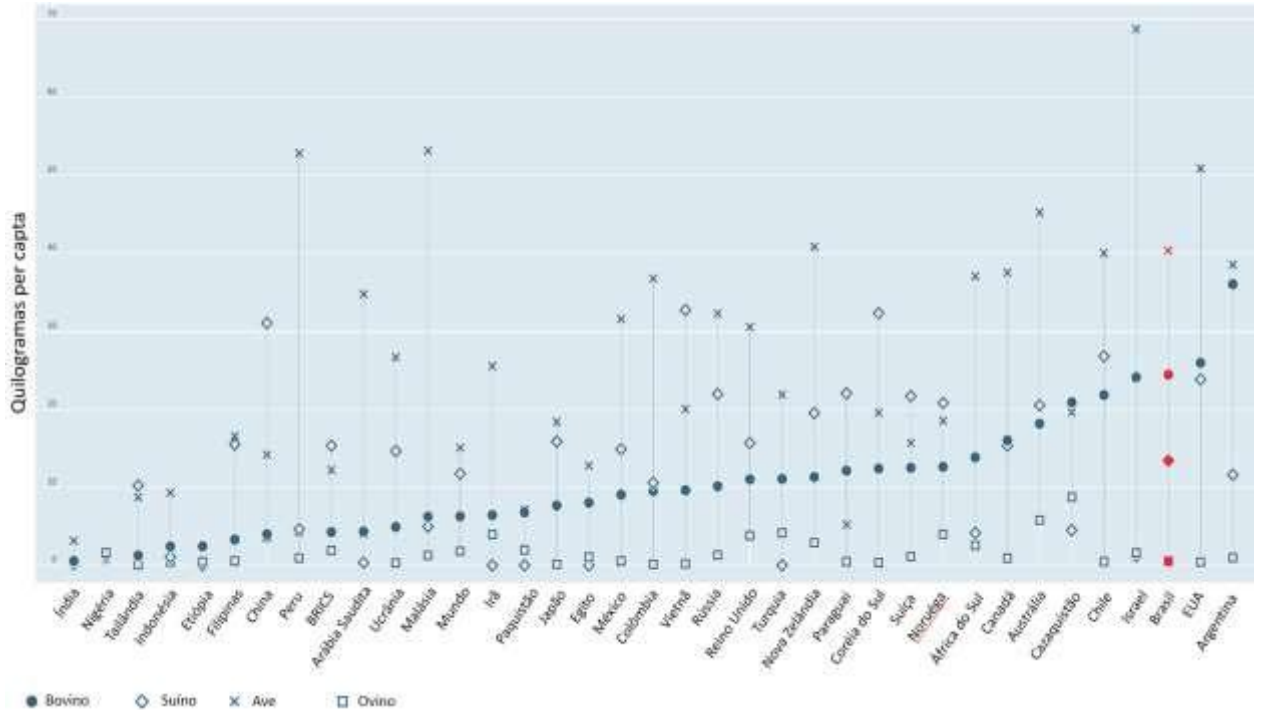


Figura 1: Previsão para o ano de 2029 do consumo per capita de carne de bovino, suíno, ave e ovino em 35 países, BRICS e mundial. Fonte: OECD, 2021.

2.2. Segurança alimentar e a contaminação de alimentos por microrganismos de interesse clínico

A segurança alimentar é um direito humano básico que impacta diretamente a saúde e economia de uma população. O consumo de alimentos não seguros cria um ciclo vicioso de desnutrição e doenças nas parcelas mais vulneráveis da população, e o fornecimento de alimentos seguros oferece apoio ao desenvolvimento de economias, comércio e turismo (FAO e OMS, 2003). Fatores como a globalização, urbanização e aumento no padrão de vida intensificaram o interesse em segurança alimentar durante as últimas décadas, tornando-a mais fundamental do que nunca (FUNG, WANG e MENON, 2018). Assim, atualmente, a preocupação com o possível comprometimento da qualidade dos alimentos ocorre em todos os segmentos do sistema alimentar (LIGUORI *et al.*, 2022).

A contaminação de produtos alimentares pode ser de natureza:

- Física: presença de objetos físicos no alimento como cabelos, unhas, pedaços de vidro, metais, entre outros;
- Química: presença de substâncias químicas exógenas prejudiciais à saúde como por exemplo produtos de limpeza, agrotóxicos ou toxinas;
- Biológica: presença de parasitos, príons, vírus, fungos ou bactérias com potencial patogênico ao ser humano (SADIKU; ASHAOLU; MUSA, 2020).

Nesse contexto, a contaminação de alimentos por microrganismos de interesse clínico, sua persistência, reprodução e/ou produção de toxinas configura uma das maiores preocupações das indústrias alimentares, agências de regulação e consumidores em todo o mundo. Quase todos os tipos de alimentos podem ser veículos de transmissão de patógenos e/ou das toxinas que eles produzem. Não obstante, certos veículos constituem uma maior ameaça em potencial, sendo classificados como alimentos de alto risco. Entre eles, estão os produtos de origem animal, incluindo a carne (EFSA-ECDC, 2017).

De modo a garantir a qualidade da carne comercializada e evitar sua contaminação, a legislação brasileira determina que o pH ideal para o consumo da carne seja de 5,8 a 6,2, sendo as carnes que estão acima do pH 6,4 são consideradas impróprias para o consumo, devido a elevado nível de deterioração microbiana (BRASIL, 1981). Ainda, o armazenamento do produto fresco em embalagens íntegras e limpas em temperatura de 0 a 4°C graus é imprescindível para controlar o crescimento microbiano e evitar alteração em suas propriedades organolépticas (BRASIL, 2017). Finalmente, não é permitida a presença de *Salmonella* em carnes de suínos, bovinos, aves e pescados; a contagem máxima de *Escherichia coli* é de 10^3 UFC/g e de microrganismos aeróbios mesófilos é de 5×10^6 UFC/g (BRASIL, 2019).

Amostras ambientais (água, solo, fezes), falta de padronização no tráfego pelos variados ambientes da cadeia de produção e mãos de funcionários não higienizadas são algumas das fontes de contaminação na cadeia de produção da carne (ABRIL *et al.*, 2020; DANKWA; MACHADO; PERRY, 2020; SINGH, RAM LAKHAN; MONDAL, 2019). Superfícies mal higienizadas (facas, esteiras transportadoras, tábuas de corte) e projeto não-higiênico de fábricas e equipamentos também são grandes facilitadores para o desenvolvimento de biofilmes no ambiente de processamento e contaminação cruzada dos produtos (RIPOLLES-AVILA *et al.*, 2019). No varejo, o prazo de validade, material e tipo da embalagem e sistema de refrigeração são fatores que devem ser considerados para manutenção da qualidade da carne e prevenção de contaminação adicional por patógenos (BARBOSA-CÁNOVAS *et al.*, 2020). Em ambiente domiciliar, a contaminação cruzada também pode ocorrer quando não há higienização adequada de superfícies e utensílios entre o preparo de diferentes alimentos (SANTOS-FERREIRA *et al.*, 2021).

A Organização Mundial de Saúde estima que 600 milhões de pessoas, ou 1 em cada 10, adoecem após consumir alimentos contaminados, e 420 mil morrem todos os anos (WHO, 2015). Além das implicações sociais, há uma perda de produtividade de cerca de 33 milhões de anos de vida saudáveis, sendo 40% correspondente a crianças de até 5 anos (OMS, 2015). Essa perda resulta em um impacto econômico de US\$ 95,2 bilhões por ano, juntamente a um custo anual de tratamento de doenças transmitidas por alimentos de US\$ 15 bilhões por ano (IBRD-IDA, 2018).

Apesar de alguns vírus serem responsáveis por diversos surtos e hospitalizações devido à doenças transmitidas por alimentos em todo o mundo, bactérias ainda são as causas mais frequentes dessas doenças (CDC, 2020; THAKALI; MACRAE, 2021). De modo geral, patógenos bacterianos transmitidos por alimentos causam doenças a partir da pré-produção de toxinas nos alimentos, produção de toxinas no trato gastrointestinal após colonização do mesmo ou invasão das células epiteliais do intestino (BINTSIS, 2017). São doenças frequentemente autolimitantes, mas que podem levar à morte indivíduos vulneráveis, como crianças, idosos e imunocomprometidos (SMITH; FRATAMICO, 2015).

O gênero *Staphylococcus*, em especial a espécie *Staphylococcus aureus*, é responsável pela intoxicação alimentar estafilocócica, uma das doenças transmitidas por alimentos de maior frequência no mundo (BARBOSA-CÁNOVAS *et al.*, 2020; CDC, 2020). Essa intoxicação é causada pela ingestão de enterotoxinas produzidas por *S. aureus* no alimento contaminado, e os sintomas incluem náusea, vômito, dor de cabeça, fraqueza, dor abdominal, síndrome diarreica, febre e calafrios (SINGH, RAM LAKHAN; MONDAL, 2019). Uma vez que essa espécie bacteriana é comumente encontrada na pele humana, alimentos que exigem maior grau de manipulação podem ser facilmente contaminados se práticas de higiene adequadas não forem empregadas (BINTSIS, 2017). A intoxicação alimentar por estafilococos é frequentemente associada a saladas e alimentos ricos em proteínas, como carne, produtos cárneos, laticínios e ovos (ANTUNES; NOVAIS; PEIXE, 2020).

Os membros da ordem *Enterobacterales* também estão entre os agentes etiológicos de doenças transmitidas por alimentos de maior importância em todo o mundo (CDC, 2020; HEREDIA; GARCÍA, 2018; HINDERMANN *et al.*, 2017; RILEY, 2020; SMITH; FRATAMICO, 2015). A alta taxa de morbidez e mortalidade causada por esses microrganismos evidenciam a importância da ordem *Enterobacterales* no contexto da segurança alimentar, sendo o consumo de produtos cárneos uma das principais vias de exposição à esses microrganismos (HEREDIA & GARCÍA, 2018; KULASOORIYA *et al.*, 2019; SHARMA *et al.*, 2019).

2.2.1. A ordem *Enterobacterales* (família *Enterobacteriaceae*)

Recentemente vários gêneros de Gram negativos de importância potencial na saúde humana e animal foram reclassificados fora da família *Enterobacteriaceae*. Assim, a utilização da família para abranger enterobactérias putativas de relevância humana e animal não é mais adequado. Nesse contexto, a ordem *Enterobacterales* abrange essas novas classificações taxonômicas e foram grupo vasto, diverso e heterogêneo que compreende mais de 68 gêneros e mais de 355 espécies (JANDA; ABBOTT, 2021). Ela pertence à classe *Gammaproteobacteria* e é composta por bastonetes Gram-negativos anaeróbios facultativos e não formadores de esporos que, quando móveis, possuem

flagelos do tipo peritríquios (FARMER, FARMER e HOLMES, 2005). Os membros dessa ordem são ubíquos no ambiente e podem ser encontrados no solo, água, plantas e em associação com outros seres vivos, onde situam-se principalmente no trato gastrointestinal. Algumas das espécies de maior importância para a saúde animal e humana incluem *Salmonella spp.*, *Yersinia enterocolítica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Shigella spp.*, *Cronobacter spp.*, *Proteus spp.*, entre outras.

Originalmente, a identificação de *Enterobacterales* era baseada no uso de provas bioquímicas e características morfotintoriais, porém, as caracterizações clássicas que definiam a família não são mais indubitáveis (ADEOLU et al., 2018; ROSENBERG, DELONG e THOMPSON, 2014). Hoje, a filogenia e interrelações entre essas bactérias são baseadas em análises da sequência do gene codificador do rRNA 16S. Mesmo sendo considerado o padrão ouro na identificação bacteriana a nível de espécie, a distinção entre *Enterobacterales* pode ser difícil devido à resolução insuficiente causada pela limitada divergência de sequências no locus mencionado (MCLEAN et al., 2019). Por este motivo, há a necessidade da utilização de técnicas de identificação adicionais, o que resultou em repetidas mudanças taxonômicas nas últimas décadas (MCLEAN et al., 2019; MORALES-LÓPEZ et al., 2019).

Baseado em dados filogenéticos e na literatura, Adeolu e colaboradores (2016) propuseram diversas modificações envolvendo a taxonomia da ordem *Enterobacterales* e sua única família, *Enterobacteriaceae*. Além da proposta de correção do nome da ordem de “*Enterobacterales*” para “*Enterobacterales*”, espécies antes pertencentes à família *Enterobacteriaceae* foram reclassificadas em seis novas famílias com >60% de semelhança entre seus genomas, sendo estas *Erwiniaceae*, *Pectobacteriaceae*, *Yersiniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae* e *Budiviciaceae*. A família *Enterobacteriaceae* ainda é a maior dentro da ordem *Enterobacterales*, porém gêneros como *Edwardsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia* e *Yersinia*, há muitos anos conhecidos como enterobactérias, agora fazem parte das seis novas famílias (Figura 2).

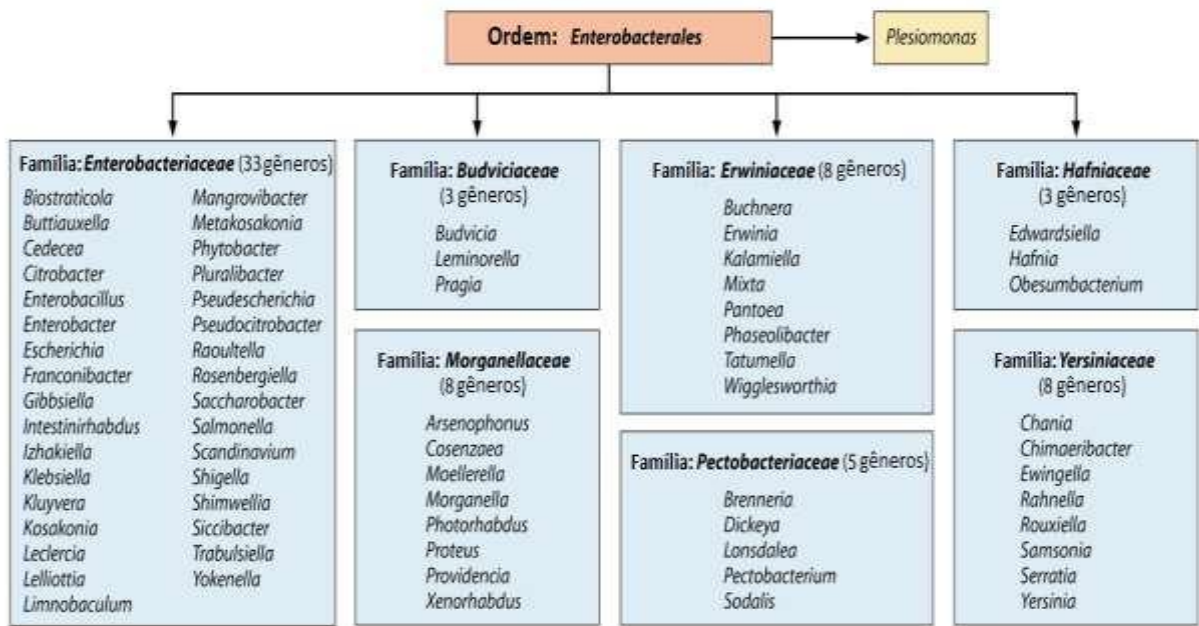


Figura 2: Classificação proposta por Adeolu et al. (2016) da ordem *Enterobacterales* (JANDA; ABBOTT, 2021).

Membros da ordem *Enterobacterales* são empregados em inúmeras aplicações biotecnológicas na atualidade. A espécie mais utilizada é *Escherichia coli*, uma hospedeira comum para a produção de proteínas recombinantes e frequente alvo de engenharia metabólica (PONTRELLI et al., 2018). Linhagens do gênero *Serratia* possuem um grande potencial para biorremediação, e estudos indicam a possibilidade do uso de *Pantoea agglomerans* na luta contra a infecção de malária em mosquitos (ARAÚJO et al., 2019; WANG et al., 2012). Ainda, o uso de *Salmonella entérica* sorovar Typhimurium no tratamento contra o câncer é intensamente estudado e demonstrou resultados promissores em modelos animais (LIANG et al., 2019).

Apesar da importância biotecnológica, o verdadeiro destaque da ordem *Enterobacterales* reside em sua relevância médica, em saúde pública e veterinária. Muitas espécies fazem parte da microbiota residente de animais e podem desempenhar um importante papel no processo digestivo e de formação de certas vitaminas, como *E. coli* (GALLO et al., 2020). Apesar disso, essas espécies também podem atuar como microrganismos oportunistas, que emergem como resultado de perturbações em microbiomas saudáveis que levam à sua seleção e expansão (JOCHUM; STECHER,

2020). Sua proliferação pode agravar processos inflamatórios, desencadear doenças autoimunes e levar a condições potencialmente fatais (CHANDRA *et al.*, 2021).

Alguns gêneros da ordem *Enterobacterales* podem ser responsáveis por uma ampla gama de infecções como sepse, pneumonia, infecções do trato urinário (ITU), gastroenterites e outras infecções intra-abdominais (IIA) (MCLEAN *et al.*, 2019; SHEU *et al.*, 2019). De acordo com o CDC (Centers for Disease Control - EUA), eles também constituem alguns dos mais importantes patógenos implicados em infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) (CDC, 2019). Estudos indicam que baseado em frequência geral, *Escherichia coli*, *Klebsiella* e *Enterobacter* ficaram no 2º, 7º e 8º lugares, respectivamente, e *Proteus*, *Serratia* e *Citrobacter* ficaram entre o 11º e 16º lugares em número de IRAS relatadas nos Estados Unidos (KANG *et al.*, 2012). Ainda, estima-se que *Enterobacterales* sejam responsáveis por causar 23% a 31% das IRAS associadas a acessos centrais em enfermarias adultas, pediátricas e oncológicas (NOVOSAD *et al.*, 2020).

No âmbito das doenças transmitidas por alimentos, a ordem *Enterobacterales* é bem representada por diversos gêneros, sendo os mais relevantes *Salmonella spp.*, *Escherichia coli*, *Shigella spp.* e *Yersinia enterocolitica*. Nos Estados Unidos, apenas esses gêneros são responsáveis por 40% dos casos de doenças transmitidas por alimentos, incluindo enterites, colites e disenterias (CDC, 2020; WANG, FANGKUN; ZHANG; NIU, 2021).

Salmonella tem a habilidade de causar dois tipos de doenças: a salmonelose não tifóide, que apresenta sintomas de diarreia, vômito, dor de cabeça, dor abdominal e febre leves a moderados; e a febre tifóide, que envolve sintomas similares de maior severidade. A presença de ilhas de patogenicidade que codificam variados fatores de virulência permite a colonização e infecção do organismo hospedeiro. As ilhas de patogenicidade de *Salmonella* 1 e 2 (SPI-1 e SPI-2) são as mais relevantes, codificando dois tipos diferentes de sistema de secreção do tipo III para a entrega de moléculas efetoras na célula hospedeira que resultam em internalização da bactéria e disseminação sistêmica (BINTSIS, 2017a). Os alimentos mais frequentemente contaminados por *Salmonella* são ovos e carnes, e a contaminação ocorre principalmente através de

contaminação cruzada por água, solo ou fezes durante a cadeia de produção e preparo do alimento (FUNG; WANG; MENON, 2018b; YENI *et al.*, 2016).

A maioria das linhagens de *Escherichia*, em especial *E. coli*, são inofensivas, porém outras adquiriram características de virulência como a produção de toxinas, adesinas e invasinas, tornando-as patogênicas para humanos. A infecção ocorre através do consumo de alimentos contaminados com fezes, incluindo carne mal cozida, laticínios e vegetais crus (GALLO *et al.*, 2020). As *E. coli* diarreio gênicas foram categorizadas em seis grupos de acordo com seu mecanismo de patogenicidade, sendo estes: *E. coli* enteropatogênica (EPEC); *E. coli* enterohemorrágica (EHEC ou STEC – *E. coli* produtora de toxina Shiga); *E. coli* enterotoxigênica (ETEC); *E. coli* enteroagregativa (EAEC); *E. coli* enteroinvasiva (EIEC); e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (MARE *et al.*, 2021). Dentre os sintomas causados por esses grupos estão diarreia sanguinolenta, cólicas abdominais e febre em variados graus de severidade (JANDA; ABBOTT, 2021). Além dos sintomas anteriormente mencionados, a linhagem de EHEC *E. coli* O157:H7 frequentemente causa síndrome hemolítico-urêmica em crianças, caracterizada por falência renal aguda, anemia hemolítica e trombocitopenia (CHENG, MING FANG *et al.*, 2016).

Shigella é o agente etiológico da disenteria bacilar ou shigelose, uma infecção invasiva do cólon que pode causar de diarreia aquosa a doença inflamatória intestinal, envolvendo fezes sanguinolentas e com muco, cólicas abdominais e tenesmo (SINGH, RAM LAKHAN; MONDAL, 2019). Surtos relacionados a esse gênero ocorrem mais frequentemente em locais de higiene e saneamento comprometidos e já envolveram o consumo de leite, carne, saladas, frutos do mar e outros tipos de alimentos frescos (BENNISH; AHMED, 2020). A espécie *Shigella dysenteriae* produz a toxina Shiga, que está codificada em seu genoma e é responsável por causar síndrome urêmica hemolítica (LIU, YANG *et al.*, 2021). A virulência de *Shigella* é dependente de um plasmídeo de virulência que codifica componentes de do sistema de secreção do tipo III de *Shigella* (T3SS). Ele é necessário para a invasão e secreção de fatores de virulência nas células epiteliais do intestino, levando à destruição inflamatória do revestimento do órgão (BAJUNAID *et al.*, 2020).

A yersinose tem como agentes etiológicos principalmente *Y. enterocolitica* e *Y. pseudotuberculosis*. É uma doença transmitida em maior parte pelo consumo de carne

e miúdos de suínos e caracterizada por dor abdominal severa, febre, diarreia e vômito (SMITH; FRATAMICO, 2015). *Yersinia* é capaz de se desenvolver em temperaturas de refrigeração, o que torna alimentos pré-prontos ou refrigerados uma fonte de contaminação ainda mais significativa (SARAKA *et al.*, 2017). A ausência do plasmídeo de virulência pYV está associada à não patogenicidade em *Y. colitica*, uma vez que ele codifica a adesina de *Yersinia* YadA. Esta adesina atua na mediação da adesão e invasão às células do hospedeiro (GUILLIER *et al.*, 2021).

Considerando o impacto causado por membros da ordem *Enterobacterales* na saúde pública, em especial devido às doenças transmitidas por alimentos, a resistência a antimicrobianos nessas bactérias está associada a significativa morbidez e mortalidade em todo o mundo, possuindo sérias consequências clínicas e socioeconômicas.

2.3.A resistência bacteriana aos antimicrobianos e sua interface no contexto da saúde única

Os antimicrobianos são uma das formas de quimioterapia mais bem sucedidas, e sua descoberta há mais de 70 anos iniciou um período de inovação e implementação de drogas na medicina veterinária, humana e na agricultura. Essas descobertas vieram acompanhadas da emergência de microrganismos resistentes, o que levou estudiosos à conclusão de que a resistência em bactérias patogênicas era um fenômeno moderno (D'COSTA *et al.*, 2011; LIVERMORE, 2009). No entanto, a descoberta de traços de tetraciclina em esqueletos humanos do fim do império romano indica que já naquela época havia a ingestão de materiais contendo esse antimicrobiano (COOK *et al.*, 1989). Ainda, estudos envolvendo reconstruções filogenéticas sugerem que genes codificadores de metalobetalactamases, por exemplo, se originaram há mais de dois bilhões de anos (GARAU *et al.*, 2005). Estas e outras evidências apontam para o fato de que a resistência bacteriana aos antimicrobianos é um fenômeno natural que precede o início da aplicação em larga escala dessas drogas pelos seres humanos (D'COSTA *et al.*, 2011).

Atualmente, a resistência aos antimicrobianos é considerada pela OMS como um problema global urgente e complexo que configura um dos maiores desafios da saúde

pública contemporânea. O surgimento de microrganismos multirresistentes resulta em infecções que respondem a poucos ou nenhum dos agentes antimicrobianos disponíveis no mercado, o que leva alguns autores a acreditar na eminência de uma era pós-antibiótica (TARÍN-PELLÓ, SUAY-GARCÍA e PÉREZ-GRACIA, 2022). Ao longo dos últimos anos, a incidência de infecções por microrganismos resistentes tem aumentado e no presente momento, em torno de 700.000 pessoas morrem a cada ano devido à resistência a antimicrobianos em todo o mundo. Estimativas indicam que se o problema não for abordado, esse número pode chegar a 10 milhões em 2050, ao custo de 100 trilhões de dólares para a economia mundial (O'NEILL, 2014).

O baixo interesse da indústria farmacêutica no desenvolvimento de novos antimicrobianos é um dos fatores que contribuem para a ocorrência de infecções bacterianas de difícil tratamento (FAIR e TOR, 2014; SINGER et al., 2019). Novas drogas devem passar pelo processo de provar não apenas sua eficácia, mas também segurança, farmacocinética favorável e bom custo-benefício. Esse é um processo longo e dispendioso onde estima-se que cinco a cada dez mil moléculas com potencial antimicrobiano chegam a estudos de fase 1, e em que apenas uma dessas recebe aprovação para o uso em humanos (CHOFFNES et al., 2010; ALTAMIRANO e BARR, 2019). Antimicrobianos geralmente são administrados por períodos de tempo limitados, o que os torna menos lucrativos do que drogas utilizadas para doenças crônicas, e estão sujeitos à emergência de resistência. Além disso, uma vez que um novo antimicrobiano é aprovado para uso comercial, ele é mantido como reserva e apenas prescrito para infecções que antimicrobianos mais estabelecidos não conseguem tratar (FAIR e TOR, 2014). Todos esses fatores diminuem consideravelmente os lucros recebidos pelas empresas e tornam o desenvolvimento de novas drogas menos atraente para a indústria farmacêutica. Sendo assim, esse cenário contribui para a escassez de novas drogas antimicrobianas, agravando o problema da resistência por estagnar o arsenal disponível de opções terapêuticas (MARTENS e DEMAIN, 2017; NWOBODO et al., 2022).

As atividades antropogênicas, em especial as envolvidas na tentativa de controle do crescimento bacteriano, juntamente com a habilidade das bactérias de acumular genes de resistência contra tais tentativas também agravaram consideravelmente o fenômeno da resistência (Figura 1) (ALTAMIRANO e BARR, 2019).

A exposição à antimicrobianos, incluindo sua aplicação exagerada na pecuária, prescrição excessiva por médicos e o mal uso por pacientes resultam na liberação de toneladas de drogas em efluentes e reservatórios (FINLEY et al., 2013; GILLINGS et al., 2018). Somado a isso, a pandemia de COVID-19 (Doença do Coronavírus 2019) provocou o enfraquecimento mundial dos programas de controle do uso de antimicrobianos, com consequente intensificação de sua aplicação e acentuadas concentrações residuais dessas drogas nos efluentes provenientes de instalações farmacêuticas, centros de saúde e residências (RIZVI e AHAMMAD, 2022). Os fatores citados, aliados à falta de tratamento adequado da água e redução da distância entre fazendas e cidades, resultam na exposição contínua de comunidades bacterianas à drogas antimicrobianas. O acúmulo dessas drogas em redes tróficas leva a aumento da pressão seletiva e do repertório de marcadores moleculares de resistência (FINLEY et al., 2013). Hoje, os genes de resistência aos antimicrobianos são considerados um tipo emergente de poluente ambiental que ameaça à segurança alimentar e a saúde pública, e por este motivo, essas drogas e seus efeitos no ambiente tornaram-se um importante tema na ciência ambiental. (GILLINGS et al., 2018; SUI et al., 2019).

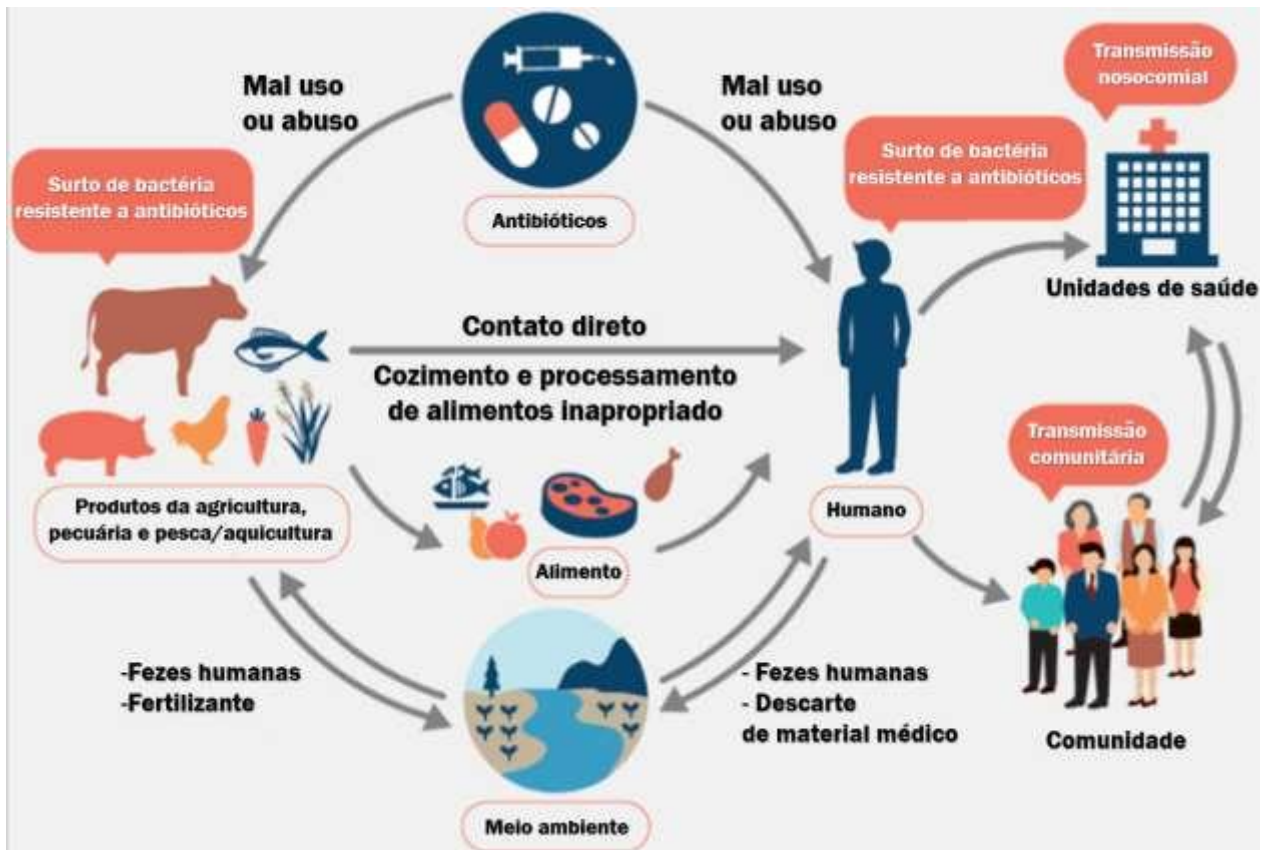


Figura 3: Vias de exposição humanas e ações antropogênicas que contribuem para os reservatórios ambientais de bactérias resistentes a antimicrobianos, resíduos de drogas e genes de resistência (NHI, 2019).

Apesar da intensificação do fenômeno da resistência ser principalmente atribuída ao mal-uso de antimicrobianos, a exposição frequente de microrganismos a biocidas e metais tóxicos também é reconhecida como um fator agravante. Metais tóxicos, em especial, podem permanecer estáveis e ser persistentes no ambiente por longos períodos, o que torna seu impacto ainda maior. O acúmulo desses metais nos ecossistemas é originário de resíduos industriais e do emprego de aditivos alimentares, pesticidas, fertilizantes e dentre outros defensivos nas atividades agropecuárias (CHENG et al., 2019). Concentrações inibitórias desses metais em ecossistemas podem resultar seleção de microrganismos tolerantes aos mesmos, um fenótipo frequentemente relacionado à Co resistência, resistência cruzada e correção com a resistência a antimicrobianos (LI, ZHEN *et al.*, 2022). Estudos indicam a correlação positiva entre a expressão de resistência múltipla a antimicrobianos e a metais e também relacionam a

presença do gene que confere tolerância ao mercúrio *merA* ao transposon Tn21, (CHENIA et al., 2020; JACOBS, 2017). Além disso, os genes de resistência à sulfonamidas *sulA* e *sulIII* foram fortemente correlacionados à níveis de cobre, zinco e mercúrio, e *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) é frequentemente associado à tolerância a zinco e cobre (AMACHAWADI et al., 2015; JI et al., 2012; YAZDANKHAH, RUDI e BERNHOFT, 2014).

A transferência de DNA (ácido desoxirribonucleico) entre bactérias e sua transposição dentro do genoma também desempenham papéis consideráveis na propagação de marcadores moleculares de resistência. Essa propagação pode ocorrer entre indivíduos da mesma espécie ou de espécies diferentes através dos processos de conjugação, transformação e/ou transdução. A transferência horizontal é importante na evolução e transmissão de genes de resistência entre espécies bacterianas, pois inclui o movimento desses genes de microrganismos do TGI de animais e seres humanos para microrganismos ambientais e vice-versa (FAIR e TOR, 2014; MANAIA, 2017). Somado a isso, após a transferência, esses genes de resistência podem se reunir em agrupamentos juntamente a elementos de inserção e transposons em regiões do DNA que frequentemente são móveis devido à sua localização em plasmídeos ou outros elementos conjugativos (GILLINGS, 2018; WOZNIAK e WALDOR, 2010). Isto leva ao surgimento de novas moléculas de DNA móveis que contém uma variedade de genes de resistência, cada um com diferentes origens filogenéticas (GILLINGS et al., 2018; WOZNIAK e WALDOR, 2010). Desta forma, este processo resulta na emergência de novos mecanismos de resistência adquirida em patógenos, genes que originalmente estariam presentes em microrganismos inofensivos (FINLEY et al., 2013).

O combate à resistência a antimicrobianos tem sido discutido pela comunidade científica e por organizações internacionais como a OMS, FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) e OIE (*World Organization for Animal Health*) adotando a abordagem Saúde Única. Ela reconhece a inter-relação entre a saúde humana, animal, vegetal e do meio ambiente, e incentiva a adoção de políticas públicas eficazes na prevenção e controle de doenças. Por conseguinte, são necessários esforços coordenados para a implementar novas políticas, intensificar pesquisas e elaborar planos de ação para a abordagem do problema de forma eficaz. A resistência a drogas

antimicrobianas é uma ameaça à saúde pública mundial, em especial em patógenos Gram-negativos, o que limita as opções clínicas de tratamento para infecções bacterianas.

2.3.1. Resistência a antimicrobianos em *Enterobacterales*

A resistência a drogas antimicrobianas é uma característica cada vez mais comum entre membros da ordem *Enterobacterales*. Devido à habilidade de adquirir e disseminar uma ampla variedade de marcadores moleculares de resistência a antimicrobianos, somado à crescente pressão seletiva causada pelo uso indiscriminado de antimicrobianos, a resistência em *Enterobacterales* tem se agravado rapidamente (THEURETZBACHER *et al.*, 2020). Atualmente, não são raras linhagens consideradas multirresistentes a drogas (MDR – multi drug-resistant), capazes de expressar resistência a três ou mais classes antimicrobianos (BINSKER; KÄSBOHRER; HAMMERL, 2022). Ainda, há rápida disseminação de linhagens extensivamente resistentes a drogas (XRD – extensively drug-resistant; susceptíveis a apenas duas classes de antimicrobianos), e pan-resistentes (PDR – pan drug-resistant; resistente a todas as classes de antimicrobianos) (MAGIORAKOS *et al.*, 2012).

Já nas décadas de 80 e 90, estudos citavam a existência de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs – Extended Spectrum β -Lactamases) em *Enterobacterales*, configurando a resistência à classe de drogas mais importantes disponíveis na terapia antimicrobiana contemporânea, os β -lactâmicos (DE ANGELIS *et al.*, 2020). É comum que a produção de ESBLs ocorra juntamente a mecanismos de resistência a outros antimicrobianos, tornando os microrganismos multirresistentes. Com a rápida emergência e disseminação de isolados capazes de produzir essas enzimas, opções adequadas para a antibioticoterapia se tornaram limitadas e a comunidade médica foi pressionada a utilizar carbapenêmicos como tratamento empírico de primeira linha (SHEU *et al.*, 2019). No entanto, a maior utilização dessa classe de antimicrobianos para possíveis infecções causadas por *Enterobacterales* produtoras de ESBL resultou na emergência de *Enterobacterales* resistentes a carbapenêmicos (ERCs). Essas linhagens causam infecções de difícil ou nenhum tratamento disponível devido ao fato de que

carbapenêmicos constituem uma das últimas linhas de defesa possíveis na atualidade (LYNCH; CLARK; ZHANEL, 2021). Por esse motivo, a OMS considera esses microrganismos e outros membros da ordem *Enterobacterales* como “patógenos prioritários” que constituem uma das maiores ameaças à saúde humana mundial na atualidade (OMS, 2017)

A falta de novos antimicrobianos ativos contra essas linhagens bacterianas exige o uso cada vez mais frequente de antimicrobianos considerados como último recurso, como a colistina. No entanto, isso resultou na descrição cada vez mais frequente de resistência a essa droga em microrganismos provenientes de animais e humanos (HOMEIER-BACHMANN *et al.*, 2021; MONACO *et al.*, 2014). Inicialmente, pensava-se que a resistência à colistina era associada apenas ao cromossomo bacteriano, porém, em 2015, o primeiro gene de resistência móvel à droga, (*mcr* – mobile colistin resistance) foi descoberto em um plasmídeo, fator agravante para o cenário a resistência em *Enterobacterales* como um todo (LIU, YI YUN *et al.*, 2016).

2.3.1.1. A resistência aos β -Lactâmicos

Os β -lactâmicos são os mais frequentemente prescritos agentes antimicrobianos devido a sua segurança, eficácia e amplitude de espectro de ação (BUSH e BRADFORD, 2019). As principais classes de β -lactâmicos incluem penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos, e todos possuem em sua estrutura um anel azetidina de quatro membros ou β -lactâmico (Figura 4). Eles agem ligando-se de forma irreversível às proteínas ligadoras de penicilina (PBP) necessárias para a etapa final de transpeptidação da síntese de peptídeoglicano, o que impede a construção da parede celular.

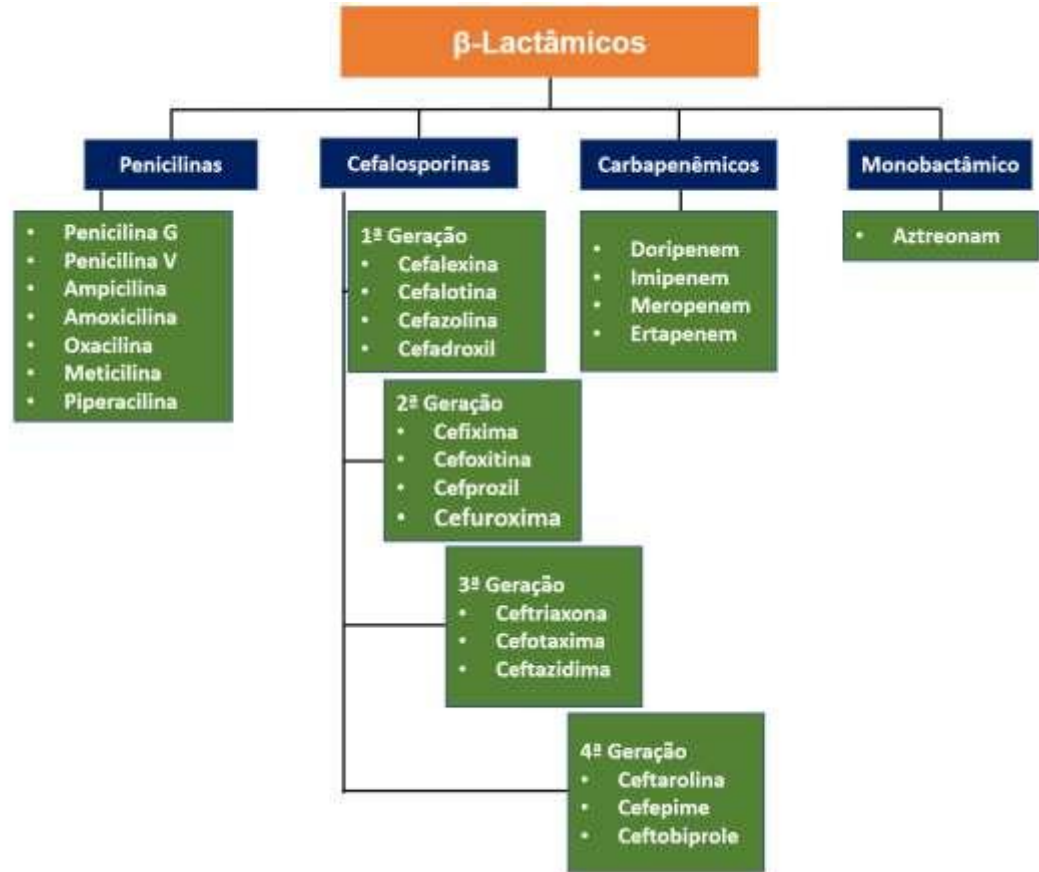


Figura 4. Principais antimicrobianos da classe dos β -lactâmicos (PANDEY; CASCELLA, 2022).

O maior desafio para o uso de β -lactâmicos são as β -lactamases, enzimas hidrolíticas que facilitam a adição rápida de uma molécula de água à ligação amida do anel β -lactâmico, neutralizando a droga. Muitos diferentes tipos de β -lactamases conferem resistência à esses antimicrobianos, e elas diferem entre si pelo perfil de substrato, perfil de inibidor e homologia de sequência (BONOMO, 2017). Com base nessas características, elas podem ser divididas nas classes A, B, C e D de Amber (PEIRANO e PITOUT, 2019).

A Classe A possui o maior número de enzimas com um amplo espectro de atividade. TEM-1 (em referência ao nome da paciente da qual foi descoberta, Temonieta) e SHV-1 (sulfhydryl reagent variable, ou sulfidril reagent variável) foram as primeiras enzimas detectadas como responsáveis por conferir resistência às primeiras penicilinas e cefalosporinas aprovadas para uso na prática clínica (BUSH e BRADFORD, 2019). A enzima TEM-1 foi a causa primária de resistência à ampicilina em *E. coli* e ainda é a mais

frequentemente encontrada em *Neisseria gonorrhoeae* resistentes a penicilina (LIVERMORE *et al.*, 2011). Já em *Klebsiella pneumoniae*, a resistência a ampicilina está mais comumente associada à SHV-1 (SILVA, YONE *et al.*, 2019).

As β -lactamases de espectro estendido, enzimas com 1 a 3 aminoácidos diferentes em posições-chave, surgiram após a introdução de cefalosporinas de terceira geração e inibidores de β -lactamases (PARTRIDGE, 2009). As primeiras a surgir eram derivadas de TEM e SHV, tornando-se comuns em *K. pneumoniae* responsáveis por infecções nosocomiais na década de 90 (PITOUT *et al.*, 2005). No entanto, a importância dessas enzimas diminuiu devido à disseminação mundial de isolados produtores de ESBL do tipo CTX-M (referência à atividade preferencial contra cefotaxima e à cidade Monique, onde foi descoberta). Desde 2000, *E. coli* produtoras de CTX-M se tornaram importantes causadoras de infecções de origem comunitária, e hoje são as ESBLs mais comuns mundialmente (PARTRIDGE, 2015). Em geral, as enzimas do tipo CTX-M degradam as cefalosporinas de terceira geração e são inibidas por tazobactam e outros inibidores de β -lactamases mais novos, como avibactam, relebactam e vaborbactam (PEIRANO e PITOUT, 2019).

Algumas enzimas da classe A são classificadas como carbapenemases, e incluem SME, NMC-A, IMI, variantes de GES e a mais proeminente, KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) (NORDMANN e POIREL, 2014). Apesar da possibilidade da resistência a carbapenêmicos envolver modificações na permeabilidade da membrana externa e regulação positiva de sistemas de efluxo, a emergência de *Enterobacterales* resistentes a carbapenêmicos se deve principalmente à produção de carbapenemases (PATERSON e DOI, 2017). Já foi demonstrado que linhagens produtoras de KPC exibem multirresistência a antimicrobianos, incluindo cefalosporinas de terceira e quarta geração, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e, é claro, a carbapenêmicos (PATERSON e DOI, 2017). Essas enzimas não são inibidas por clavulanato ou tazobactam, porém são potencialmente inibidas por avibactam e vaborbactam (KAZMIERCZAK *et al.*, 2016; LOMOVSKAYA *et al.*, 2017).

β -lactamases pertencentes à classe B são também denominadas metalo- β -lactamases por apresentarem atividade dependente da presença de íons de zinco. Elas conferem resistência à maioria dos antimicrobianos β -lactâmicos, inclusive

carbapenêmicos, e a inibidores de β -lactamases clínicos, mas não hidrolisam monobactâmicos (CORNAGLIA, GIAMARELLOU e ROSSOLINI, 2011). As enzimas dessa classe mais comuns em *Enterobacterales* são do tipo VIM-1 (Verona Integron-encoded metallo- β -lactamase, ou metalo- β -lactamase codificada no integron Verona) (PARTRIDGE, 2015).

A classe C compreende β -lactamases do tipo AmpC (ampicillin-resistance gene group C, ou gene de resistência à ampicilina tipo C), enzimas que podem ser encontradas em muitas espécies de *Enterobacterales* (BUSH e BRADFORD, 2019). Os genes *ampC* que as codificam geralmente estão associados com genes regulatórios que controlam sua expressão e desrepressão. A expressão basal de AmpC cromossomais é geralmente baixa, mas altos níveis de expressão podem ser induzidos em resposta à β -lactâmicos (JACOBY, 2009). Essas enzimas são responsáveis por resistência à maioria das cefalosporinas, algumas penicilinas e a monobactâmicos (BUSH e BRADFORD, 2019).

A classe D compreende enzimas do tipo OXA (em referência ao seu substrato preferencial, oxacilina), ou , um grupo amplo que exhibe variabilidade em seus substratos e sequências. Elas frequentemente possuem mais atividade contra oxacilina do que penicilina G, e alguns membros do grupo podem degradar cefalosporinas e carbapenêmicos (PARTRIDGE, 2015; BUSH e BRADFORD 2019). Essas enzimas se tornaram importantes nos últimos anos devido à atividade de carbapenemase de alguns membros do grupo. OXA-48 e suas variantes e OXA-181 se disseminaram entre várias espécies de *Enterobacterales* e já foram amplamente documentadas na Europa e no Mediterrâneo (POIREL, POTRON e NORDMANN, 2012).

2.3.1.2. Resistência às Quinolonas

As quinolonas são amplamente utilizadas no tratamento de infecções do trato urinário causadas por *E. coli* e no tratamento de outras infecções causadas por *Enterobacterales* (VAN *et al.*, 2019). Elas são divididas em quatro gerações, sendo a primeira de quinolonas, que contém um núcleo bicíclico relacionado ao composto 4-quinolona, e as restantes de fluoroquinolonas, que contém a adição de um átomo de flúor

na posição R₆ (Figura 5). São drogas de amplo espectro que inibem a síntese do DNA bacteriano interferindo com as enzimas DNA girasse e topoisomerase IV.



Figura 5. Antimicrobianos da classe das quinolonas (PHAM; ZIORA; BLASKOVICH, 2019).

Em *Enterobacterales*, a resistência à fluoroquinolonas ocorre geralmente por alterações nas enzimas alvo ou menor acúmulo da droga na célula devido a mudanças na expressão de porinas ou por mecanismos de efluxo (HOOPER, 2001). Ambas são formas de resistência causadas por mutações cromossomais, porém a resistência à fluoroquinolonas mediada por plasmídeos também existe (PATERSON e DOI, 2017). Ela está associada com o gene *qnr* e plasmídeos que o contém já emergiram em *E. coli* e *K. pneumoniae* (RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011; WANG et al., 2003).

2.3.1.3. Resistência às Tetraciclina

As tetraciclina (doxiciclina, metaciclina, tetraciclina, demeclociclina, oxitetraciclina, entre outras) são drogas antimicrobianas conhecidas por seu amplo espectro de atividade que engloba uma vasta gama de microrganismos Gram-positivos e negativos. Por esse motivo, são amplamente utilizadas na agricultura, aquicultura, veterinária e na prática clínica. Elas inibem a síntese proteica bacteriana ligando-se aos ribossomos e interagindo com a subunidade 30S, o que interfere na sua associação ao

aminoacil-tRNA e impede o alongamento da cadeia peptídica (CHOPRA e ROBERTS, 2001). As tetraciclinas são produtos naturais do metabolismo secundário de actinobactérias, e por isso espera-se que a resistência a elas seja uma característica antiga de bactérias ambientais (BALTZ, 2007).

A resistência pode ocorrer devido a aquisição de genes que codificam o efluxo da droga, geralmente do tipo MFS (major facilitator superfamily – superfamília de facilitadores), incluindo *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(K)*, *tet(L)*, entre outros (ROBERTS e SCHWARZ, 2017). Proteínas de proteção ribossomal (RPPs – ribosomal protection proteins) também podem atuar na resistência contra as tetraciclinas impedindo seu acesso ao ribossomo bacteriano, sendo as RPPs mais comuns Tet(O) e Tet(M), que contém 75% de similaridade de sequência entre si (ONTONG *et al.*, 2021). A inativação enzimática de tetraciclinas também pode ocorrer em *Enterobacterales*, sendo principalmente mediada por tetraciclina destrutases codificadas pelo gene *tet(X)* (SUN *et al.*, 2019). Finalmente, mutações na subunidade ribossomal 30S em *Enterobacterales* também podem ocorrer e resultar em resistência às tetraciclinas (VILLA *et al.*, 2014).

Em patógenos humanos, incluindo *Enterobacterales*, a resistência frequentemente ocorre por transferência horizontal e advém quase exclusivamente de proteção ribossomal ou efluxo (CHOPRA e ROBERTS, 2001; GROSSMAN, 2016). Ambos os mecanismos possuem origens evolucionárias ambientais, porém agora estão amplamente distribuídos em muitos microrganismos comensais e patogênicos.

2.3.1.4. Resistência às Sulfonamidas

Sulfonamidas são antimicrobianos bacteriostáticos de amplo espectro utilizados no tratamento de ITUs, prostatites, uretrites, otites, entre outras doenças. Elas atuam competindo com o ácido para-aminobenzóico pela enzima dihidropteroato sintetase (DHPS), impedindo reações necessárias para a produção de ácido fólico nas bactérias (PARTRIDGE, 2015). Algumas das drogas da classe são a sulfanilamida, sulfametazina, sulfadiazina, sulfametoxazol, sulfasalazina, sulfisoxazol, sulfamerazina, sulfadimetoxina e sulfafurazol. No passado, essas drogas foram amplamente utilizadas na prática clínica, porém seu uso em países desenvolvidos hoje em dia está limitado

devido ao aumento da resistência, potenciais efeitos colaterais e disponibilidade de antimicrobianos mais ativos (VILA-COSTA *et al.*, 2017).

Em *Enterobacterales*, a resistência à essa classe de antimicrobianos está associada dois mecanismos: (1) mutações no gene cromossomal *foIP* que codifica a DHPS; (2) aquisição de genes do tipo *sul* (*sul1*, *sul2* e *sul3*), responsáveis por codificar DHPSs com menor afinidade à sulfonamidas (PARTRIDGE, 2015; VILA-COSTA *et al.*, 2017). O segundo mecanismo de resistência é mais difundido entre os microrganismos, havendo 50% de homologia entre os três genes (SHRIVASTAVA; SHRIVASTAVA; RAMASAMY, 2018).

Genes do tipo *sul* são frequentemente isolados na agropecuária, e supõe-se que sua presença seja sustentada pelo acentuado uso de sulfonamidas nos setores veterinários (BEN *et al.*, 2017; CARD *et al.*, 2016). Eles podem ser encontrados em cromossomos, porém também são muito comuns em elementos genéticos móveis. *sul1* faz parte da região 3'-CS do tipo mais comum de integron classe 1, e *sul2* está associado ao elemento móvel ISCR2. O gene *sul3* está associado a um tipo de integron classe 1 que não possui 3'-CS (PARTRIDGE, 2015; JIANG *et al.*, 2019).

2.3.1.5. Resistência aos Anfenicóis

Anfenicóis são drogas antimicrobianas bacteriostáticas utilizadas no tratamento de salmoneloses, infecções graves no sistema nervoso central, osteomielite, artrite séptica, entre outras doenças (DRAGO, 2019). Exemplos da família incluem o cloranfenicol, tianfenicol, azidanfenicol e florfenicol. Eles possuem uma estrutura fenilpropanoide que atua bloqueando a enzima peptidil transferase na subunidade 50S do ribossomo bacteriano (BARREIRO *et al.*, 2013). O cloranfenicol, droga mais popular da classe, é um antimicrobiano barato e eficaz de amplo espectro muito popular nos primeiros anos após sua introdução no mercado. Apesar disso, efeitos colaterais graves foram observados em advento do seu uso, incluindo anemia aplástica irreversível independente da dose (SCHWARZ; KEHRENBURG e CLOECKAERT, 2004). Por esse motivo e pela disponibilidade de drogas com espectro de ação similar no mercado, o cloranfenicol caiu em desuso (NITZAN *et al.*, 2010). No entanto, a emergência de

patógenos multirresistentes nos últimos anos renovou o interesse da comunidade médica no antimicrobiano em questão.

A resistência ao cloranfenicol pode acontecer primariamente através de cloranfenicol acetiltransferases (CAT, codificadas pelo gene *cat*), enzimas sem relação genética divididas em Tipo A e B que atuam inativando a droga (ROBERTS; SCHWARZ, 2017b). O efluxo por transportadores específicos associados à membrana também pode ser responsável pela resistência, envolvendo os genes *cml*, *cmlA1*, *floR*, entre outros (MURRAY e SHAW, 1997; NITZAN et al., 2010). Os genes que codificam CATs e bombas de efluxo específicas estão em geral associados a elementos genéticos móveis, apesar de alguns mecanismos de efluxo cromossomais já terem sido identificados (PAULSEN; BROWN; SKURRAY, 1996). Ainda, a resistência ainda pode ocorrer por mutações que reduzem a expressão de proteínas de membrana, mutações no rRNA 23S, inativação da droga por 3-O-fosfotransferases ou modificação por uma rRNA 23S metilase (ETTAYEBI; PRASAD; MORGAN, 1985; IZARD; ELLIS, 2000; TORO et al., 1990).

A maioria dos relatos de resistência ao cloranfenicol foi documentada em *Salmonella tify*, enquanto que altas taxas de susceptibilidade foram constatadas em *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Bacteroides fragilis* (PARRY et al., 2002; SNYDMAN et al., 2007). É provável que as altas taxas de susceptibilidade estejam relacionadas ou uso limitado da droga por muitos anos (NITZAN et al., 2010).

2.3.1.6. Resistência aos Aminoglicosídeos

Aminoglicosídeos são uma complexa família de antimicrobianos que possui um núcleo aminociclitol ligado a amino-açúcares através de ligações glicosídicas. Eles foram descobertos em 1943 em actinobactérias do solo, e a primeira droga da família foi a estreptomicina. Hoje, os membros do grupo mais clinicamente relevantes incluem amicacina, gentamicina e tobramicina, drogas amplamente utilizadas por via intravenosa ou via nebulização para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e micobactérias atípicas (DOI, WACHINO e ARAKAWA, 2017). A maioria dos aminoglicosídeos age ligando-se ao sítio de reconhecimento do aminoacil-tRNA, o centro de decodificação do rRNA 16S do ribossomo, levando à inibição

da síntese de polipeptídeos e subsequente morte celular (PARTRIDGE, 2015; DOI, WACHINO e ARAKAWA, 2017).

Em *Enterobacterales*, a resistência a essa família de antimicrobianos ocorre comumente devido a genes móveis que codificam enzimas modificadoras de aminoglicosídeo (AME - Aminoglycoside Modifying Enzyme) (RAMIREZ e TOLMASKY, 2011). Essas enzimas modificam o núcleo aminociclitol ou as porções de açúcares e inativam a droga. Mais de 50 genes codificadores de AMEs já foram identificados, porém alguns são mais comuns entre os isolados clínicos da ordem *Enterobacterales*, em especial as variantes do gene *aacA4* ou *aac(6')-1b* (PARTRIDGE *et al.*, 2009).

Além de AMEs, metiltransferases 16S rRNA (RMTases 16S) codificadas em plasmídeos também foram identificadas em *Enterobacterales* (WACHINO e ARAKAWA, 2012). Elas são responsáveis por adicionar um grupo metil à nucleotídeos específicos no sítio de ligação do aminoacil-tRNA, protegendo o ribossomo da ligação de aminoglicosídeos. As RMTases 16S são intrínsecas em actinobactérias e constituem sua autodefesa contra os metabólitos produzidos, porém essas enzimas já foram encontradas em outras espécies bacterianas associadas a elementos genéticos móveis (GOLEBIEWSKI *et al.*, 2007). As RMTases 16S mais comumente identificadas em *Enterobacterales* são as enzimas ArmA e RmtB (PARTRIDGE, 2015).

Mediante ao exposto, a prevenção da disseminação de microrganismos pertencentes a ordem *Enterobacterales* em carnes comercializadas no mercado doméstico e internacional é essencial para reduzir o impacto social e econômico das doenças causadas por esses microrganismos e melhorar a segurança alimentar para a população. A posição do Brasil como um dos maiores exportadores de carne mundiais torna cruciais estudos de vigilância, devido às implicações das *Enterobacterales* para a saúde mundial e o potencial de dispersão de linhagens multirresistentes.

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a ocorrência de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas de interesse clínico-microbiológico em cortes de carne comercializados na cidade de Juiz de Fora – MG, e analisar aspectos fisiológicos e moleculares do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos de interesse clínico-microbiológico e ambiental das bactérias Gram-negativas isoladas.

3.2. Objetivos Específicos

- Determinar, por cultura quantitativa, a ocorrência de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas de interesse clínico microbiológico em cortes de carne de frango, bovino, suíno e peixe disponíveis no varejo na cidade de Juiz de Fora, MG;
- Isolar amostras representativas de bastonetes Gram-negativos da ordem *Enterobacterales* nos cortes de proteína animal avaliados;
- Determinar o perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas de interesse na medicina humana dos isolados pertencentes à ordem *Enterobacterales*;
- Avaliar tolerância aos metais tóxicos: níquel, zinco, mercúrio, cádmio, cromo e cobre, dos isolados pertencentes à ordem *Enterobacterales*;
- Avaliar e a expressão de bombas de efluxo, comparativamente entre microrganismos sensíveis e resistentes aos antimicrobianos avaliados e em relação à sua tolerância aos metais tóxicos;

- Correlacionar os aspectos da susceptibilidade aos antimicrobianos de interesse clínico-microbiológico e ambiental das bactérias Gram-negativas isoladas com seu índice de resistência múltipla às drogas determinado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Amostragem

O estudo foi realizado na cidade de Juiz de Fora, situada no estado de Minas Gerais - Brasil. Foram realizadas coletas de carne suína, bovina e de frango em diferentes estabelecimentos do comércio varejista de cada uma das 7 zonas da cidade, sendo elas Centro, Leste, Nordeste, Norte, Oeste, Sudeste e Sul, totalizando 21 coletas. Cada coleta consistiu de 100 gramas de pernil suíno, patinho e peito de frango crus, cortados em cubos e embalados em sacos plásticos fornecidos pelos próprios estabelecimentos. Também foram realizadas 21 coletas de filés de tilápia nos dois estabelecimentos especializados na comercialização de peixes frescos existentes na cidade. Todos os estabelecimentos visitados durante o projeto apresentavam o selo de aprovação do Serviço de Inspeção Municipal (SIM).

4.2. Isolamento e contagem dos microrganismos

Porções de 25g de cada amostra foram pesadas e homogeneizadas por 1 minuto a temperatura ambiente em água peptonada tamponada estéril. Posteriormente, diluições seriadas de 1 mL do homogenato em 9 mL de água peptonada tamponada foram realizadas até a diluição 10^{-4} , e 0,1 mL de cada diluição foi inoculado em placas de Petri contendo Ágar Sangue (AS) para a contagem total de microrganismos mesófilos. Os meios Eosina Azul de Metileno (EMB – Kasvi, Brasil) e Ágar Manitol Hipertônico (AMH – Kasvi, Brasil) também foram utilizados para a cultura e contagem seletiva de bacilos Gram-negativos e estafilococos, respectivamente. Todas as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas, e as contagens foram realizadas em placas apresentando entre 30 e 300 colônias. Após a contagem, 3 a 5 colônias de cada morfotipo presente nas placas foram selecionadas e cultivadas em Ágar Brain-Heart Infusion (BHI – Kasvi, Brasil). As características morfotintórias das colônias foram avaliadas pela coloração de Gram e elas foram armazenadas por congelamento a -20°C, para experimentos posteriores.

4.3. Seleção e identificação presuntiva de membros da ordem *Enterobacterales*

A identificação de membros da ordem *Enterobacterales* foi realizada pela avaliação da habilidade de fermentação de carboidratos (glicose, lactose e/ou sacarose), produção de CO₂ e de H₂S. Para tal, os bastonetes Gram-negativos foram inoculados em Ágar Triple Sugar Iron (TSI – Kasvi, Brasil) e incubados a 36°C por 24 horas. Posteriormente, os isolados identificados como *Enterobacterales* foram separados em grupos de identificação presuntiva, levando em consideração os resultados observados.

4.4. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos e índice de resistência múltipla

A determinação do perfil de susceptibilidade dos isolados foi realizada de acordo com a técnica de disco-difusão em ágar *Müller-Hinton* (BAUER *et al.*, 1966). Os agentes antimicrobianos utilizados foram: ampicilina (AMP, 10 µg), aztreonam (ATM, 30 µg), amoxicilina/ácido clavulânico (AMC, 30 µg), amicacina (AMI, 30 µg), gentamicina (GEN, 10 µg), ciprofloxacina (CIP, 5 µg), levofloxacina (LEV, 5 µg), cefazolina (CFZ, 30 µg), cefoxitina (CFO, 30 µg), ceftazidima (CAZ, 30 µg), ceftriaxona (CRO, 30 µg), cefepime (CPM, 30 µg), cloranfenicol (CLO, 30 µg), meropenem (MPM, 10 µg), sulfametoxazol/trimetoprim (SUT, 25 µg) e tetraciclina (TET, 30 µg). Após incubação por 24 horas a 37°C, os halos formados foram medidos e os valores comparados com a tabela padrão descrita pela 29ª edição do protocolo M100 do CLSI (Clinical and Laboratory Standard Institute) para a definição de sensibilidade ou resistência.

A definição de bactérias multirresistentes (MDR), extensivamente resistentes (XDR) e pan-resistentes (PDR) proposta por Magiorakos *et al.* (2011) foi utilizada para determinar quais isolados poderiam ser considerados multirresistentes à drogas e avaliar o nível de risco representado pela amostra analisada.

4.5. Teste de tolerância à metais tóxicos

A concentração inibitória mínima (CIM) para os metais tóxicos foi determinada a partir do método de diluição em ágar para drogas antimicrobianas de uso na medicina

humana e animal de acordo com as orientações do Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2021) em procedimentos já padronizados no nosso laboratório (DA SILVA, VÂNIA LÚCIA *et al.*, 2012; RESENDE *et al.*, 2012). Os metais foram selecionados de acordo com disponibilidade ambiental e relevância biológica: níquel ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), mercúrio (HgCl_2), cádmio ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), cromo ($\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$) e cobre (CuSO_4) (Vetec, Brasil). Soluções estéreis dos metais tóxicos mencionados foram adicionadas a ágar Mueller-Hinton (Kasvi - Brasil) para obter concentrações finais de 0,6 a 1.024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e a inoculação dos isolados foi realizada em placas de Petri com auxílio de um replicador de Steers. Após inoculação, as placas foram incubadas em abrigo da luz por 24 horas a 36°C . Todos os testes foram realizados em duplicata e placas contendo apenas o meio ágar Mueller-Hinton foram utilizadas como controle. A CIM foi determinado pela concentração mais baixa de sal de metal que inibiu totalmente o crescimento bacteriano.

4.6. Determinação da expressão fenotípica de bombas de efluxo

A expressão de bombas de efluxo foi avaliada com auxílio do método de brometo de etídio (EtBr) de cartwheel (MARTINS *et al.*, 2011) com modificações. Foram preparadas soluções com turvação correspondente a 0,5 na escala McFarland de cada um dos isolados, correspondente a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Em seguida, com auxílio de um replicador de Steers, a inoculação foi realizada em placas com ágar Mueller-Hinton (Kasvi - Brasil) com diferentes concentrações de EtBr (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As placas foram incubadas por 24h à 36°C , ao abrigo da luz. Após incubação, a leitura foi feita em um fotodocumentador sob luz ultravioleta e a presença de fluorescência emitida pelas amostras foi avaliada. Uma placa contendo apenas o meio ágar Mueller-Hinton foi utilizada como controle do crescimento.

4.7. Análise Estatística

Durante a análise dos dados, foram excluídos os *outliers* presentes em cada um dos grupos existentes com auxílio do teste de Dixon para evitar superestimação das

médias. A significância estatística foi calculada pelo teste de múltiplas comparações de Kruskal-Wallis ($p= 0,05$) e o teste Post-Hoc de Steel-Dwass foi utilizado para a comparação das médias individuais.

5 RESULTADOS

5.1. Isolamento e Contagem Bacteriana

No período de novembro de 2017 a julho de 2018 foram obtidos um total de 1631 isolados, sendo estes 993 cocos Gram-positivos, 36 bacilos Gram-positivos e 602 bacilos Gram-negativos. Dentre os bacilos Gram-negativos, 436 foram identificados como *Enterobacteriales*, sendo 93 isoladas a partir da carne de frango, 92 a partir da carne bovina, 113 a partir da carne suína e 138 a partir da carne de peixe.

Considerando todos os cortes de carne analisados, foi possível observar que as contagens bacterianas variaram de $1,5 \times 10^7$ UFC/g a $5,9 \times 10^3$ UFC/g para os microrganismos mesófilos totais, 2×10^6 UFC/g a 3×10^3 UFC/g para bacilos Gram-negativos e 10^7 UFC/g a 3×10^3 UFC/g para estafilococos. Para as amostras de carne de frango, as médias para as contagens em de microrganismos mesófilos totais, bacilos Gram-negativos e estafilococos foram $1,1 \times 10^6$ UFC/g, $7,2 \times 10^4$ UFC/g e $9,4 \times 10^4$ UFC/g respectivamente. Considerando as amostras de carne bovina, os valores foram 5×10^5 UFC/g para microrganismos mesófilos totais, $8,8 \times 10^4$ UFC/g para bacilos Gram-negativos e 10^5 UFC/g para estafilococos. As médias obtidas para as amostras de carne de suíno para microrganismos mesófilos totais, bacilos Gram-negativos e estafilococos foram $6,7 \times 10^5$ UFC/g, $8,9 \times 10^4$ UFC/g e $1,9 \times 10^5$ UFC/g respectivamente, e para as amostras de carne de peixe $1,4 \times 10^6$ UFC/g, $1,4 \times 10^5$ UFC/g e $5,9 \times 10^3$ UFC/g respectivamente (Figura 4).

De acordo com o teste de Steel-Dwass, não houve diferença significativa entre as médias obtidas das contagens totais, de cocos Gram-positivos e bastonetes Gram-positivos para as carnes de frango, bovino e suíno ($P > 0,05$). No entanto, o mesmo não foi observado nas amostras de peixe, onde a média das contagens de estafilococos foi significativamente menor do que as demais ($P < 0,05$) (Figura 4).

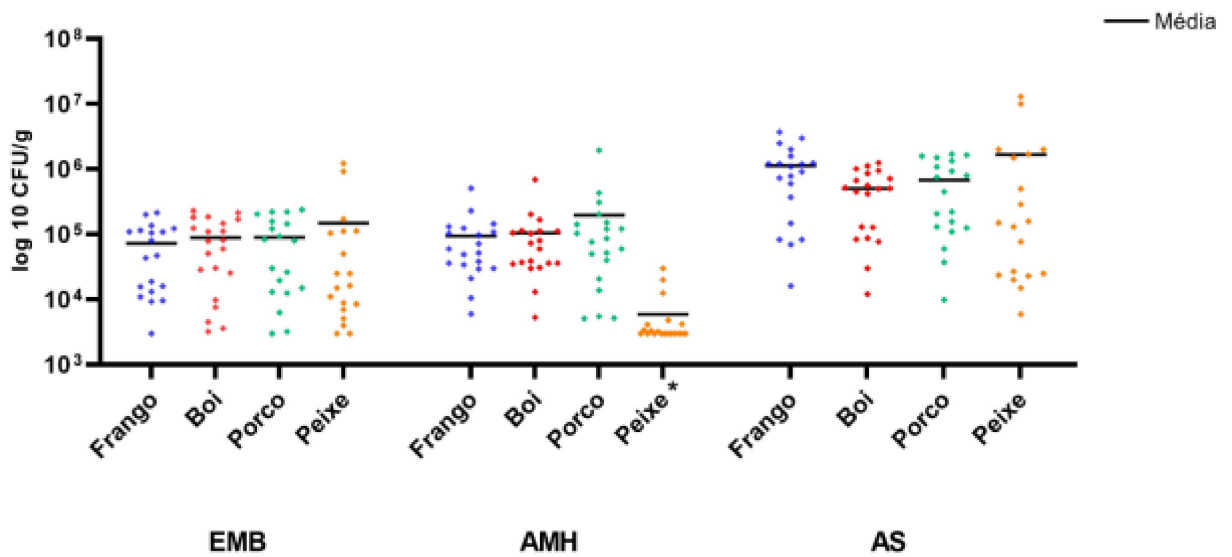


Figura 6. Contagens de bastonetes Gram-negativas (EMB), cocos Gram-positivos (AMH) e totais (AS) obtidas a partir das 21 coletas de carne de frango, bovino, suíno e de peixe. (LDI – Limite de Detecção Inferior).

5.2. Identificação presuntiva dos membros da ordem *Enterobacterales*

Considerando os resultados obtidos a partir da inoculação dos isolados no meio Ágar TSI, foram formados 5 grupos de identificação presuntiva das enterobactérias isoladas (Tabela 1). O grupo G1, que sugere *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Escherichia* ou *Enterobacter*, compreende a maioria dos integrantes (231 isolados). O segundo grupo com mais integrantes é o G3 (n=147), sugere *Proteus*, *Serratia* e *Yersinia*. No grupo G2 encontram-se 14 isolados, sendo esses possivelmente dos gêneros *Proteus* ou *Salmonella*. O Grupo G4 possui apenas 2 isolados, sendo estes possivelmente do gênero *Salmonella*. Por fim, no grupo G5 estão presentes 42 isolados, sendo eles possivelmente *Escherichia*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Pantoea* ou *Providencia* (Tabela 1).

Tabela 1: Identificação presuntiva dos membros da ordem *Enterobacterales* isolados.

| Grupo | Leitura | Identificação presuntiva | Nº de isolados |
|-------|--|---|----------------|
| G1 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Fermentação da glicose ▪ Fermentação de lactose e/ou sacarose ▪ Produção de CO₂ | <i>Buttiauxella, Citrobacter, Cronobacter, Enterobacter, Escherichia, Klebsiella, Kluyvera, Kosakonia, Leclercia, Lelliottia, Pluralibacter, Proteus, Raoultella, Salmonella enterica</i> | 231 |
| G2 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Fermentação da glicose ▪ Fermentação de lactose e/ou sacarose ▪ Presença de H₂S | <i>Budvicia, Proteus, Salmonella</i> | 14 |
| G3 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Fermentação da glicose ▪ Fermentação de lactose e/ou sacarose ▪ Ausência de H₂S | <i>Cedecea, Edwardsiella, Kluyvera, Plesiomonas, Proteus, Serratia, Yersinia</i> | 147 |
| G4 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Fermentação da glicose ▪ Presença de H₂S | <i>Leminorella, Pragia, Salmonella serovar Gallinarum</i> | 2 |
| G5 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Fermentação da glicose ▪ Ausência de H₂S | <i>Buttiauxella, Citrobacter, Edwardsiella, Ewingella, Hafnia, Klebsiella, Pantoea, Photorhabdus, Proteus, Providência, Shigella, Shimwellia, Yersinia</i> | 42 |

Fonte: Procop et al., 2017.

5.3. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

Os resultados indicaram que a resistência foi mais frequentemente encontrada em resposta às drogas cefazolina (39,0%), ampicilina (24,4%), amoxicilina/ácido clavulânico (15,1%) e cefoxitina (14,4%) (Figura 5). Um total de 4,6% dos isolados apresentou resistência à tetraciclina, 3% ao sulfazotrim, 2,5% ao cloranfenicol, 1,4% ao aztreonam, 1,1% ao ciprofloxacino, 1,1% ao levofloxacino, 0,9% à ceftazidima, 0,4% ao cefepime e 0,4% à ceftriaxona. As maiores atividades antimicrobianas foram observadas entre os aminoglicosídeos e o carbapenêmico, onde todos os isolados foram sensíveis ao meropenem e à gentamicina, e apenas 0,2% apresentou resistência à amicacina (Figura 5). A resistência intermediária foi identificada com menor frequência nos testes, sendo mais abundante com as drogas ampicilina (6%), amoxicilina/ácido clavulânico (3%)

e cefoxitina (3,2%), mas também ocorrendo com o ciprofloxacino (0,4%), ceftazidima (0,2%), cloranfenicol (0,4%) e tetraciclina (1,6%) (Figura 5).

De modo geral, 62,9% dos isolados apresentou resistência a alguma das drogas, sendo que destes, 32,3% era resistente a apenas uma e 8,1% a duas. Foi possível observar que os microrganismos resistentes a três ou mais dos antimicrobianos testados no presente trabalho podem ser considerados MDR (multirresistentes) de acordo com a classificação proposta por Magiorakos et al. (2011). Portanto, 22,7% dos isolados foi considerado MDR, sendo 7,9% resistente à três drogas, 11,4% a quatro, 2,3% a cinco e 0,9% a seis (Tabela 2). Não foram identificadas bactérias XDR (extensivamente resistentes) ou PDR (pan-resistentes). Um isolado exibiu o fenótipo de resistência ARM-CAZ e foi considerado MDR por definição clássica. Ainda, o fenótipo de resistência AMP-AMC-CFZ-CFO destaca-se dentre os demais multirresistentes, ocorrendo em 9,7% dos isolados obtidos no estudo (Tabela 3).

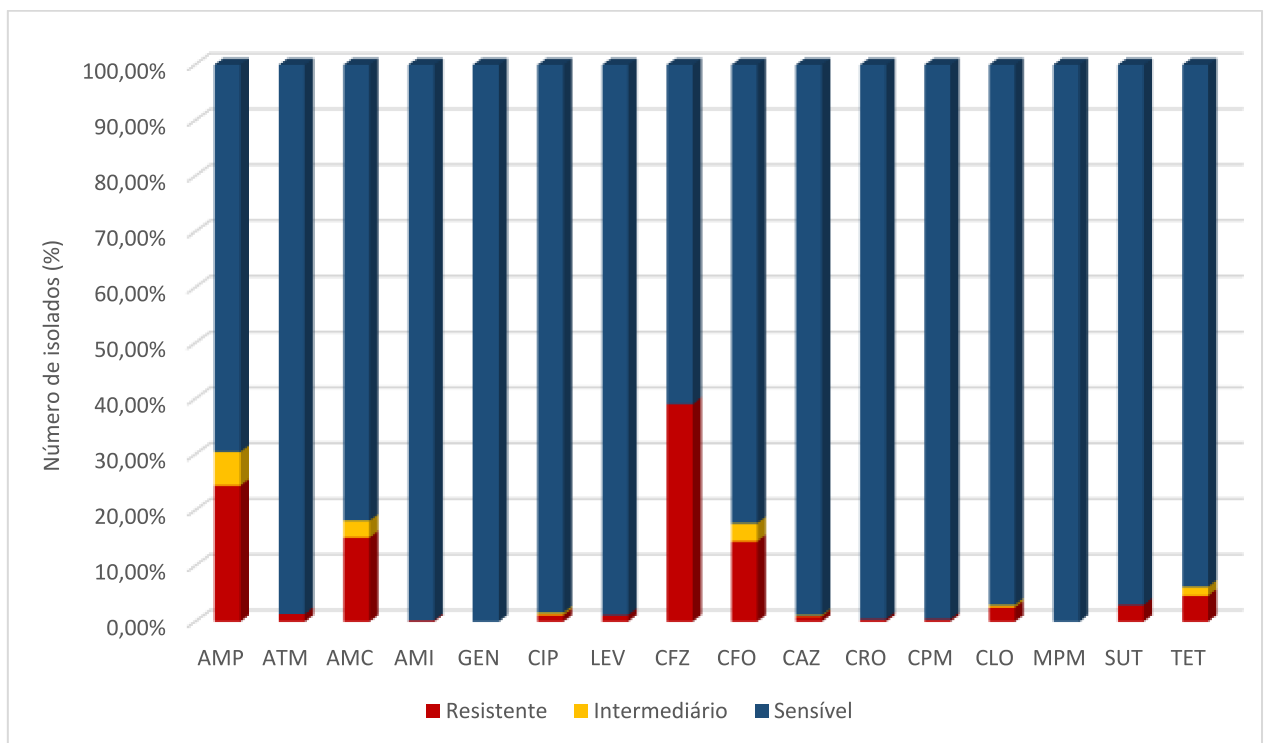


Figura 7. Perfil geral de susceptibilidade a antimicrobianos das enterobactérias isoladas. AMP: ampicilina; ATM: aztreonam; AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; AMI: amicacina; GEN: gentamicina; CIP: ciprofloxacino; LEV: levofloxacino; CFZ: cefazolina; CFO: cefoxitina; CAZ: ceftazidima; CRO: ceftriaxona; CPM: cefepime; CLO: cloranfenicol; MPM: meropenem; SUT: sulfazotrim; TET: tetraciclina.

Tabela 2. Porcentagem de resistência simultânea a antimicrobianos de diferentes classes encontradas nas *Enterobacteriales* isoladas de cada tipo de carne.

| Nº de fenótipos de resistência | % de isolados resistentes | % de isolados resistentes | % de isolados resistentes | % de isolados resistentes | % de isolados resistentes |
|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | (F) | (B) | (S) | (P) | (T) |
| 1 | 26,4 | 41,8 | 33,0 | 30,1 | 32,3 |
| 2 | 11,0 | 9,9 | 9,8 | 6,6 | 8,1 |
| 3 | 8,8 | 5,5 | 10,7 | 4,4 | 7,9 |
| 4 | 20,9 | 13,2 | 9,8 | 5,1 | 11,4 |
| 5 | 3,3 | 1,1 | 2,7 | 2,2 | 2,3 |
| 6 | 1,1 | 1,1 | 1,8 | - | 0,9 |
| % de MDR | 34,3 | 20,9 | 25,0 | 11,7 | 22,7 |
| % de resistência total | 71,5 | 72,6 | 67,8 | 48,4 | 62,9 |

F: frango; B: bovino; S: suíno; P: peixe; T: total.

Tabela 3. Distribuição dos fenótipos de resistência aos antimicrobianos selecionados para o estudo.

| Fenótipo de Resistência | Número de isolados | |
|-------------------------|--------------------|-------|
| | N | % |
| CFZ | 86 | 20,0% |
| AMP | 34 | 7,9% |
| CFO | 9 | 2,0% |
| TET | 5 | 1,1% |
| SUT | 3 | 0,7% |
| ATM | 2 | 0,4% |
| AMP CFZ | 11 | 2,5% |
| CFZ CFO | 8 | 1,8% |
| AMP TET | 4 | 0,9% |
| AMC AMP | 3 | 0,7% |
| AMP SUT | 2 | 0,4% |
| SUT TET | 2 | 0,4% |
| CFO SUT | 1 | 0,2% |
| AMI CLO | 1 | 0,2% |
| AMP CFO | 1 | 0,2% |
| CFO TET | 1 | 0,2% |
| ATM CAZ | 1 | 0,2% |

| | | | | | | Continuação | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------------|------|
| AMC | CFZ | AMP | | | | 13 | 3,0% |
| AMC | CFO | AMP | | | | 5 | 1,1% |
| AMP | AMC | CFZ | | | | 7 | 1,6% |
| AMP | CLO | SUT | | | | 2 | 0,4% |
| AMP | AMC | CFO | | | | 1 | 0,2% |
| AMP | CFZ | CFO | | | | 1 | 0,2% |
| CFZ | SUT | TET | | | | 1 | 0,2% |
| AMP | CFZ | TET | | | | 1 | 0,2% |
| AMP | CIP | CLO | | | | 1 | 0,2% |
| AMP | SUT | TET | | | | 1 | 0,2% |
| CLO | SUT | TET | | | | 1 | 0,2% |
| AMP | AMC | CFZ | CFO | | | 42 | 9,7% |
| AMP | CFZ | CFO | CLO | | | 3 | 0,7% |
| AMP | AMC | CFZ | TET | | | 1 | 0,2% |
| AMP | CIP | LEV | TET | | | 1 | 0,2% |
| AMP | AMC | CFZ | CAZ | | | 1 | 0,2% |
| AMC | CFZ | CFO | TET | | | 1 | 0,2% |
| AMP | AMC | CFZ | CFO | TET | | 4 | 0,9% |
| AMP | AMC | CFZ | CLO | SUT | | 2 | 0,4% |
| ATM | CPM | CFO | CAZ | CRO | | 2 | 0,4% |
| AMP | AMC | ATM | CFZ | CAZ | | 1 | 0,2% |
| AMP | AMC | CFZ | CFO | CLO | | 1 | 0,2% |
| AMP | AMC | CIP | CLO | LEV | TET | 4 | 0,9% |

Legenda: AMP: ampicilina; ATM: aztreonam; AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; AMI: amicacina; GEN: gentamicina; CIP: ciprofloxacino; LEV: levofloxacino; CFZ: cefazolina; CAZ: ceftazidima; CRO: ceftriaxona; CPM: cefepime; CLO: cloranfenicol; MPM: meropenem; SUT: sulfazotrim; TET: tetraciclina.

Considerando apenas os isolados obtidos a partir da carne de frango, foi verificado que os maiores índices de resistência também ocorreram para a cefazolina (46,1%), ampicilina (45%), amoxicilina/ácido clavulânico (26,3%) e cefoxitina (23%) (Figura 6). Observou-se que 5,4% dos isolados era resistente à tetraciclina, 4,4% ao cloranfenicol, 3,3% ao aztreonam, 3,3% à ceftazidima e 2,2% ao sulfazotrim, ciprofloxacino e levofloxacino. Não foi observada resistência aos aminoglicosídeos, meropenem, ceftriaxona e cefepime (Figura 6).

Também na carne de frango, 71,5% dos isolados apresentaram resistência a ao menos um dos antimicrobianos testados, sendo 26,4% resistentes a uma droga e 11% a duas. 34,3% podem ser considerados MDR, sendo 8,8% resistente à três drogas,

20,9% a quatro, 3,3% à cinco e 1,1% à seis (Tabela 2). Novamente, o fenótipo AMP-AMC-CFZ-CFO se destaca entre os multirresistentes por estar presente em 15,4% dos isolados (Tabela 4).

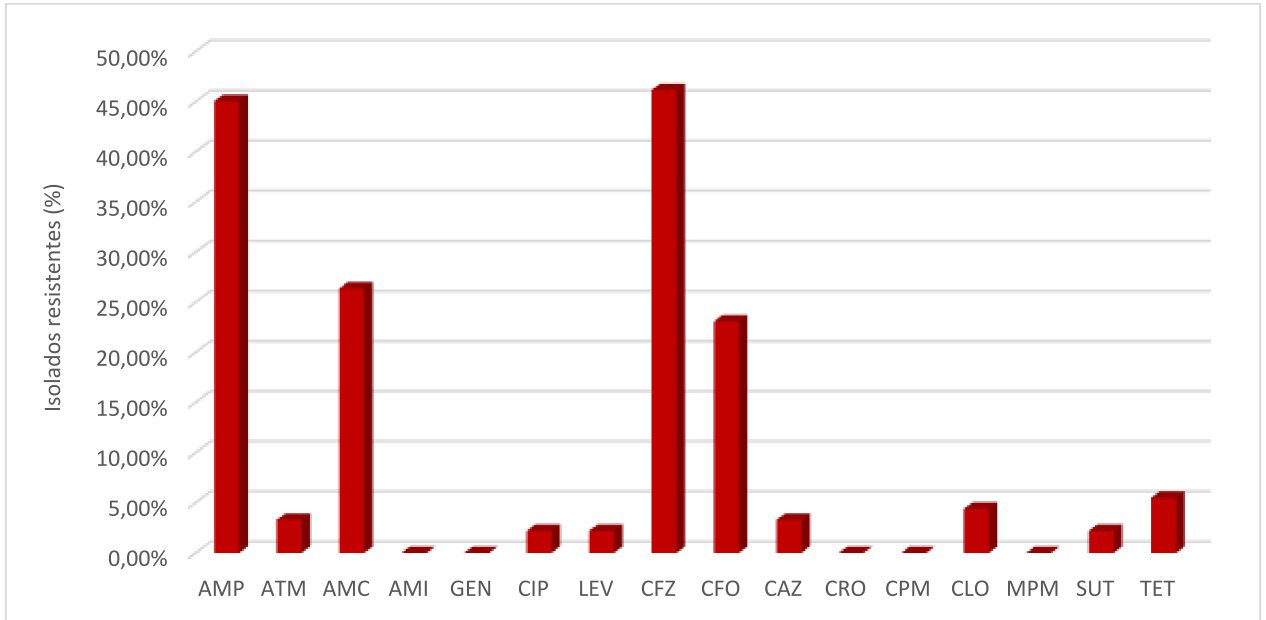


Figura 8. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das enterobactérias isoladas da carne de frango. AMP: ampicilina; ATM: aztreonam; AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; AMI: amicacina; GEN: gentamicina; CIP: ciprofloxacino; LEV: levofloxacino; CFZ: cefazolina; CFO: cefoxitina; CAZ: ceftazidima; CRO: ceftriaxona; CPM: cefepime; CLO: cloranfenicol; MPM: meropenem; SUT: sulfazotrim; TET: tetraciclina.

Tabela 4. Distribuição dos fenótipos de resistência dos membros da ordem *Enterobacterales* isolados da carne de frango.

| Fenótipo de Resistência | | | | | | Número de isolados | |
|-------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|--------------------|-------|
| | | | | | | N | % |
| CFZ | | | | | | 12 | 13,2% |
| AMP | | | | | | 11 | 12,1% |
| ATM | | | | | | 1 | 1,1% |
| AMP | CFZ | | | | | 4 | 4,4% |
| CFZ | CFO | | | | | 3 | 3,3% |
| AMC | AMP | | | | | 1 | 1,1% |
| CFO | SUT | | | | | 1 | 1,1% |
| AMP | SUT | | | | | 1 | 1,1% |
| AMC | CFZ | AMP | | | | 2 | 2,2% |
| AMP | AMC | CFZ | | | | 2 | 2,2% |
| ATM | CAZ | CRO | | | | 1 | 1,1% |
| AMP | AMC | CFO | | | | 1 | 1,1% |
| AMP | CFZ | CFO | | | | 1 | 1,1% |
| AMP | CLO | SUT | | | | 1 | 1,1% |
| AMP | AMC | CFZ | CFO | | | 14 | 15,4% |
| AMP | CFZ | CFO | CLO | | | 2 | 2,2% |
| AMP | AMC | CFZ | TET | | | 1 | 1,1% |
| AMP | CIP | LEV | TET | | | 1 | 1,1% |
| AMP | AMC | CFZ | CAZ | | | 1 | 1,1% |
| AMP | AMC | ATM | CFZ | CAZ | | 1 | 1,1% |
| AMP | AMC | CFZ | CFO | CLO | | 1 | 1,1% |
| AMP | AMC | CFZ | CFO | TET | | 1 | 1,1% |
| AMP | AMC | CIP | CLO | LEV | TET | 1 | 1,1% |

Legenda: AMP: ampicilina; ATM: aztreonam; AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; AMI: amicacina; GEN: gentamicina; CIP: ciprofloxacino; LEV: levofloxacino; CFZ: cefazolina; CAZ: ceftazidima; CRO: ceftriaxona; CPM: cefepime; CLO: cloranfenicol; MPM: meropenem; SUT: sulfazotrim; TET: tetraciclina.

Dentre os isolados obtidos a partir da carne bovina, novamente as resistências aos antimicrobianos mais frequentemente detectados foram contra as drogas cefazolina (46,1%), ampicilina (31,8%), cefoxitina (23%) e amoxicilina/ácido clavulânico (21,9%). 6,5% dos isolados apresentou resistência à tetraciclina, 2,2% ao cloranfenicol, 2,2% ao sulfazotrim e 1,1% às drogas amicacina, ciprofloxacino e levofloxacino. Foi verificado que todas as linhagens isoladas eram sensíveis à ceftazidima, ceftriaxona, cefepime, gentamicina, aztreonam e meropenem. (Figura 7).

Um total de 73% dos isolados desse tipo de carne eram resistentes a ao menos uma droga antimicrobiana. Destes, 20,9% foram classificados como MDR, sendo 5,5% resistente a três antimicrobianos, 13,2% a quatro, 1,1% a cinco e 1,1% a seis. Isolados com resistência a uma ou duas drogas foram os mais prevalentes, compreendendo 41,8% e 9,9% do total de isolados resistentes, respectivamente (Tabela 2). Assim como na carne de frango, o fenótipo AMP-AMC-CFZ-CFO também se destacou dentre os multirresistentes, podendo ser encontrado em 13,2% dos isolados (Tabela 5).

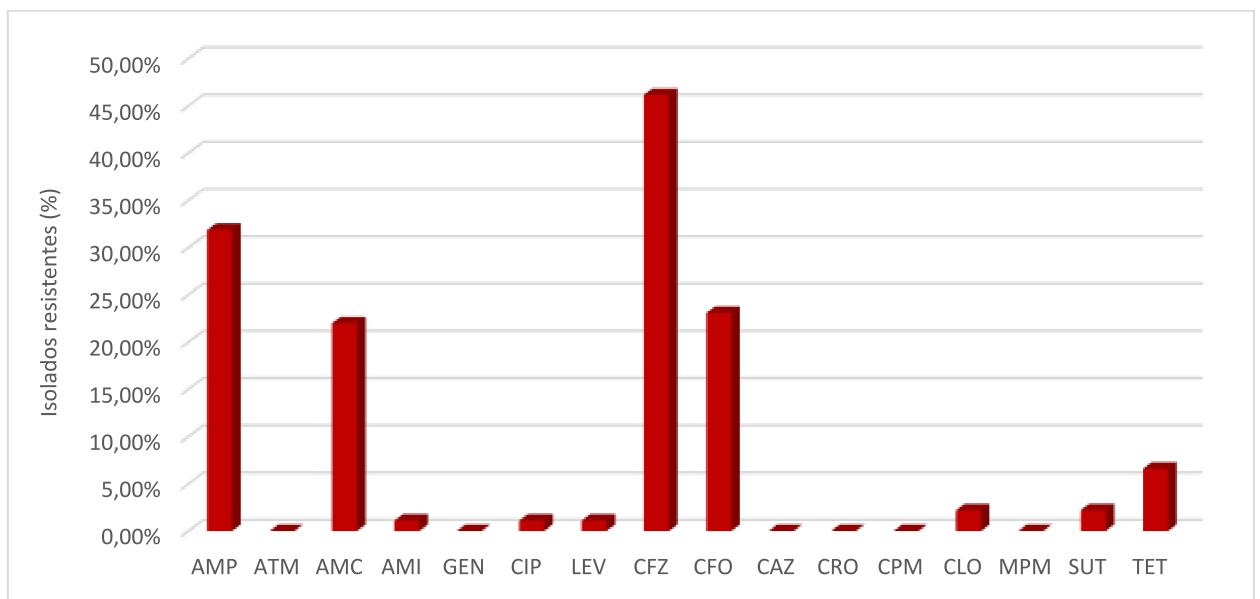


Figura 9. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das enterobactérias isoladas da carne bovina. AMP: ampicilina; ATM: aztreonam; AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; AMI: amicacina; GEN: gentamicina; CIP: ciprofloxacino; LEV: levofloxacino; CFZ: cefazolina; CFO: cefoxitina; CAZ: ceftazidima; CRO: ceftriaxona; CPM: cefepime; CLO: cloranfenicol; MPM: meropenem; SUT: sulfazotrim; TET: tetraciclina.

Tabela 5. Distribuição dos fenótipos de resistência dos membros da ordem *Enterobacterales* isolados da carne bovina.

| Fenótipo de Resistência | | | | | | Número de isolados | |
|-------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|--------------------|-------|
| | | | | | | N | % |
| CFZ | | | | | | 25 | 27,5% |
| AMP | | | | | | 8 | 8,8% |
| CFO | | | | | | 4 | 4,4% |
| TET | | | | | | 1 | 1,1% |
| CFZ | CFO | | | | | 2 | 2,2% |
| AMC | AMP | | | | | 1 | 1,1% |
| AMC | CFO | | | | | 1 | 1,1% |
| SUT | TET | | | | | 1 | 1,1% |
| AMP | TET | | | | | 1 | 1,1% |
| AMI | CLO | | | | | 1 | 1,1% |
| AMP | CFZ | | | | | 1 | 1,1% |
| AMP | CFO | | | | | 1 | 1,1% |
| AMC | CFZ | AMP | | | | 2 | 2,2% |
| AMP | AMC | CFZ | | | | 2 | 2,2% |
| CFZ | SUT | TET | | | | 1 | 1,1% |
| AMP | AMC | CFZ | CFO | | | 12 | 13,2% |
| AMP | AMC | CFZ | CFO | TET | | 1 | 1,1% |
| AMP | AMC | CIP | CLO | LEV | TET | 1 | 1,1% |

Legenda: AMP: ampicilina; ATM: aztreonam; AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; AMI: amicacina; GEN: gentamicina; CIP: ciprofloxacino; LEV: levofloxacino; CFZ: cefazolina; CAZ: ceftazidima; CRO: ceftriaxona; CPM: cefepime; CLO: cloranfenicol; MPM: meropenem; SUT: sulfazotrim; TET: tetraciclina.

Os índices de resistência à cefazolina (33%), ampicilina (29,4%), amoxicilina/ácido clavulânico (17,8%) e cefoxitina (16,9%) também foram os mais altos entre os isolados provenientes da carne suína. Constatou-se que 8,93% são resistentes à tetraciclina, 5,3% ao sulfazotrim e ao cloranfenicol, 3,5% ao ciprofloxacino e 1,7% ao levofloxacino. Neste grupo não foi detectada resistência aos aminoglicosídeos, ceftazidima, ceftriaxona, cefepime, aztreonam ou meropenem (Figura 8).

A maioria dos isolados da carne suína apresentou resistência a ao menos um antimicrobiano (68%) e destes, 25% foram classificados como multirresistentes. Um total de 33% foi resistente a apenas uma droga e 9,8% a duas. Dentre os isolados MDR, 10,7% eram resistentes à três antimicrobianos e 10,7% a três, 9,8% a quatro, 2,7% a cinco e

1,8% a seis (Tabela 2). O fenótipo AMP-AMC-CFZ-CFO também predominou entre os multirresistentes (8,9%) (Tabela 6).

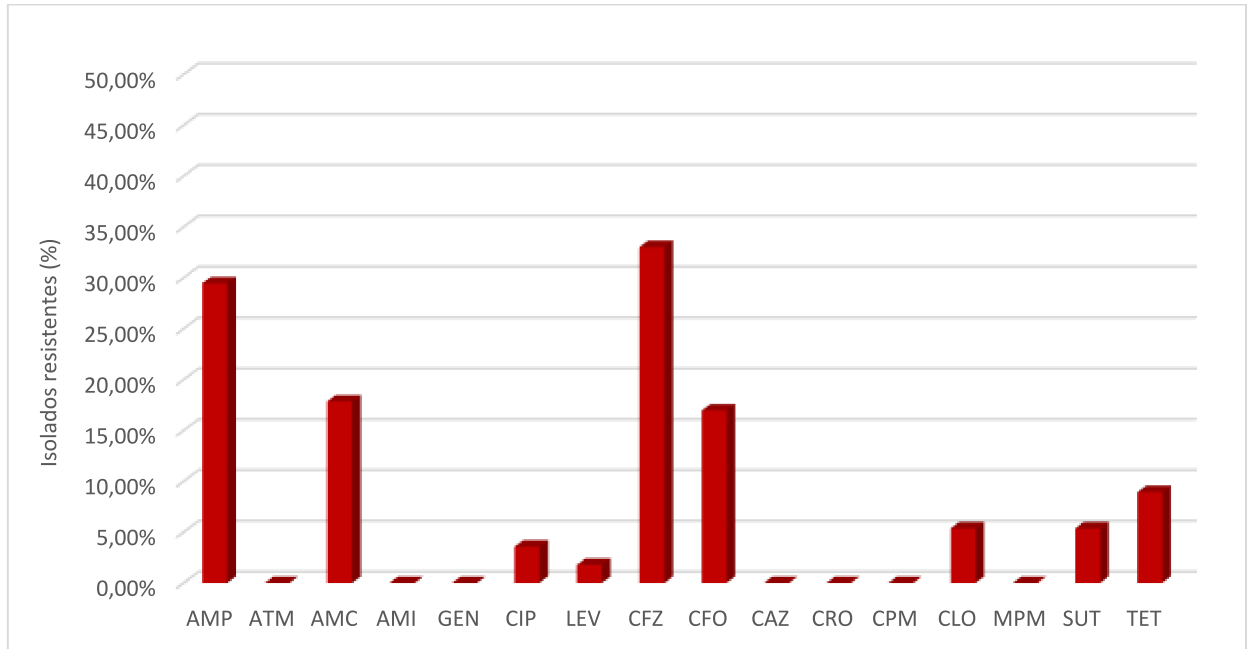


Figura 10. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das enterobactérias isoladas da carne suína. AMP: ampicilina; ATM: aztreonam; AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; AMI: amicacina; GEN: gentamicina; CIP: ciprofloxacino; LEV: levofloxacino; CFZ: cefazolina; CFO: cefoxitina; CAZ: ceftazidima; CRO: ceftriaxona; CPM: cefepime; CLO: cloranfenicol; MPM: meropenem; SUT: sulfazotrim; TET: tetraciclina.

Tabela 6. Distribuição dos fenótipos de resistência dos membros da ordem *Enterobacterales* isolados da carne suína.

| Fenótipo de Resistência | Número de isolados | |
|-------------------------|--------------------|-------|
| | N | % |
| CFZ | 19 | 17,0% |
| AMP | 9 | 8,0% |
| CFO | 4 | 3,6% |
| TET | 3 | 2,7% |
| SUT | 2 | 1,8% |
| CFZ CFO | 2 | 1,8% |
| AMC CFO | 2 | 1,8% |
| AMP TET | 2 | 1,8% |
| AMC AMP | 1 | 0,9% |
| AMP SUT | 1 | 0,9% |
| AMP CFZ | 1 | 0,9% |
| CFO TET | 1 | 0,9% |
| SUT TET | 1 | 0,9% |
| AMC CFZ AMP | 7 | 6,3% |
| AMP AMC CFZ | 2 | 1,8% |
| AMP CFZ TET | 1 | 0,9% |
| AMP CIP CLO | 1 | 0,9% |
| AMP CLO SUT | 1 | 0,9% |
| AMP AMC CFZ CFO | 10 | 8,9% |
| AMP CFZ CFO CLO | 1 | 0,9% |
| AMP AMC CFZ CLO SUT | 2 | 1,8% |
| AMP AMC CFZ CFO TET | 1 | 0,9% |
| AMP AMC CIP CLO LEV TET | 2 | 1,8% |

Legenda: AMP: ampicilina; ATM: aztreonam; AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; AMI: amicacina; GEN: gentamicina; CIP: ciprofloxacino; LEV: levofloxacino; CFZ: cefazolina; CAZ: ceftazidima; CRO: ceftriaxona; CPM: cefepime; CLO: cloranfenicol; MPM: meropenem; SUT: sulfazotrim; TET: tetraciclina.

As bactérias provenientes da carne de peixe apresentaram um índice de resistência à cefazolina de 34,5%, à ampicilina de 20,5%, à cefoxitina de 11% e à amoxicilina/ácido clavulânico de 10,2%. 4,4% dos isolados expressou resistência à tetraciclina, 2,2% ao aztreonam e sulfazotrim e 1,4% à ceftazidima, ceftriaxona e cefepime. Não foi detectada resistência aos aminoglicosídeos, ciprofloxacino, levofloxacino e meropenem (Figura 9).

A porcentagem de isolados resistentes a ao menos uma das drogas testadas obtidos a partir da carne de peixe (48,4%) foi menor em comparação às demais carnes. Um total de 11,7% foi classificado como multirresistente, sendo 4,4% resistente a três antimicrobianos, 5,1% a quatro e 2,2% a cinco. A resistência a apenas um antimicrobiano foi observada em 30,1% dos isolados, a dois em 6,6% e a três em 4,4% (Tabela 2). Como em todas as outras carnes, o fenótipo AMP-AMC-CFZ-CFO foi o mais frequente entre os multirresistentes (4,4%) (Tabela 7).

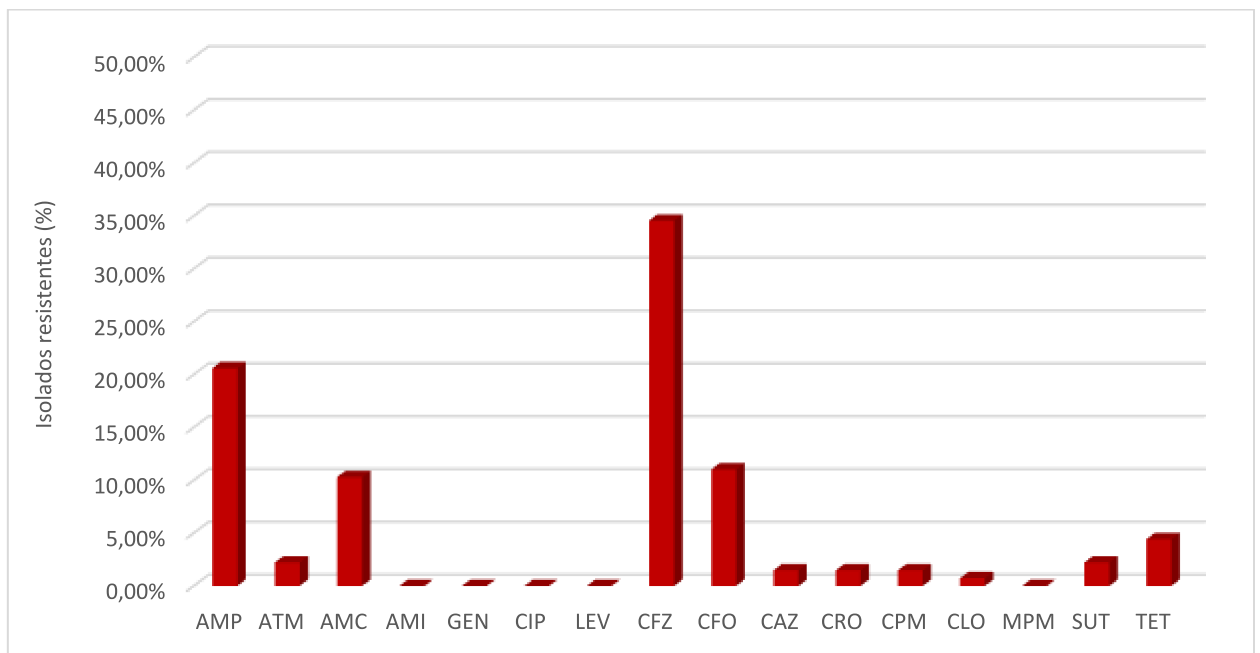


Figura 11. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos das enterobactérias isoladas da carne de peixe. AMP: ampicilina; ATM: aztreonam; AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; AMI: amicacina; GEN: gentamicina; CIP: ciprofloxacino; LEV: levofloxacino; CFZ: cefazolina; CFO: cefoxitina; CAZ: ceftazidima; CRO: ceftriaxona; CPM: cefepime; CLO: cloranfenicol; MPM: meropenem; SUT: sulfazotrim; TET: tetraciclina.

Tabela 7. Distribuição dos fenótipos de resistência dos membros da ordem *Enterobacterales* isolados da carne de peixe.

| Fenótipo de Resistência | Número de isolados | |
|-------------------------|--------------------|-------|
| | N | % |
| CFZ | 30 | 22,1% |
| AMP | 7 | 5,1% |
| CFO | 1 | 0,7% |
| ATM | 1 | 0,7% |
| SUT | 1 | 0,7% |
| TET | 1 | 0,7% |
| AMP CFZ | 5 | 3,7% |
| AMC CFO | 2 | 1,5% |
| AMP TET | 1 | 0,7% |
| CFZ CFO | 1 | 0,7% |
| AMC CFZ AMP | 3 | 2,2% |
| AMP AMC CFZ | 1 | 0,7% |
| AMP SUT TET | 1 | 0,7% |
| CLO SUT TET | 1 | 0,7% |
| AMP AMC CFZ CFO | 6 | 4,4% |
| AMC CFZ CFO TET | 1 | 0,7% |
| ATM CPM CFO CAZ CRO | 2 | 1,5% |
| AMP AMC CFZ CFO TET | 1 | 0,7% |

Legenda: AMP: ampicilina; ATM: aztreonam; AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; AMI: amicacina; GEN: gentamicina; CIP: ciprofloxacino; LEV: levofloxacino; CFZ: cefazolina; CAZ: ceftazidima; CRO: ceftriaxona; CPM: cefepime; CLO: cloranfenicol; MPM: meropenem; SUT: sulfazotrim; TET: tetraciclina.

A partir dos perfis de susceptibilidade a antimicrobianos apresentados pelos isolados obtidos no trabalho, foi elaborada uma matriz para a presença ou ausência de resistência aos antimicrobianos e posterior análise por Clustering Hierárquico Aglomerativo com agrupamento UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages - Método de Grupo de Pares Não Ponderados usando Médias Aritiméticas) por similaridade. As 436 enterobactérias obtidas no estudo foram divididas em 3 grupos distintos baseado em seus perfis de susceptibilidade às drogas antimicrobianas testadas: A1, A2 e A3 (Figura 10).

É possível observar que A1 é composto por 36% das *Enterobacterales* provenientes da carne de frango, 53% das provenientes da carne bovina, 37% das provenientes da carne suína e 34% das provenientes da carne de peixe; A2 é composto

por 25% das *Enterobacterales* provenientes da carne de frango, 16% das provenientes da carne bovina, 24% das provenientes da carne suína e 15% das provenientes da carne de peixe; A3 é composto por 39% das *Enterobacterales* provenientes da carne de frango, 31% das provenientes da carne bovina, 39% das provenientes da carne suína e 51% das provenientes da carne de peixe (Figura 10).

O grupo A1 é composto por 171 isolados, sendo desses 33 (20%) da carne de frango, 49 (28%) de bovino, 42 (24%) de suíno e 47 (28%) de peixe. O grupo A2, o menos representativo, possui 84 integrantes, sendo 23 (27%) da carne de frango, 14 (17%) da carne de bovino, 27 (32%) da carne suína e 20 (24%) da carne de peixe. O grupo A3 é o mais representativo, compreendendo 181 dos isolados, dos quais 37 (20%) são da carne de frango, 29 (16%) de bovino, 44 (25%) de suíno e 71 (39%) de peixe (Figura 10). Devido à alta similaridade entre os grupos formados, não foi possível a separação das carnes utilizando como parâmetro os perfis de susceptibilidade a antimicrobianos encontrados nos isolados estudados.

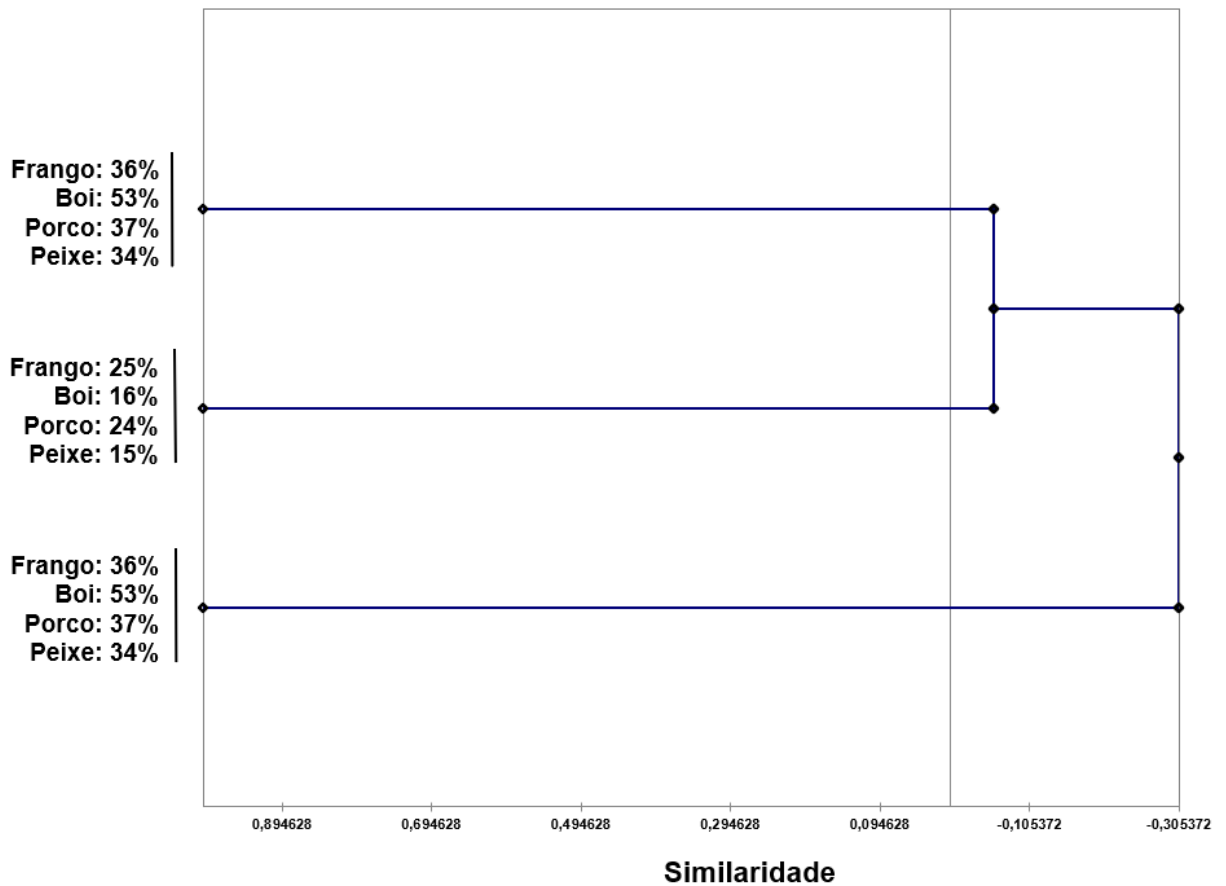


Figura 12. Clustering Hierárquico Aglomerativo com agrupamento UPGMA a partir de matriz de similaridade dos perfis de susceptibilidade a antimicrobianos apresentados pelos isolados.

Considerando a alta frequência de resistência à cefazolina, cefoxitina, ampicilina e amoxicilina/ácido clavulânico dentre as linhagens estudadas, e a importância dos beta-lactâmicos no contexto atual da clínica média, uma ferramenta gráfica foi empregada de forma a avaliar a dispersão dos halos de inibição gerados ao redor dessas drogas durante o teste de susceptibilidade a antimicrobianos (Figuras 11 e 12). O mesmo foi feito para os halos de inibição da ceftazidima e ceftriaxona (Figura 13).

É possível observar que os isolados provenientes da carne de peixe possuem uma média dos halos de inibição para amoxicilina/ácido clavulânico significativamente maior quando comparado aos isolados das carnes de frango, bovino e suíno ($P < 0,05$) (Figura 11). Os isolados da carne de peixe também apresentaram média significativamente maior dos halos de inibição da ampicilina e cefazolina em relação aos isolados das carnes de frango e bovino ($P < 0,05$) (Figuras 11 e 12). Quanto à ceftriaxona,

os halos de inibição formados pelos isolados da carne de frango são significativamente menores do que os halos dos isolados de peixe ($P < 0,05$) (Figura 13). Finalmente, a análise estatística demonstrou que o tamanho dos halos de inibição para a ceftazidima dos isolados de frango é significativamente em relação aos halos dos isolados de outras carnes ($P < 0,05$) (Figura 13). Não houve diferença significativa entre as médias dos halos formados pelos isolados quando expostos à cefoxitina ($P > 0,05$) (Figura 12).

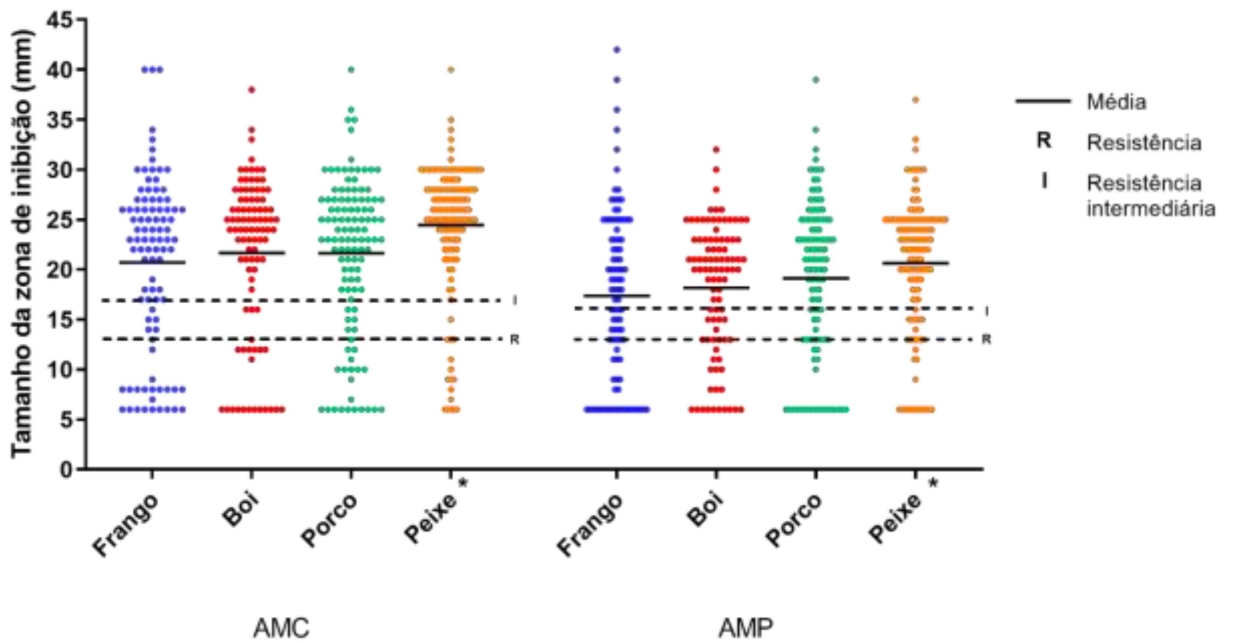


Figura 13: Distribuição dos halos de inibição da amoxicilina/ácido clavulânico e ampicilina para os isolados provenientes das carnes de frango, bovino, suíno e de peixe.

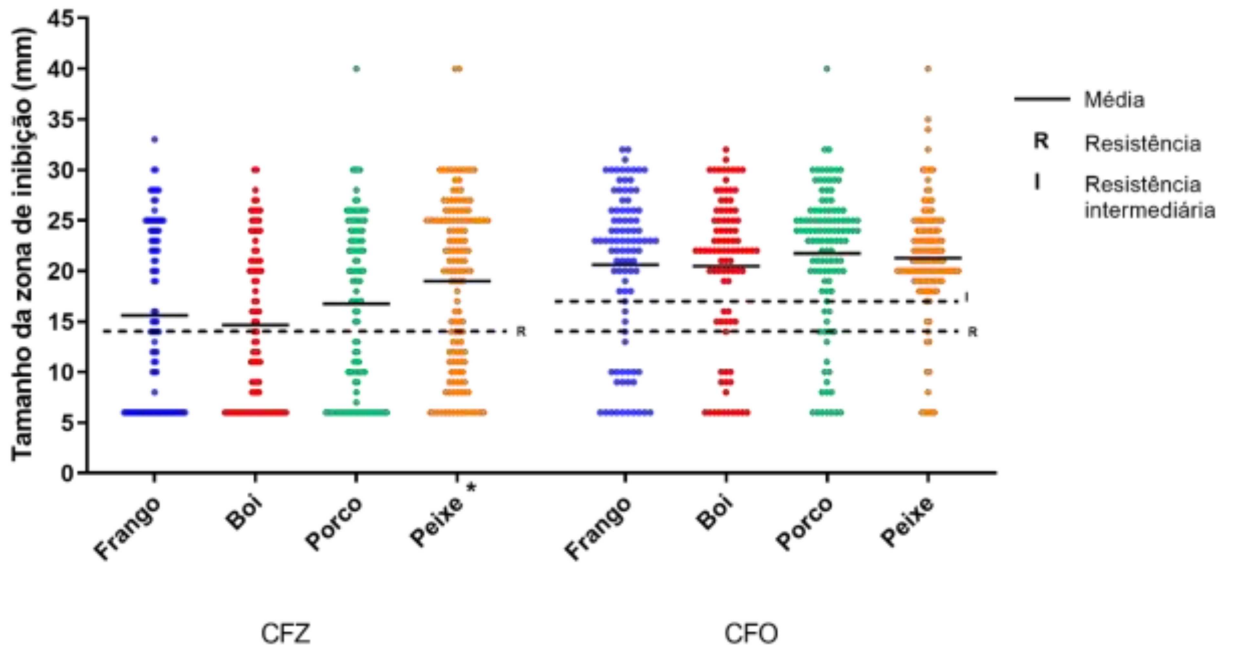


Figura 14: Distribuição dos halos de inibição da cefazolina e cefoxitina para os isolados provenientes das carnes de frango, bovino, suíno e de peixe.

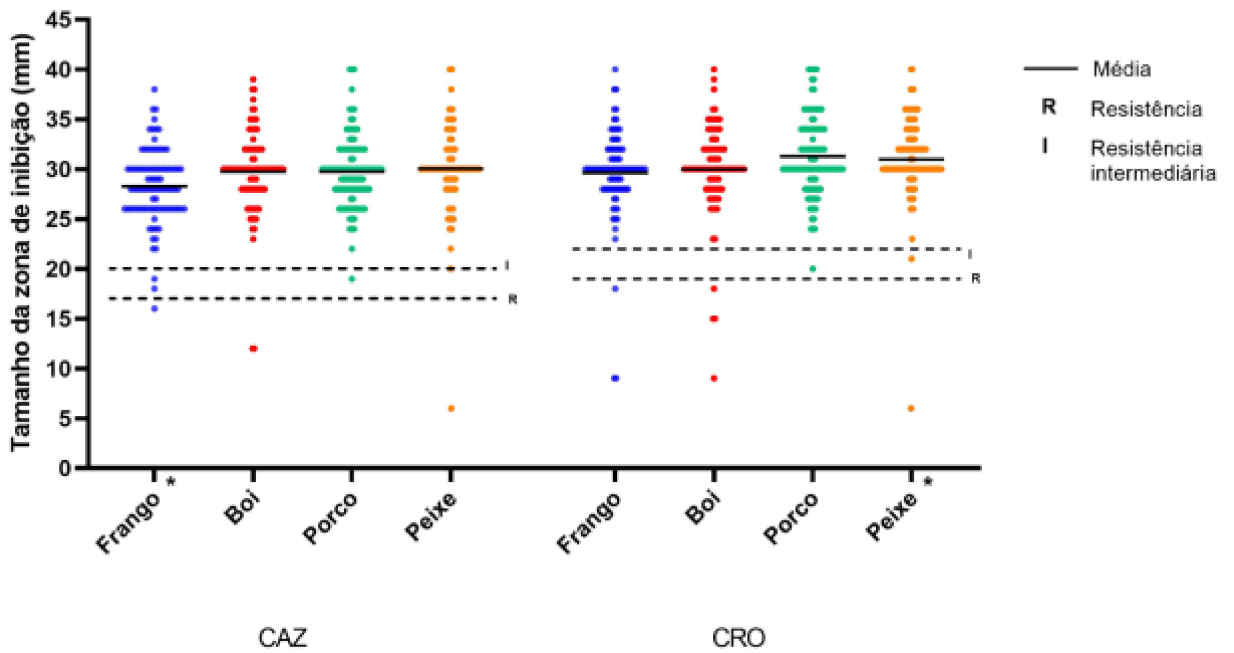


Figura 15: Distribuição dos halos de inibição da ceftazidima e ceftriaxona para os isolados provenientes das carnes de frango, bovino, suíno e de peixe.

5.4. Tolerância a metais tóxicos

A tolerância a metais tóxicos pelas *Enterobacterales* isoladas no presente estudo pode ser observada na Tabela 8, onde é apresentada em termos de CIM₅₀, CIM₉₀ e a amplitude das CIMs para os isolados classificados como multirresistentes (MDR - resistentes a 3 ou mais classes de antimicrobianos, não susceptíveis (NS - resistente a 1 a 2 classes de antimicrobianos) e susceptíveis (S - não resistente a nenhum dos antimicrobianos testados). Uma vez que os testes foram realizados de acordo com as normas do CLSI para drogas antimicrobianas (CLSI, 2021) e não há padrões de susceptibilidade a metais tóxicos, os resultados foram classificados como alta ou baixa tolerância aos mesmos.

A tolerância ao mercúrio foi mais alta para o grupo de isolados MDR (CIM₉₀ = 256 µg/mL⁻¹) comparado aos grupos NS e S (CIM₉₀ = 128 µg/mL⁻¹ e CIM₉₀ = 64 µg/mL⁻¹, respectivamente). O mesmo ocorreu para a tolerância ao cádmio, onde a CIM₉₀ para o grupo MDR foi 1.024 µg/mL⁻¹, e 512 µg/mL⁻¹ para ambos os grupos NS e S. Os isolados de todos os grupos apresentaram alta tolerância ao cobre, níquel, zinco e cromo, com uma CIM₅₀ de ≥1,024 µg/mL⁻¹ para todos os três metais (Tabela 8).

Tabela 8. Tolerância a metais tóxicos de *Enterobacteriales* isoladas de carne de frango, bovino, suíno e peixe na cidade de Juiz de Fora – Brasil.

| Metal tóxico | Concentrações inibitórias mínimas ($\mu\text{g/mL}$) | | | | | | | | |
|--|--|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| | MDR | | | NS | | | S | | |
| | CIM ₅₀ | CIM ₉₀ | Amplitude | CIM ₅₀ | CIM ₉₀ | Amplitude | CIM ₅₀ | CIM ₉₀ | Amplitude |
| Níquel (NiCl₂.6H₂O) | 1.024 | >1.024 | 1.024 - >1.024 | >1.024 | >1.024 | 512 - >1.024 | 1.024 | >1.024 | 256 - >1.024 |
| Zinco (ZnSO₄.7H₂O) | >1.024 | >1.024 | 512 - >1.024 | >1.024 | >1.024 | 128 - >1.024 | 1.024 | >1.024 | 256 - >1.024 |
| Mercúrio (HgCl₂) | 32 | 256 | 2 - 256 | 16 | 128 | 2 - 256 | 32 | 64 | 8 - 256 |
| Cádmio (CdCl₂.H₂O) | 512 | 1.024 | 128 - 1.024 | 256 | 512 | 128 - 512 | 256 | 512 | 32 - 1.024 |
| Cromo (Cr(NO₃)₃) | >1.024 | >1.024 | >1.024 - >1.024 | >1.024 | >1.024 | >1.024 - >1.024 | >1.024 | >1.024 | >1.024 - >1.024 |
| Cobre (CuSO₄) | >1.024 | >1.024 | >1.024 - >1.024 | >1.024 | >1.024 | >1.024 - >1.024 | 1.024 | 1.024 | 256 - 1.024 |

5.5. Expressão fenotípica de mecanismos de efluxo

A expressão de mecanismos de efluxo pelas *Enterobacterales* isoladas foi determinada por sua habilidade de expelir brometo de etídio da célula e, portanto, não emitir fluorescência sob incidência de radiação UV (Figura 14). No presente estudo, a concentração mínima de EtBr que resultou em emissão de fluorescência por mais de 90% dos isolados foi de 2,5 µg/mL para o grupo MDR e 2 µg/mL para os grupos Não Susceptível e Susceptível, indicando uma atividade de efluxo similar para todos os grupos de *Enterobacterales*.

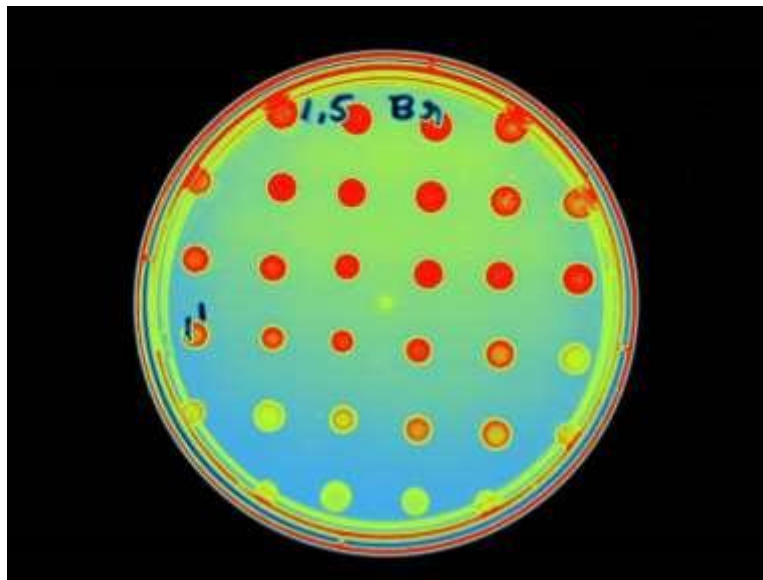


Figura 16. Emissão de fluorescência (vermelho) sob incidência de radiação UV por *Enterobacterales* isoladas de carne de frango, bovino, suíno e peixe após crescimento em meio Mueller-Hinton contendo 1,5 µg/mL de brometo de etídio.

6 DISCUSSÃO

Com o aumento no consumo de produtos de origem animal em todo o mundo, a segurança microbiológica da carne é igualmente importante para produtores, varejistas e consumidores. De acordo com a legislação brasileira, a máxima contagem de bactérias aeróbias mesofílicas para carne de frango, bovina e suína é de 10^6 UFC/g, o que indica que as médias de AS para esses tipos de carne encontradas no presente estudo estão dentro dos valores recomendados (BRASIL, 2019). Apesar de a União Europeia não ter legislação similar para carne de frango e peixe, as médias de aeróbios mesofílicos encontradas no presente trabalho ainda são consideráveis.

Estudos indicam que a contagem de cocos Gram-positivos em carne de peixe e frutos do mar são mais baixas ou ausentes em comparação à outros tipos de carne (BUZÓN-DURÁN; CAPITA; ALONSO-CALLEJA, 2017; HUSSEIN *et al.*, 2019; NAAS *et al.*, 2019). De fato, o presente estudo corrobora com isso, uma vez que as médias de contagem bacteriana observadas no meio de cultura AMH para as amostras provenientes de carne de peixe foram significativamente menores em comparação às médias de AMH dos outros tipos de carne. Ainda, há evidências de que a falta de higiene adequada durante a manipulação da carne seja uma das maiores fontes de contaminação de alimentos produtos por cocos Gram-positivos (ATLABACHEW; MAMO, 2021; KUNCARA; YULIATI; PRAHESTI, 2021; PODPEČAN; PENGGOV; VADNJAL, 2007). As amostras de filé de peixe obtidas foram vendidas pré-embaladas pelo estabelecimento varejista e, portanto, passam por um nível de manipulação muito menor em comparação às carnes de frango, bovina e suína, que são mantidas em vitrines frigoríficas nos açougues. Isso também resultaria em contagens menores de Cocos Gram-positivos na carne de peixe.

De acordo com a identificação bioquímica presuntiva proposta por Procop *et al.*, (2017), a avaliação da fermentação de glicose, sacarose e/ou lactose, produção de CO_2 durante a fermentação da glicose e produção de sulfeto de hidrogênio permitem estimar o gênero de membros da ordem *Enterobacterales* (Tabela 1) (PROCOP *et al.*, 2017). Essa estimativa permitiu a constatação de que dentre os gêneros de possível identificação no grupo G1, todos são potencialmente patogênicos ao ser humano (CHOI *et al.*, 2021; COATE *et al.*, 2021; HAJJAR *et al.*, 2020; MERTSCHNIGG *et al.*, 2020;

ZAYET *et al.*, 2021; ZGHEIB *et al.*, 2022). Em especial, os gêneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Proteus* representam maior importância clínica, sendo possíveis agentes etiológicos de doenças transmitidas por alimentos, ITUs, pneumonias, sepses, entre outras infecções (SHEU *et al.*, 2019; WANG, FANGKUN; ZHANG; NIU, 2021). Além disso, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Proteus* e *Klebsiella* são intrinsicamente resistentes a uma gama de antimicrobianos, evidenciando a importância de sua presença em alimentos (ECDC, 2022). Os fatores mencionados são relevantes do ponto de vista da segurança microbiológica dos objetos de estudo analisados na presente pesquisa, uma vez que o grupo G1 é mais representativo do estudo, com 231 isolados.

Os grupos G3 e G5, compreendendo 147 e 42 dos isolados, respectivamente, também são compostos em sua maioria por gêneros da ordem *Enterobacterales* potencialmente patogênicos, em especial *Serratia* e *Yersinia*. *Serratia* é um importante patógeno humano intrinsicamente resistente à cefazolina, e *Yersinia* é um dos mais relevantes causadores de doenças transmitidas por alimentos (ECDC, 2022; KARLSSON *et al.*, 2021; PERUZY *et al.*, 2020; YULISTIANI *et al.*, 2017). A presença desses dois gêneros em cortes de carne mundialmente não é incomum, o que evidencia a importância desse resultado (PERUZY *et al.*, 2020; YULISTIANI *et al.*, 2017).

A identificação presuntiva dos membros da ordem *Enterobacterales* também permitiu a associação entre gêneros relevantes para a saúde humana e de importância ambiental (Tabela 1). É possível que a proximidade dos dois grupos na matriz alimentar possa facilitar a transferência de marcadores moleculares de resistência a antimicrobianos entre ambos. Sabe-se que gêneros como *Lelliottia*, por exemplo, bactérias pertencentes à ordem *Enterobacterales* tipicamente não patogênicas encontradas principalmente na água e em plantas, podem possuir genes de resistência de provável origem natural, e há a possibilidade de que eles sejam transferidos a outros bacilos Gram-negativos mesofílicos aeróbios ou anaeróbios facultativos (LEISTER; HÜGLER, 2022; REITTER; NEUHAUS; HÜGLER, 2021). Deste modo, os dados obtidos implicariam na emergência de novas linhagens patogênicas resistentes.

A resistência à cefazolina foi a mais frequentemente observada, seguida pela ampicilina, encontradas em 39,1% e 30,5% dos isolados, respectivamente. Apesar de

altas, essas taxas de resistência são consideravelmente mais baixas em comparação à estudos realizados na Índia, China, Gana e Uganda (DSANI et al., 2020; ONOHUEAN; IGERE, 2022; SHARMA et al., 2019b; YANG, XIAOJUAN et al., 2020). Apesar do uso de penicilinas e cefalosporinas ser permitido na medicina veterinária, ele é proibido como agentes promotores de crescimento na agropecuária brasileira, o que indica que a pressão seletiva responsável pela prevalência desse fenótipo é derivada de outras fontes.

Comparado a estudos similares conduzidos na Espanha, Indonésia e Nigéria, os membros da ordem *Enterobacterales* isolados demonstraram baixos níveis de resistência a alguns dos antimicrobianos testados (DÍAZ-JIMÉNEZ et al., 2020; UZEH; ADEWUMI; ODUMOSU, 2021; YULISTIANI et al., 2017). Independente disso, as amostras de carne analisadas ainda demonstraram ser potenciais fontes de microrganismos resistentes, com alguns dos isolados apresentando resistência a até seis drogas simultaneamente (Tabela 3). Considerando a proposta de classificação da resistência a antimicrobianos de Magiorakos et al. (2011) em MDR, XDR e PDR, os resultados do presente trabalho indicam que 22,5% dos microrganismos isolados expressam um fenótipo compatível com a resistência múltipla a antimicrobianos de relevância clínica. Um isolado expressou resistência a apenas aztreonam e ceftazidima, e apesar de não se encaixar na classificação mencionada para microrganismos MDR, ele pode ser considerado capaz de produzir beta-lactamases de espectro estendido ou AMP-c, e ser considerado MDR por definição clássica. É importante observar que nem todas as categorias de antimicrobianos propostas pelos autores mencionados foram testadas, impedindo a identificação de linhagens potencialmente XDR ou PDR. Além disso, apesar de a identificação a nível de espécie das *Enterobacterales* recuperadas não ter sido um dos objetivos do presente estudo, a resistência a antimicrobianos encontrada pode ser associada à existência de espécies bacterianas intrinsecamente resistentes (por exemplo, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella aerogenes*, e outras). Não obstante, isso não exclui o fato de que independente da possibilidade de haver resistência intrínseca associada, marcadores moleculares de resistência aos antimicrobianos testados ainda estão presentes nas linhagens bacterianas estudadas e podem ser transferidos através de elementos genéticos móveis.

Os fenótipos de susceptibilidade a antimicrobianos observados nas bactérias isoladas de cada um dos tipos de carne foi similar, onde a resistência à ampicilina, amoxicilina-ácido clavulânico, cefoxitina e cefazolina foram os mais prevalentes. Os fenótipos encontrados sugerem que o uso indiscriminado dessas classes de drogas, seja na medicina veterinária ou humana, associado ao uso e descarte de xenobióticos no ambiente, podem estar relacionados com uma forte pressão seletiva nos diferentes ambientes da criação de animais. Há relação entre esses ambientes e o ecossistema aquático onde a piscicultura ocorre, e estudos indicam que a água tem um papel importante na conexão desses ambientes (CHERAK *et al.*, 2021). Sendo assim, ecossistemas aquáticos possuem um papel importante nesse cenário, permitindo uma rede ambiental que contribui para o movimento de determinantes e marcadores moleculares de resistência antimicrobiana. Há evidências de que bactérias ambientais, animais e humanas podem carregar tipos semelhantes de sequências gênicas e/ou genes de resistência em plasmídeos idênticos, sugerindo que bactérias ambientais resistentes e seus marcadores moleculares de resistência são potencialmente transmitidos para humanos e sua microbiota associada (EWERS *et al.*, 2012; SCHAUSS *et al.*, 2015).

Também é importante ter em mente que é prática comum armazenar carne de bovinos, suínos e de aves nas mesmas vitrines frigoríficas em açougues brasileiros, assim como o uso dos mesmos utensílios e equipamentos de processamento para todas as carnes (tábuas de corte, facas, moedores, entre outros). A contaminação cruzada conseguinte pode resultar em similaridades entre as microbiotas encontradas em cada tipo de carne.

Apesar disso, foi possível observar que a carne de frango é a que apresenta maior risco associado ao seu consumo e manipulação, contendo a maior quantidade de *Enterobacteriales* MDR (34,3%) (Tabela 2). Isso está de acordo com os achados de Skocková *et al.* (2015) e Saud *et al.* (2019) onde após a análise de *Enterobacteriales* provenientes de carne de frango, suína, bovina e de veado, também foi observado que a de frango era a que representava maior risco em termos de resistência a antimicrobianos da microbiota associada. O uso expressivo de drogas antimicrobianas na criação de aves é igualmente notório em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Os animais

frequentemente são criados em ambientes de alta densidade populacional nas fazendas, o que resulta no fácil compartilhamento de microrganismos, incluindo patogênicos, para a saúde veterinária e humana. Desta forma, um sistema intensivo de controle e prevenção de patógenos na forma de administração sub-terapêutica de antimicrobianos aos animais é realizado como forma de profilaxia (BOHAYCHUK et al., 2006; HAFEZ, 2011; JORGENSEN et al., 2002). Apesar da inegável contribuição dessa prática no sucesso da avicultura na atualidade, há impacto direto no aumento da incidência da resistência a antimicrobianos em bactérias associadas à esses animais (KUMAR; PORNUSUKAROM; THAKUR, 2019).

De forma a avaliar se a resistência a certos antimicrobianos era característica de um ou mais tipos de carne, foi investigado se os microrganismos isolados poderiam ser agrupados de acordo com seus perfis de susceptibilidade com uma abordagem de clustering hierárquico aglomerativo. A tipagem epidemiológica com base no perfil de susceptibilidade a antimicrobianos foi uma ferramenta muito utilizada no passado para vigilância e controle da disseminação de linhagens resistentes de microrganismos (ADESIDA; COKER; SMITH, 2003; GOÑI *et al.*, 2004). Atualmente, ela ainda é relevante, sendo empregada em estudos epidemiológicos de linhagens ambientais de *Vibrio cholerae* e clínicas de *Stenotrophomonas maltophilia*, por exemplo (GAJDÁCS; URBÁN, 2020; IGERE; OKOH; NWODO, 2020). No presente estudo, devido à alta homogeneidade entre os três grupos resultantes (A1, A2 e A3), não foi possível separar as carnes considerando apenas os perfis de susceptibilidade observados. Isso indica que a resistência às drogas no presente estudo é disseminada e que mais parâmetros são necessários de forma a separar as carnes.

De acordo com os resultados obtidos no teste de susceptibilidade a antimicrobianos, uma análise detalhada da dispersão dos tamanhos das zonas de inibição em resposta à exposição dos isolados à cefazolina, cefoxitina, ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, ceftazidima e ceftriaxona foi realizada. Essa análise corroborou com o fato de que a carne de frango é a de maior risco associado, com os tamanhos das zonas de inibição em resposta à ceftazidima significativamente menor comparado à carne de bovino, suíno e de peixe. Ainda, as zonas de inibição formadas pelas *Enterobacterales* provenientes da carne de frango em resposta à ceftriaxona foram

significativamente menores comparado aos isolados da carne de peixe. Esses dados estão de acordo com a literatura, onde a tolerância às cefalosporinas de terceira geração são frequentemente maiores em *Enterobacterales* provenientes da carne de aves comparado a outros tipos de carne (RAO *et al.*, 2021; YANG, XIAOJUAN *et al.*, 2020). Assim, existe a hipótese de que microrganismos sofrem maior pressão seletiva durante a cadeia de produção da carne de frango. De fato, no Brasil a droga ceftiofur, uma cefalosporina de terceira geração empregada exclusivamente na medicina veterinária, é utilizada no combate da mortalidade precoce devido a infecções em pintos, prática que pode promover seleção de linhagens bacterianas resistentes (COSTA *et al.*, 2013). Esse é um fato de relevância uma vez que há evidências de forte correlação entre a resistência à ceftriaxona em isolados humanos de *Salmonella* e isolados do mesmo gênero provenientes de carne moída de bovino e cortes de carne de bovino e de aves (IWAMOTO *et al.*, 2017).

A presença de patógenos transmitidos por alimentos exibindo tolerância a metais tóxicos já foi relatada em diversos estudos (CASTRO *et al.*, 2021; EJAZ *et al.*, 2022; MUSTAFA *et al.*, 2021). A falta de padrões técnicos para tais desenhos experimentais, no entanto, dificulta a comparação dos dados obtidos entre diferentes ensaios. De forma a evitar essa limitação, os experimentos de avaliação da tolerância a metais tóxicos entre os membros da ordem *Enterobacterales* isolados foram realizados de acordo com a técnica de diluição em ágar conforme recomendado pelo CLSI e já realizado em estudos anteriores do Centro de Estudos em Microbiologia (CEMIC) da UFJF (CLSI, 2018; DA SILVA *et al.*, 2012; RESENDE *et al.*, 2012).

Os isolados obtidos a partir de todos os tipos de carne amostrados no presente estudo demonstraram alta tolerância aos metais tóxicos níquel, zinco, cromo e cobre. As atividades agropecuárias estão entre as maiores fontes de contaminação ambiental por metais tóxicos do mundo, que também podem ser carregados através da cadeia de produção de alimentos (AL SALAH *et al.*, 2022). É possível que exista acentuada pressão seletiva causada pelo acúmulo desses metais no ecossistema onde vivem os microrganismos em questão, resultando na alta tolerância observada. De fato, cobre e zinco são frequentemente utilizados na criação de animais como antissépticos, aditivos zootécnicos e na prevenção de diarreia em leitões (YAZDANKHAH; SKJERVE;

WASTESON, 2018). A suplementação de cromo em múltiplas espécies também é também prática comum e já demonstrou uma ampla variedade de efeitos fisiológicos positivos, como melhoras na fertilidade, fecundidade e estresse (LINDEMANN; LU, 2019). Finalmente, o níquel também é suplementado na alimentação animal e já demonstrou melhora na performance de novilhos aumentando a atividade da urease (SINGH, ANUJ *et al.*, 2019).

Estudos demonstram, ainda, que a ocorrência de MDR tem correlação positiva com a tolerância à metais tóxicos em microrganismos (JIANG *et al.*, 2020). De fato, no presente trabalho foi encontrado que a CIM₉₀ em resposta aos metais mercúrio e cádmio em *Enterobacterales* MDR foi maior em comparação aos integrantes dos grupos não-susceptível e sensível. Isso pode ser explicado devido ao fato de que marcadores moleculares conferindo tolerância ao mercúrio são frequentemente encontrados em transposons e integrons juntamente a genes de resistência a antimicrobianos em bactérias Gram-negativas (KHESIN; KARASYOVA, 1984; YANG, SHENGZHI *et al.*, 2020). Ainda, a tolerância ao cádmio está frequentemente relacionada a mecanismos de efluxo, que também possuem importante papel na resistência de microrganismos MDR (NIES, 1999).

Sistemas de efluxo bacterianos representam desafios terapêuticos complexos com relação à resistência a antimicrobianos devido à sua quantidade e diversidade. Esses sistemas frequentemente possuem sobreposição no reconhecimento de substratos e uma única bomba pode expelir vários biocidas, íons tóxicos e antimicrobianos da célula (WILLERS *et al.*, 2017). No presente estudo, a atividade de efluxo dos isolados obtidos foi avaliada a partir do método de EtBr de cartwheel com modificações (MARTINS *et al.*, 2011). O EtBr é considerado um substrato comum das bombas de efluxo em *Enterobacterales* (SCHUMACHER *et al.*, 2007). Desse modo, o método de brometo de EtBr de cartwheel é utilizado para rápida detecção fenotípica de mecanismos de efluxo (ABDEL-KARIM *et al.*, 2022; ANBAZHAGAN *et al.*, 2019; BEHDAD *et al.*, 2020).

Na análise da expressão fenotípica de bombas de efluxo nas *Enterobacterales* isoladas, foi possível observar atividade de efluxo para todos os grupos testados, (MDR, não-susceptível e susceptível), sendo maior a atividade no grupo MDR. Bombas de efluxo

estão entre alguns dos mecanismos responsáveis pela resistência aos antimicrobianos com maiores frequências de resistência no presente estudo (ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefazolina e cefoxitina), o que explicaria esse resultado. Há evidências do envolvimento da expressão das bombas de efluxo AcrAB-TolC e AcrD na resistência à amoxicilina/ácido clavulânico, cefoxitina e cefazolina (BERNAL *et al.*, 2021; PAGES *et al.*, 2009; TELKE *et al.*, 2017). Ainda, OqxAB está envolvida na resistência à ampicilina (LI, JUN *et al.*, 2019). Uma vez que bombas de efluxo, inclusive as supracitadas, podem estar presentes em elementos genéticos móveis, isso implicaria no fato de que genes específicos para a resistência a algumas drogas podem não estar disponíveis para transferência nas bactérias do presente estudo, e sim genes codificadores de mecanismos de efluxo (SHI *et al.*, 2019).

Os mecanismos de efluxo sendo expressos também podem estar relacionados à resistência cruzada, com extrusão de outros compostos e íons, como metais tóxicos (WILLERS *et al.*, 2017). Isso explicaria a atividade de efluxo observada em microrganismos que não apresentaram resistência a nenhum dos antimicrobianos testados no presente estudo. É importante observar que apenas foram testados representantes de classes de antimicrobianos de relevância clínica no estudo, sendo possível que os isolados presentes nos grupos não-susceptível e susceptível podem ser resistentes a outros representantes de tais classes (LI, JUN *et al.*, 2019). Mais estudos são necessários para melhor caracterizar a natureza dos mecanismos de efluxo expressos pelos isolados do presente estudo e o impacto de sua expressão no ambiente.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O avanço da resistência bacteriana a antimicrobianos nas últimas décadas torna importante a identificação de potenciais disseminadores e a busca por formas de mitigar o problema. Nesse contexto, a compreensão do papel que a alimentação desempenha é imprescindível, em especial da produção e consumo de carne, alimento altamente relevante na dieta humana e fonte significativa de nutrientes. A carne que chega ao consumidor mundialmente pode ser fonte de disseminação de microrganismos de interesse clínico resistentes a antimicrobianos, inclusive bactérias pertencentes à ordem *Enterobacterales*. Muitos dos membros dessa ordem são importantes patógenos transmitidos por alimentos e a resistência nesse grupo representa um grande desafio para a saúde pública com sérios impactos econômicos e sociais mundialmente.

As carnes analisadas no presente estudo apresentaram alta prevalência de microrganismos MDR, em especial a carne de frango, o que evidencia o risco associado a seu consumo. Além disso, a tolerância a metais tóxicos e expressão de mecanismos de efluxo pelos isolados obtidos no presente estudo indicam que a pressão seletiva sobre esses microrganismos no ambiente em que vivem não é proveniente apenas de antimicrobianos.

De forma a aprofundar a análise dos microrganismos isolados quanto a fatores de virulência associados, presença de marcadores moleculares de resistência à drogas e de tolerância a metais tóxicos e tipos de genes codificadores de mecanismos de efluxo presentes, foi realizado o sequenciamento do genoma de alguns isolados representativos de interesse. A análise dos genomas em questão já está em andamento e permitirá o estudo continuado da resistência em *Enterobacterales* presentes em cortes de carne.

Esforços coordenados para implementar novas políticas e incentivar pesquisas são altamente necessários de forma a combater a resistência bacteriana. Sendo assim, a abordagem One Health é essencial no enfrentamento de todos os fatores contribuintes na emergência e disseminação de microrganismos resistentes a antimicrobianos.

8 CONCLUSÃO

- A contaminação por cocos Gram-positivos é menor na carne de peixe em comparação às outras avaliadas no estudo;
- Não foi possível observar diferença significativa entre as contagens de *Enterobacterales* putativas dentre as carnes analisadas;
- A maior presença de *Enterobacterales* MDR na carne de frango indica que ela é o tipo de carne de maior risco associado ao consumo do ponto de vista da resistência a antimicrobianos da microbiota associada;
- É possível que os membros da ordem *Enterobacterales* presentes nas carnes analisadas sofram alta pressão seletiva dos metais zinco, cobre, níquel e cromo no ambiente;
- A presença de atividade de efluxo em microrganismos caracterizados como sensíveis aos antimicrobianos testados indica a possibilidade de que as bombas de efluxo presentes tenham como substrato outros antimicrobianos, biocidas ou íons tóxicos;
- Há possibilidade de ampla pressão seletiva ambiental permitindo a persistência e disseminação de marcadores moleculares de resistência à drogas de interesse clínico e veterinário, em especial ampicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, cefazolina e cefoxitina;

9 REFERÊNCIAS

- ABDEL-KARIM, Safaa Abdel Aal Mohamed *et al.* Promising FDA-approved drugs with efflux pump inhibitory activities against clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. **PLOS ONE** v. 17, n. 7, p. e0272417 , 1 jul. 2022. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0272417>>. Acesso em: 30 out. 2022.
- ABIEC. *Exportações de carnes bovinas encerram 2019 com recordes em volume e faturamento – ABIEC*. Disponível em: <<https://www.abiec.com.br/exportacoes-de-carne-bovinas-encerram-2019-com-recordes-em-volume-e-faturamento/>>. Acesso em: 29 set. 2022.
- ABRIL, Ana G. *et al.* *Staphylococcus aureus* Exotoxins and Their Detection in the Dairy Industry and Mastitis. **Toxins** v. 12, n. 9 , 1 set. 2020. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC7551672/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34811672/)>. Acesso em: 3 out. 2022.
- ADEOLU, Mobolaji *et al.* Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘ Enterobacterales ’ : proposal for Enterobacterales ord . nov . divided into the families nov ., and Budviciaceae fam . nov . n. 2016, p. 5575–5599 , 2018.
- ADESIDA, Solayide A; COKER, Akitoeye O; SMITH, Stella I. Resistotyping of *Campylobacter jejuni*. **Niger Postgrad Med J**. v. 10, n. 4, p. 211–215 , 2003.
- AHMAD, Rabia Shabir; IMRAN, Ali; HUSSAIN, Muhammad Bilal. Nutritional Composition of Meat. **Meat Science and Nutrition**. [S.l.]: InTech, 2018.
- AMACHAWADI, Raghavendra G. *et al.* Nasal carriage of *mecA*-positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs exhibits dose-response to zinc supplementation. **Foodborne pathogens and disease** v. 12, n. 2, p. 159–163 , 1 fev. 2015. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25551258/>>. Acesso em: 23 ago. 2022.
- ANBAZHAGAN, Prasanna Vadhana *et al.* Evaluation of efflux pump activity of multidrug-resistant *Salmonella Typhimurium* isolated from poultry wet markets in India. **Infection and Drug Resistance** v. 12, p. 1081 , 2019. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC6511633/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34811633/)>. Acesso em: 30 out. 2022.
- ANTUNES, Patrícia; NOVAIS, Carla; PEIXE, Luísa. Food-to-Humans Bacterial Transmission. **Microbiology Spectrum** v. 8, n. 1 , 16 jan. 2020. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/microbiolspec.MTBP-0019-2016>>. Acesso em: 1 out. 2022.

ARAÚJO, Hélvia W C *et al.* Sustainable biosurfactant produced by *Serratia marcescens* UCP 1549 and its suitability for agricultural and marine bioremediation applications. **Microbial Cell Factories** p. 1–13 , 2019.

ARTRIDGE, S Ally R P. Resistance mechanisms in Enterobacteriaceae Copyright © Royal College of pathologists of Australasia . Unauthorized reproduction of this article is prohibited . v. 47, n. April, p. 276–284 , 2015.

BAJUNAID, Waad *et al.* The T3SS of *Shigella*: Expression, Structure, Function, and Role in Vacuole Escape. **Microorganisms** **2020**, **Vol. 8**, **Page 1933** v. 8, n. 12, p. 1933 , 5 dez. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2607/8/12/1933/htm>>. Acesso em: 11 out. 2022.

BALTZ, Richard H. Antimicrobials from Actinomycetes: Back to the Future. v. 2, n. 3, p. 125–131 , 2007.

BARBOSA-CÁNOVAS, Gustavo V *et al.* Food Engineering Series Series Editor. , 2020. Disponível em: <<http://www.springer.com/series/5996>>. Acesso em: 2 out. 2022.

BARRE, Weston La. Freudian Biology, Magic, and Religion. **Journal of the American Psychoanalytic Association** v. 26, n. 4, p. 813–830 , 1 ago. 1978. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/000306517802600406>>.9780309156110.

BAUER, A W *et al.* Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. , 1966. Acesso em: 21 set. 2022.

BEHDAD, Reyhaneh *et al.* Efflux pump inhibitory activity of biologically synthesized silver nanoparticles against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. **Journal of Basic Microbiology** v. 60, n. 6, p. 494–507 , 1 jun. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jobm.201900712>>. Acesso em: 30 out. 2022.

BEN, Weiwei *et al.* Dissemination of antibiotic resistance genes and their potential removal by on-farm treatment processes in nine swine feedlots in Shandong Province, China. **Chemosphere** v. 167, p. 262–268 , 1 jan. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27728885/>>. Acesso em: 13 out. 2022.

BENNISH, Michael L.; AHMED, Sabeena. Shigellosis. **Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases** p. 492–499 , 1 jan. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978032355512800048X>>. Acesso em: 11 out. 2022.

BERNAL, Jenifer Cuesta *et al.* Characterization and Molecular Determinants for β -Lactam Specificity of the Multidrug Efflux Pump AcrD from *Salmonella typhimurium*. **Antibiotics (Basel, Switzerland)** v. 10, n. 12 , 1 dez. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34943706/>>. Acesso em: 30 out. 2022.

BINSKER, Ulrike; KÄSBOHRER, Annemarie; HAMMERL, Jens A. Global colistin use: a review of the emergence of resistant Enterobacterales and the impact on their genetic basis. **FEMS Microbiology Reviews** v. 46, n. 1, p. 1–37 , 9 fev. 2022. Disponível em: <<https://academic.oup.com/femsre/article/46/1/fuab049/6382128>>. Acesso em: 13 out. 2022.049/6382128.

BINTSIS, Thomas. Foodborne pathogens. **AIMS Microbiology** v. 3, n. 3, p. 529 , 2017a. Disponível em: </pmc/articles/PMC6604998/>. Acesso em: 30 set. 2022.

BINTSIS, Thomas. Foodborne pathogens. **AIMS Microbiology** v. 3, n. 3, p. 529 , 2017b. Disponível em: </pmc/articles/PMC6604998/>. Acesso em: 2 out. 2022.

Bonomo RA. β -Lactamases: A Focus on Current Challenges. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017 Jan 3;7(1):a025239.

BOUCHILLON, Samuel K; SAHM, Daniel F; BRADFORD, A. Global Dissemination of bla KPC into Bacterial Species beyond Klebsiella pneumoniae and In Vitro Susceptibility to Ceftazidime- Avibactam and Aztreonam-Avibactam. v. 60, n. 8, p. 4490–4500 , 2016.

BRASIL. *BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária. Laboratório Nacional de Referência Animal (LANARA). Portaria n° Métodos Analíticos Oficiais para Controle de Produtos de Origem Animal e seus Ingredientes: métodos físicos e químicos.* . [S.l.]: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/decreto/d9013.htm. , 1981

BRASIL. *DECRETO N° 9.013, DE 29 DE MARÇO DE 2017 Regulamenta a Lei n° 1.283, de 18 de dezembro de 1950, e a Lei n° 7.889, de 23 de novembro de 1989, que dispõem sobre a inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal.* . [S.l.]: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/decreto/d9013.htm. , 2017

BRASIL. *INSTRUÇÃO NORMATIVA N° 60, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2019.*

BUSH, Karen. Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. **Nature Reviews Microbiology** v. 17, n. may , 2019.

BUZÓN-DURÁN, Laura; CAPITA, Rosa; ALONSO-CALLEJA, Carlos. Microbial loads and antibiotic resistance patterns of Staphylococcus aureus in different types of raw poultry-based meat preparations. **Poultry Science** v. 96, n. 11, p. 4046–4052 , nov. 2017.

CARD, Roderick *et al.* Virulence Characterisation of Salmonella enterica Isolates of Differing Antimicrobial Resistance Recovered from UK Livestock and Imported Meat Samples. **Frontiers in microbiology** v. 7, n. MAY , 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27199965/>>. Acesso em: 13 out. 2022.

CASTRO, Hanna *et al.* Mobile Elements Harboring Heavy Metal and Bacitracin Resistance Genes Are Common among Listeria monocytogenes Strains Persisting on

- Dairy Farms. **mSphere** v. 6, n. 4 , 25 ago. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34232074/>>. Acesso em: 30 out. 2022.
- CDC. *Diseases and Organisms in Healthcare Settings*. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/hai/organisms/organisms.html>>
- CDC. *Foodborne Germs and Illnesses | CDC*. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/foodsafety/foodborne-germs.html>>. Acesso em: 30 set. 2022.
- CHANDRA, Harish *et al.* Pathobionts: mechanisms of survival, expansion, and interaction with host with a focus on *Clostridioides difficile*. **Gut Microbes** v. 13, n. 1 , 2021. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC8565823/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34232074/)>. Acesso em: 10 out. 2022.
- CHENG, Guyue *et al.* Selection and dissemination of antimicrobial resistance in Agri-food production. , [S.d.]. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s13756-019-0623-2>>. Acesso em: 22 ago. 2022.
- CHENG, Ming Fang *et al.* Urinary tract infection in infants caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: comparison between urban and rural hospitals. **Pediatric nephrology (Berlin, Germany)** v. 31, n. 8, p. 1305–1312 , 1 ago. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26975387/>>. Acesso em: 11 out. 2022.
- CHENIA, Hafizah Y.; JACOBS, Anelet. Antimicrobial resistance, heavy metal resistance and integron content in bacteria isolated from a South African tilapia aquaculture system. **Diseases of Aquatic Organisms** v. 126, n. 3, p. 199–209 , 21 nov. 2017. Disponível em: <<https://www.int-res.com/abstracts/dao/v126/n3/p199-209/>>. Acesso em: 23 ago. 2022.
- CHERAK, Zineb *et al.* Epidemiology of mobile colistin resistance (mcr) genes in aquatic environments. **Journal of global antimicrobial resistance** v. 27, p. 51–62 , 1 dez. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34438108/>>. Acesso em: 3 nov. 2022.
- CHOI, Hosoon *et al.* Rare *Lelliottia nimipressuralis* from a wound infection case report using whole genome sequencing-based bacterial identification. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** v. 101, n. 4, p. 115538 , 1 dez. 2021. Acesso em: 30 out. 2022.
- CLSI. **M100-S25 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement An informational supplement for global application developed through the Clinical and Laboratory Standards Institute consensus process**. [S.l.: s.n.], 2018. Disponível em: <www.clsi.org>.610.688.0700.
- COATE, E *et al.* Novel discovery of Extended Spectrum β -lactamase (ESBL) *Pluralibacter gergoviae* in acute urinary tract infection and urolithiasis. **American Journal of Clinical Pathology** v. 156, n. Supplement_1, p. S128–S128 , 28 out. 2021. Disponível em:

<https://academic.oup.com/ajcp/article/156/Supplement_1/S128/6413120>. Acesso em: 30 out. 2022.

COCKING, Chris *et al.* The role of meat in the European diet: current state of knowledge on dietary recommendations, intakes and contribution to energy and nutrient intakes and status. **Nutrition Research Reviews** v. 33, n. 2, p. 181–189 , 10 dez. 2020.

CORNAGLIA, Giuseppe; GIAMARELLOU, Helen; ROSSOLINI, Gian Maria. Metallo- β -lactamases : a last frontier for β -lactams ? **The Lancet Infectious Diseases** v. 11, n. 5, p. 381–393 , 2011.

COSTA, Renata G. *et al.* Antimicrobial susceptibility and serovars of salmonella circulating in commercial poultry carcasses and poultry products in Brazil. **Journal of food protection** v. 76, n. 12, p. 2011–2017 , jan. 2013. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24290674/>>. Acesso em: 31 out. 2022.

CTX-M-, Gene; ZIENKIEWICZ, M; ADAMCZYK, M. Complete Nucleotide Sequence of the pCTX-M3 Plasmid and Its Involvement in Spread of the Extended-Spectrum. v. 51, n. 11, p. 3789–3795 , 2007.

DA SILVA, Vânia Lúcia *et al.* Occurrence of Multidrug-Resistant and Toxic-Metal Tolerant Enterococci in Fresh Feces from Urban Pigeons in Brazil. **Microbes and Environments** v. 27, n. 2, p. 179 , 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24290674/>>. Acesso em: 28 out. 2022.

DANKWA, A. S.; MACHADO, R. M.; PERRY, J. J. Sources of food contamination in a closed hydroponic system. **Letters in applied microbiology** v. 70, n. 1, p. 55–62 , 1 jan. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31660628/>>. Acesso em: 3 out. 2022.

DCOSTA, Vanessa M. *et al.* Antibiotic resistance is ancient. **Nature** v. 477, n. 7365, p. 457–461 , 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature10388>>.

DE ANGELIS, Giulia *et al.* Molecular Mechanisms, Epidemiology, and Clinical Importance of β -Lactam Resistance in Enterobacteriaceae. **International Journal of Molecular Sciences** v. 21, n. 14, p. 5090 , 18 jul. 2020.

DOI, Yohei; WACHINO, Jun-ichi; ARAKAWA, Yoshichika. HHS Public Access. v. 30, n. 2, p. 523–537 , 2017.

DRAGO, Lorenzo. Chloramphenicol Resurrected: A Journey from Antibiotic Resistance in Eye Infections to Biofilm and Ocular Microbiota. **Microorganisms** 2019, Vol. 7, Page 278 v. 7, n. 9, p. 278 , 21 ago. 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-2607/7/9/278/htm>>. Acesso em: 13 out. 2022.

ECDC. *Disease Programmes Unit*. Disponível em: <<https://www.ecdc.europa.eu/en/about-us/who-we-are/units/disease-programmes-unit>>. Acesso em: 30 out. 2022.

EFSA-ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. **EFSA Journal** v. 15, n. 12 , dez. 2017.

EJAZ, Hasan *et al.* Multiple Antimicrobial Resistance and Heavy Metal Tolerance of Biofilm-Producing Bacteria Isolated from Dairy and Non-Dairy Food Products. **Foods (Basel, Switzerland)** v. 11, n. 18 , 1 set. 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36140855/>>. Acesso em: 30 out. 2022.

ETTAYEBI, M.; PRASAD, S. M.; MORGAN, E. A. Chloramphenicol-erythromycin resistance mutations in a 23S rRNA gene of Escherichia coli. **Journal of Bacteriology** v. 162, n. 2, p. 551 , 1985. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/162/2/551/>>. Acesso em: 13 out. 2022.

EWERS, C. *et al.* Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing Escherichia coli from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. **Clinical Microbiology and Infection** v. 18, n. 7, p. 646–655 , jul. 2012.

FAIR RJ; TOR Y. Bacterial Resistance in the 21st Century. **Perspectives in medicinal chemistry** v. 6, p. 25–64 , 2014.1177-391X (Electronic) 1177-391X (Linking).

FANG, Jiehong; ZHU, Cheng. Diverse Mobile Genetic Elements and Conjugal Transferability of Sulfonamide Resistance Genes (sul1 , sul2 , and sul3) in Escherichia coli Isolates From Penaeus vannamei and Pork From Large Markets in. v. 10, n. August , 2019.

FAO E OMS. **Assuring Food Safety and Quality: Guidelines for Strengthening National Food Control Systems**. 2003.

FINLEY, Rita L. *et al.* The scourge of antibiotic resistance: The important role of the environment. **Clinical Infectious Diseases** v. 57, n. 5, p. 704–710 , 2013.

FOLLOWING, Resistance; THERAPY, Human. Tetracycline Antibiotics : Mode of Action , Applications , Molecular Biology , and Epidemiology of Bacterial Resistance. v. 65, n. 2, p. 232–260 , 2001.

FUNG, Fred; WANG, Huei Shyong; MENON, Suresh. Food safety in the 21st century. **Biomedical Journal** v. 41, n. 2, p. 88–95 , 1 abr. 2018a. Acesso em: 12 set. 2022.

FUNG, Fred; WANG, Huei Shyong; MENON, Suresh. Food safety in the 21st century. **Biomedical Journal** v. 41, n. 2, p. 88–95 , 1 abr. 2018b. Acesso em: 11 out. 2022.

GAJDÁCS, MÁRIÓ; URBÁN, EDIT. A 10-year single-center experience on Stenotrophomonas maltophilia resistotyping in Szeged, Hungary. **European Journal of Microbiology & Immunology** v. 10, n. 2, p. 91 , 7 jul. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36140855/>>. Acesso em: 30 out. 2022.

- GALLO, Monica *et al.* Relationships between food and diseases: What to know to ensure food safety. **Food research international (Ottawa, Ont.)** v. 137 , 1 nov. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33233102/>>. Acesso em: 11 out. 2022.
- GARAU, Gianpiero *et al.* Structure-Based Phylogeny of the Metallo- β -Lactamases. v. 49, n. 7, p. 2778–2784 , 2005.
- GILLINGS, M. R.; WESTOBY, M.; GHALY, T. M. Pollutants That Replicate: Xenogenetic DNAs. **Trends in Microbiology** v. 26, n. 12, p. 975–977 , 2018.
- GILLINGS, Michael R. DNA as a Pollutant: the Clinical Class 1 Integron. **Current Pollution Reports** v. 4, n. 1, p. 49–55 , 2018.
- GOÑI, P. *et al.* Antibiotic resistance and epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* strains from ovine and rabbit mastitis. **International Journal of Antimicrobial Agents** v. 23, n. 3, p. 268–272 , 1 mar. 2004. Acesso em: 30 out. 2022.
- GORDILLO ALTAMIRANO, Fernando L.; BARR, Jeremy J. Phage Therapy in the Postantibiotic Era. **Clinical Microbiology Reviews** v. 32, n. 2, p. 1–25 , 2019.
- GROSSMAN, Trudy H. Tetracycline Antibiotics and Resistance. p. 1–25 , 2016.
- GUILLIER, Laurent *et al.* Risk factors for sporadic *Yersinia enterocolitica* infections: a systematic review and meta-analysis. **Microbial Risk Analysis** v. 17, p. 100141 , abr. 2021.
- HAJJAR, Roy *et al.* *Raoultella ornithinolytica*: Emergence and Resistance. **Infection and Drug Resistance** v. 13, p. 1091 , 2020. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC7167274/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33233102/)>. Acesso em: 30 out. 2022.
- HEREDIA, Norma; GARCÍA, Santos. Animals as sources of food-borne pathogens: A review. **Animal Nutrition** v. 4, n. 3, p. 250–255 , 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.04.006>>.
- HINDERMANN, Denise *et al.* *Salmonella enterica* serovar infantis from food and human infections, Switzerland, 2010-2015: Poultry-related multidrug resistant clones and an emerging ESBL producing clonal lineage. **Frontiers in Microbiology** v. 8, n. JUL, p. 1–9 , 2017.
- HOBAN, D J *et al.* Worldwide Prevalence of Antimicrobial Resistance in *Streptococcus pneumoniae* , *catarrhalis* in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program , 1997 – 1999. v. 32, n. Suppl 2 , 2001.
- HOMEIER-BACHMANN, Timo *et al.* Antibiotic-Resistant Enterobacteriaceae in Wastewater of Abattoirs. **Antibiotics** v. 10, n. 5 , 1 maio 2021. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC8150771/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33233102/)>. Acesso em: 13 out. 2022.
- HOOPER, David C. Emerging Mechanisms of Fluoroquinolone Resistance. v. 7, n. 2, p. 337–341 , 2001.6177267416.

- HUSSEIN, Mohamed A. *et al.* Prevalence of Enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* and Shiga Toxin Producing *Escherichia coli* in Fish in Egypt: Quality Parameters and Public Health Hazard. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases** v. 19, n. 4, p. 255–264 , abr. 2019.
- IBRD-IDA. *The Safe Food Imperative: Accelerating Progress in Low- and Middle-Income Countries*. Disponível em: <<https://www.worldbank.org/en/topic/agriculture/publication/the-safe-food-imperative-accelerating-progress-in-low-and-middle-income-countries>>. Acesso em: 29 set. 2022.
- IGERE, Bright E.; OKOH, Anthony I.; NWODO, Uchechukwu U. Antibiotic Susceptibility Testing (AST) Reports: A Basis for Environmental/Epidemiological Surveillance and Infection Control Amongst Environmental *Vibrio cholerae*. **International Journal of Environmental Research and Public Health** 2020, Vol. 17, Page 5685 v. 17, n. 16, p. 5685 , 6 ago. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1660-4601/17/16/5685/htm>>. Acesso em: 30 out. 2022.
- IWAMOTO, Martha *et al.* Ceftriaxone-Resistant Nontyphoidal *Salmonella* from Humans, Retail Meats, and Food Animals in the United States, 1996–2013. **Foodborne Pathogens and Disease** v. 14, n. 2, p. 74–83 , fev. 2017.
- IZARD, Tina; ELLIS, Jacqueline. The crystal structures of chloramphenicol phosphotransferase reveal a novel inactivation mechanism. **The EMBO journal** v. 19, n. 11, p. 2690–2700 , 1 jun. 2000. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10835366/>>. Acesso em: 13 out. 2022.
- JACOBY, George A. AmpC β -Lactamases. v. 22, n. 1, p. 161–182 , 2009.
- JANDA, J. Michael; ABBOTT, Sharon 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, n. 2 , 17 mar. 2021.
- Ji, Xiuling *et al.* Antibiotic resistance gene abundances associated with antibiotics and heavy metals in animal manures and agricultural soils adjacent to feedlots in Shanghai; China. **Journal of Hazardous Materials** v. 235–236, p. 178–185 , 15 out. 2012. Acesso em: 23 ago. 2022.
- JIANG, Han *et al.* Co-occurrence of Antibiotic and Heavy Metal Resistance and Sequence Type Diversity of *Vibrio parahaemolyticus* Isolated From *Penaeus vannamei* at Freshwater Farms, Seawater Farms, and Markets in Zhejiang Province, China. **Frontiers in Microbiology** v. 11, p. 1294 , 26 jun. 2020. Acesso em: 23 ago. 2022.
- JOCHUM, Lara; STECHER, Bärbel. Label or Concept - What Is a Pathobiont? **Trends in Microbiology** v. 28, p. 789–792 , 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.04.011>>. Acesso em: 10 out. 2022.

- KANG, Jahyun *et al.* Relative frequency of health care-associated pathogens by infection site at a university hospital from 1980 to 2008. **American journal of infection control** v. 40, n. 5, p. 416–420 , jun. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21943832/>>. Acesso em: 10 out. 2022.
- KARLSSON, Philip A. *et al.* Molecular Characterization of Multidrug-Resistant *Yersinia enterocolitica* From Foodborne Outbreaks in Sweden. **Frontiers in Microbiology** v. 12, p. 943 , 13 maio 2021. Acesso em: 30 out. 2022.
- KHESIN, R. B.; KARASYOVA, E. V. Mercury-resistant plasmids in bacteria from a mercury and antimony deposit area. **Molecular and General Genetics MGG 1984 197:2** v. 197, n. 2, p. 280–285 , nov. 1984. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF00330974>>. Acesso em: 20 set. 2022.
- KULASOORIYA, G D B N *et al.* Salmonella , Campylobacter and Escherichia coli IN RAW CHICKEN MEAT , CHICKEN PRODUCTS AND COOKED CHICKEN IN RETAIL MARKETS IN KANDY , SRI LANKA. **Sri Lanka Veterinary Journal** v. 66, n. 1, p. 19–26 , 2019.
- LI, Jun *et al.* The nature and epidemiology of OqxAB, a multidrug efflux pump. **Antimicrobial Resistance and Infection Control** v. 8, n. 1, p. 1–13 , 22 fev. 2019. Disponível em: <<https://aricjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13756-019-0489-3>>. Acesso em: 30 out. 2022.
- LI, Zhen *et al.* Interactions and associated resistance development mechanisms between microplastics, antibiotics and heavy metals in the aquaculture environment. **Reviews in Aquaculture** v. 14, n. 2, p. 1028–1045 , 1 mar. 2022. Acesso em: 22 ago. 2022.
- LIANG, Kang *et al.* SC. **Cancer Letters** , 2019.
- LIGUORI, Julia *et al.* How do food safety concerns affect consumer behaviors and diets in low- and middle-income countries? A systematic review. **Global Food Security** v. 32, p. 100606 , 1 mar. 2022. Acesso em: 12 set. 2022.
- LINDEMANN, Merlin D.; LU, Ning. Use of chromium as an animal feed supplement. **The Nutritional Biochemistry of Chromium (III)** p. 79–125 , 1 jan. 2019. Acesso em: 2 nov. 2022.
- LIU, Yang *et al.* Shiga Toxins: An Update on Host Factors and Biomedical Applications. **Toxins 2021, Vol. 13, Page 222** v. 13, n. 3, p. 222 , 18 mar. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6651/13/3/222/html>>. Acesso em: 11 out. 2022.
- LIU, Yi Yun *et al.* Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet. Infectious diseases** v. 16, n. 2, p. 161–168 , 1 fev. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26603172/>>. Acesso em: 13 out. 2022.

- LIVERMORE, David M *et al.* False extended-spectrum β -lactamase phenotype in clinical isolates of *Escherichia coli* associated with increased expression of OXA-1 or TEM-1 penicillinases and loss of porins. n. July, p. 2006–2010 , 2011.
- LIVERMORE, David M. Has the era of untreatable infections arrived? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v. 64, n. SUPPL.1, p. 29–36 , 2009.
- LOMOVSKAYA, Olga *et al.* crossm Vaborbactam : Spectrum of Beta- Lactamase Inhibition and Impact of Resistance Mechanisms on Activity in Enterobacteriaceae. v. 61, n. 11, p. 1–15 , 2017.
- LYNCH, Joseph P.; CLARK, Nina M.; ZHANEL, George G. Escalating antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae: focus on carbapenemases. <https://doi.org/10.1080/14656566.2021.1904891> v. 22, n. 11, p. 1455–1473 , 2021. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14656566.2021.1904891>>. Acesso em: 13 out. 2022.
- MAGIORAKOS, A. P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection** v. 18, n. 3, p. 268–281 , 1 mar. 2012. Disponível em: <<http://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/article/S1198743X14616323/fulltext>>. Acesso em: 20 set. 2022.
- MANAIA, Célia M. Assessing the Risk of Antibiotic Resistance Transmission from the Environment to Humans: Non-Direct Proportionality between Abundance and Risk. **Trends in Microbiology** v. 25, n. 3, p. 173–181 , 2017.
- MARE, Anca Delia *et al.* Enteropathogenic *Escherichia coli*—A Summary of the Literature. **Gastroenterology Insights 2021, Vol. 12, Pages 28-40** v. 12, n. 1, p. 28–40 , 27 jan. 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2036-7422/12/1/4/htm>>. Acesso em: 11 out. 2022.
- MARTENS, Evan; DEMAINE, Arnold L. The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. **The Journal of Antibiotics 2017 70:5** v. 70, n. 5, p. 520–526 , 1 mar. 2017. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ja201730>>. Acesso em: 23 ago. 2022.
- MARTINS, M. *et al.* Identification of Efflux Pump-mediated Multidrug-resistant Bacteria by the Ethidium Bromide-agar Cartwheel Method. **In Vivo** v. 25, n. 2, p. 171–178 , mar. 2011.
- MCLEAN, Kathryn *et al.* Downloaded from <http://jcm.asm.org/> on September 3 , 2019 at Glasgow University Library Downloaded from <http://jcm.asm.org/> on September 3 , 2019 at Glasgow University Library. n. August , 2019.

- MEGAN, Cook; EL, Molto; C., Anderson. Fluorochrome labelling in roman period skeletons from dakhleh oasis, Egypt. **American Journal of Physical Anthropology** v. 80, n. 2, p. 137–143 , 1989.
- MERTSCHNIGG, Tanja *et al.* First Report of Kosakonia radicincitans Bacteraemia from Europe (Austria) - Identification and Whole-Genome Sequencing of Strain DSM 107547. **Scientific Reports** **2020 10:1** v. 10, n. 1, p. 1–6 , 6 fev. 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-020-58689-x>>. Acesso em: 30 out. 2022.
- MILFORD, Anna Birgitte *et al.* Drivers of meat consumption. **Appetite** v. 141, p. 104313 , 1 out. 2019. Acesso em: 28 set. 2022.
- MINH, Ho Chi; MEDICINE, Tropical; MINH, Ho Chi. YPHOID fever is a systemic infection with the bacterium. v. 347, n. 22 , 2002.
- MIRANDA, M; CEPEDA, Alberto. Analytical Methods for the simultaneous determination of amphenicols in. , 2013.
- MONACO, M. *et al.* Colistin resistance superimposed to endemic carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae: a rapidly evolving problem in Italy, November 2013 to April 2014. **Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin** v. 19, n. 42 , 23 out. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25358041/>>. Acesso em: 13 out. 2022.
- MORALES-LÓPEZ, Soraya *et al.* Enterobacteria in the 21st century: a review focused on taxonomic changes. **The Journal of Infection in Developing Countries** v. 13, n. 04, p. 265–273 , 30 abr. 2019. Disponível em: <<https://jids.org/index.php/journal/article/view/11216>>. Acesso em: 10 out. 2022.
- MURRAY, Iain A; SHAW, William V. MINIREVIEW O -Acetyltransferases for Chloramphenicol and Other Natural Products. v. 41, n. 1, p. 1–6 , 1997.
- MUSTAFA, Ghulam Raza *et al.* Heavy Metal Resistance in Salmonella Typhimurium and Its Association With Disinfectant and Antibiotic Resistance. **Frontiers in microbiology** v. 12 , 4 ago. 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34421860/>>. Acesso em: 30 out. 2022.
- NAAS, Hesham T. *et al.* Occurrence, characterization, and antibiogram of Staphylococcus aureus in meat, meat products, and some seafood from Libyan retail markets. **Veterinary World** v. 12, n. 6, p. 925–931 , 29 jun. 2019.
- NIES, D. H. Microbial heavy-metal resistance. **Applied Microbiology and Biotechnology** **1999 51:6** v. 51, n. 6, p. 730–750 , 1999. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s002530051457>>. Acesso em: 20 set. 2022.
- NITZAN, Orna *et al.* Is Chloramphenicol Making a Comeback ? v. 12, n. june, p. 371–374 , 2010.

NORDMANN, P; POIREL, L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. **Clinical Microbiology and Infection** v. 20, n. 9, p. 821–830 , 2014.

NOVOSAD, Shannon A. *et al.* Pathogens causing central-line-associated bloodstream infections in acute-care hospitals-United States, 2011-2017. **Infection control and hospital epidemiology** v. 41, n. 3, p. 313–319 , 1 mar. 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31915083/>>. Acesso em: 10 out. 2022.

NWOBODO, David Chinemerem *et al.* Antibiotic resistance: The challenges and some emerging strategies for tackling a global menace. **Journal of Clinical Laboratory Analysis** v. 00, p. e24655 , 10 ago. 2022. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jcla.24655>>. Acesso em: 23 ago. 2022.

OECD-FAO Agricultural Outlook 2022-2031. OECD-FAO Agricultural Outlook. , 29 jun. 2022. Disponível em: <https://www.oecd-ilibrary.org/agriculture-and-food/oecd-fao-agricultural-outlook-2022-2031_f1b0b29c-en>. Acesso em: 28 set. 2022.

OMS. *Estimating the burden of foodborne diseases*. Disponível em: <<https://www.who.int/activities/estimating-the-burden-of-foodborne-diseases>>. Acesso em: 29 set. 2022.

OMS. *WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed*. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>>. Acesso em: 13 out. 2022.

O'NEILL, Jim. Review on Antimicrobial Resistance. Antimicrobial Resistance(1) O'Neill, J. Review on Antimicrobial Resistance. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations, 2014. 2014, 4 (December).ce: Tackling a Crisis for the Health a. v. 4, n. December , 2014.

ONTONG, Julalak C. *et al.* Synergistic antibacterial effects of colistin in combination with aminoglycoside, carbapenems, cephalosporins, fluoroquinolones, tetracyclines, fosfomicin, and piperacillin on multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. **PLOS ONE** v. 16, n. 1, p. e0244673 , 1 jan. 2021. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0244673>>. Acesso em: 13 out. 2022.

PAGES, Jean Marie *et al.* Efflux Pump, the Masked Side of β -Lactam Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates. **PLoS ONE** v. 4, n. 3 , 12 mar. 2009. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1622100/>>. Acesso em: 30 out. 2022.

PANDEY, Neelanjana; CASCELLA, Marco. Beta Lactam Antibiotics. **Antibiotic Discovery and Development** v. 9781461414001, p. 79–117 , 26 set. 2022. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545311/>>. Acesso em: 28 out. 2022.9781461414001.

- PARTRIDGE, Sally R *et al.* Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. , 2009.
- PASCUAL, A; GARCÍA, I. Detection of the plasmid-mediated quinolone resistance determinant qnr among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* producing AmpC-type β -lactamase. n. September, p. 703–706 , 2003.
- PATERSON, D L; BRISBANE, Royal; DOI, Y. David L. Paterson and Yohei Doi 56. , 2017.
- PAULSEN, I T; BROWN, M H; SKURRAY, R A. Proton-dependent multidrug efflux systems. **Microbiological reviews** v. 60, n. 4, p. 575–608 , dez. 1996. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8987357/>>. Acesso em: 13 out. 2022.
- PEIRANO, Gisele; PITOUT, Johann D D. Extended - Spectrum β - Lactamase - Producing Enterobacteriaceae : Update on Molecular Epidemiology and Treatment Options. **Drugs** n. 0123456789 , 2019.
- PERUZY, M. F. *et al.* *Yersinia enterocolitica* detection in pork products: Evaluation of isolation protocols. **Food Microbiology** v. 92, p. 103593 , 1 dez. 2020. Acesso em: 30 out. 2022.
- PHAM, Thu D.M.; ZIORA, Zyta M.; BLASKOVICH, Mark A.T. Quinolone antibiotics. **MedChemComm** v. 10, n. 10, p. 1719 , 10 out. 2019. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC6836748/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3336748/)>. Acesso em: 28 out. 2022.
- PITOUT, Johann D D *et al.* Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. n. May, p. 52–59 , 2005.
- POIREL, Laurent; NORDMANN, Patrice. OXA-48-like carbapenemases : the phantom menace. n. April, p. 1597–1606 , 2012.3314521634.
- PONTRELLI, Sammy *et al.* *Escherichia coli* as a host for metabolic engineering. **Metabolic Engineering** n. February, p. 0–1 , 2018.
- Lee CM, Lai CC, Chiang HT, Lu MC, Wang LF, Tsai TL, Kang MY, Jan YN, Lo YT, Ko WC, Tseng SH, Hsueh PR. Presence of multidrug-resistant organisms in the residents and environments of long-term care facilities in Taiwan. **J Microbiol Immunol Infect.** 2017 Apr;50(2):133-144.
- PROCOP, Gary W. *et al.* **Koneman ' s Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology**. 7th. ed. [S.I.]: Wolters Kluwer, 2017. 375–515 p. .
- RAMIREZ, Maria S; TOLMASKY, Marcelo E. NIH Public Access. v. 13, n. 6, p. 151–171 , 2011.
- RAO, Mary *et al.* Isolation of third generation cephalosporin resistant Enterobacteriaceae from retail meats and detection of extended spectrum beta-

lactamase activity. **Journal of Microbiological Methods** v. 189, p. 106314 , 1 out. 2021. Acesso em: 30 out. 2022.

RESENDE, Juliana Alves *et al.* Multidrug-resistance and toxic metal tolerance of medically important bacteria isolated from an aquaculture system. **Microbes and environments** v. 27, n. 4, p. 449–455 , dez. 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22972388/>>. Acesso em: 28 out. 2022.

RILEY, Lee W. Extraintestinal Foodborne Pathogens. **Annual Review of Food Science and Technology** v. 11, p. 275–294 , 2020.

RIPOLLES-AVILA, C. *et al.* Evaluation of the microbiological contamination of food processing environments through implementing surface sensors in an iberian pork processing plant: An approach towards the control of *Listeria monocytogenes*. **Food Control** v. 99, p. 40–47 , maio 2019.

RIZVI, Sidra Ghazali; AHAMMAD, Shaikh Ziauddin. COVID-19 and antimicrobial resistance: A cross-study. **Science of The Total Environment** v. 807, p. 150873 , 10 fev. 2022.

ROBERTS, Marilyn C; SCHWARZ, Stefan. Tetracycline and Chloramphenicol Resistance Mechanisms. , 2017.

ROBERTS, Marilyn C.; SCHWARZ, Stefan. Tetracycline and Chloramphenicol Resistance Mechanisms. **Antimicrobial Drug Resistance**. Cham: Springer International Publishing, 2017b. p. 231–243.

ROSENBERG, Eugene; DELONG, Edward F; THOMPSON, Fabiano. **The Prokaryotes**. [S.l: s.n.], [S.d.].

SADIKU, Matthew N. O.; ASHAOLU, Tolulope J.; MUSA, Sarhan M. Food Contamination: A Primer. **International Journal of Advances in Scientific Research and Engineering (IJASRE)**, ISSN:2454-8006, DOI: 10.31695/IJASRE v. 6, n. 3, p. 01–07 , 9 abr. 2020. Disponível em: <<https://ijasre.net/index.php/ijasre/article/view/476>>. Acesso em: 26 set. 2022.

SANTOS-FERREIRA, Nanci *et al.* Cross-contamination of lettuce with *Campylobacter* spp. via cooking salt during handling raw poultry. **PloS one** v. 16, n. 5 , 1 maio 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34010301/>>. Acesso em: 3 out. 2022.

SARAKA, Daniel *et al.* *Yersinia enterocolitica*, a Neglected Cause of Human Enteric Infections in Côte d'Ivoire. **PLoS Neglected Tropical Diseases** v. 11, n. 1 , 12 jan. 2017. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC5230755/](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005230)>. Acesso em: 11 out. 2022.

SCHAUSS, Thorsten *et al.* Improved Detection of Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* in Input and Output Samples of German Biogas Plants by a Selective Pre-Enrichment Procedure. **PLOS ONE** v. 10, n. 3, p. e0119791 , 23 mar. 2015.

SCHUMACHER, Anja *et al.* Intracellular accumulation of linezolid in *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* and *Enterobacter aerogenes*: role of enhanced efflux pump activity and inactivation. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v. 59, n. 6, p. 1261–1264 , 1 jun. 2007. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jac/article/59/6/1261/709126>>. Acesso em: 30 out. 2022.

SCHWARZ, Stefan; KEHRENBERG, Corinna; CLOECKAERT, Axel. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. v. 28, p. 519–542 , 2004.

SHARMA, Jaishree *et al.* Prevalence, antimicrobial resistance and virulence genes characterization of nontyphoidal *Salmonella* isolated from retail chicken meat shops in Northern India. **Food Control** v. 102, p. 104–111 , 2019.

SHEU, Chau-chyun *et al.* Infections Caused by Enterobacteriaceae : An Update on Therapeutic Options. v. 10, n. January , 2019.

SHI, Xiaodong *et al.* In situ structure and assembly of the multidrug efflux pump AcrAB-TolC. **Nature Communications** 2019 10:1 v. 10, n. 1, p. 1–6 , 14 jun. 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41467-019-10512-6>>. Acesso em: 30 out. 2022.

SHRIVASTAVA, Saurabh Rambiharilal; SHRIVASTAVA, Prateek Saurabh; RAMASAMY, Jegadeesh. World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. **Journal of Medical Society** v. 32, n. 1, p. 76 , 1 jan. 2018. Disponível em: <<https://www.jmedsoc.org/article.asp?issn=0972-4958;year=2018;volume=32;issue=1;spage=76;epage=77;aui=Shrivastava>>. Acesso em: 13 out. 2022.

SILVA, Yone *et al.* REVIEW ARTICLE A Global Overview of β -lactam Resistance Genes in *Klebsiella pneumoniae* H. p. 22–34 , 2019.

SINGER, Andrew C.; KIRCHHELLE, Claas; ROBERTS, Adam P. Reinventing the antimicrobial pipeline in response to the global crisis of antimicrobial-resistant infections. **F1000Research** v. 8, p. 238 , 2019.

SINGH, Anuj *et al.* Effects of Nickel Supplementation on Antioxidant Status, Immune Characteristics, and Energy and Lipid Metabolism in Growing Cattle. **Biological Trace Element Research** v. 190, n. 1, p. 65–75 , 15 jul. 2019. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s12011-018-1524-6>>. Acesso em: 2 nov. 2022.

SINGH, Ram Lakhan; MONDAL, Sukanta. Current Issues in Food Safety With Reference to Human Health. **Food Safety and Human Health**. [S.l.]: Elsevier, 2019. p. 1–14.

SMITH, J. L.; FRATAMICO, P. M. **Escherichia coli and Other Enterobacteriaceae: Food Poisoning and Health Effects**. 1. ed. [S.l.]: Elsevier Ltd., 2015. 539–544 p.

- SNYDMAN, D R *et al.* National Survey on the Susceptibility of *Bacteroides fragilis* Group : Report and Analysis of Trends in the United States from 1997 to 2004 □. v. 51, n. 5, p. 1649–1655 , 2007.
- SUI, Qianwen *et al.* Fate of microbial pollutants and evolution of antibiotic resistance in three types of soil amended with swine slurry. **Environmental Pollution** p. 353–362 , 2019.
- SUN, Jian *et al.* Plasmid-encoded tet(X) genes that confer high-level tigecycline resistance in *Escherichia coli*. **Nature microbiology** v. 4, n. 9, p. 1457–1464 , 1 set. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31235960/>>. Acesso em: 13 out. 2022.
- TARÍN-PELLÓ, Antonio; SUAY-GARCÍA, Beatriz; PÉREZ-GRACIA, María Teresa. Antibiotic resistant bacteria: current situation and treatment options to accelerate the development of a new antimicrobial arsenal. **<https://doi.org/10.1080/14787210.2022.2078308>** , 2022. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14787210.2022.2078308>>. Acesso em: 23 ago. 2022.
- TELKE, Amar A. *et al.* soxRS induces colistin hetero-resistance in *Enterobacter asburiae* and *Enterobacter cloacae* by regulating the acrAB-toIC efflux pump. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v. 72, n. 10, p. 2715–2721 , 1 out. 2017. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jac/article/72/10/2715/4035777>>. Acesso em: 30 out. 2022.
- THAKALI, Astha; MACRAE, Jean D. A review of chemical and microbial contamination in food: What are the threats to a circular food system? **Environmental Research** v. 194, p. 110635 , 1 mar. 2021. Acesso em: 30 set. 2022.
- THEURETZBACHER, Ursula *et al.* Critical analysis of antibacterial agents in clinical development. **Nature Reviews Microbiology** **2020 18:5** v. 18, n. 5, p. 286–298 , 9 mar. 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41579-020-0340-0>>. Acesso em: 13 out. 2022.
- TORO, C. S. *et al.* Clinical isolate of a porinless *Salmonella typhi* resistant to high levels of chloramphenicol. **Antimicrobial agents and chemotherapy** v. 34, n. 9, p. 1715–1719 , 1990. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2285283/>>. Acesso em: 13 out. 2022.
- VAN, Tam T *et al.* crossm. n. June, p. 1–11 , 2019.
- VAN VLIET, Stephan; BURD, Nicholas A; VAN LOON, Luc JC. The Skeletal Muscle Anabolic Response to Plant- versus Animal-Based Protein Consumption. **The Journal of Nutrition** v. 145, n. 9, p. 1981–1991 , 1 set. 2015.
- VILA-COSTA, Maria *et al.* AC SC. **Water Research** , 2017.

VILLA, Laura *et al.* Genomics of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 512 Clone Highlights the Role of RamR and Ribosomal S10 Protein Mutations in Conferring Tigecycline Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 58, n. 3, p. 1707 , mar. 2014. Disponível em: </pmc/articles/PMC3957836/>. Acesso em: 13 out. 2022.

WACHINO, Jun-ichi; ARAKAWA, Yoshichika. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria : An update. **Drug Resistance Updates** v. 15, n. 3, p. 133–148 , 2012.

WANG, Fangkun; ZHANG, Wanjiang; NIU, Dongyan. Editorial: Foodborne Enterobacteriaceae of Animal Origin. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** v. 11 , 28 set. 2021. Disponível em: </pmc/articles/PMC8505891/>. Acesso em: 3 out. 2022.

WANG, Minggui *et al.* Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in Clinical Isolates of *Escherichia coli* from Shanghai , China. v. 47, n. 7, p. 2242–2248 , 2003.

WANG, Sibao *et al.* Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes. , 2012.

WHO. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: executive summary. **WHO Executive Summary** p. 257 , 2015. Disponível em: <www.who.int>. Acesso em: 25 set. 2022.

WILLERS, Clarissa *et al.* Efflux as a mechanism of antimicrobial drug resistance in clinical relevant microorganisms: the role of efflux inhibitors. **Expert Opinion on Therapeutic Targets** v. 21, n. 1, p. 23–36 , 2017.

WOZNIAK, Rachel A.F.; WALDOR, Matthew K. Integrative and conjugative elements: Mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. **Nature Reviews Microbiology** v. 8, n. 8, p. 552–563 , 2010.

YANG, Shengzhi *et al.* Presence of heavy metal resistance genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates and analysis of resistance gene structure in *E. coli* E308. **Journal of Global Antimicrobial Resistance** v. 21, p. 420–426 , 1 jun. 2020. Acesso em: 20 set. 2022.

YANG, Xiaojuan *et al.* Prevalence, abundance, serovars and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from retail raw poultry meat in China. **Science of The Total Environment** v. 713, p. 136385 , 15 abr. 2020. Acesso em: 30 out. 2022.

YANG, Yifan *et al.* Myofibrillar protein synthesis following ingestion of soy protein isolate at rest and after resistance exercise in elderly men. **Nutrition & Metabolism** v. 9, n. 1, p. 57 , 14 dez. 2012.

YAZDANKHAH, Siamak; RUDI, Knut; BERNHOFT, Aksel. Zinc and copper in animal feed – development of resistance and co-resistance to antimicrobial agents in bacteria of animal origin. , 2014.

YAZDANKHAH, Siamak; SKJERVE, Eystein; WASTESON, Yngvild. Antimicrobial resistance due to the content of potentially toxic metals in soil and fertilizing products. <https://doi.org/10.1080/16512235.2018.1548248> v. 29, n. 1, p. 1548248 , jan. 2018.

YENI, F. *et al.* Most Common Foodborne Pathogens and Mycotoxins on Fresh Produce: A Review of Recent Outbreaks. **Critical reviews in food science and nutrition** v. 56, n. 9, p. 1532–1544 , 3 jul. 2016.

YULISTIANI, R. *et al.* Prevalence of Antibiotic-resistance Enterobacteriaceae strains Isolated from Chicken Meat at Traditional Markets in Surabaya, Indonesia. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering** v. 193, n. 1, p. 012007 , 1 abr. 2017.

ZAYET, Souheil *et al.* Leclercia adecarboxylata as Emerging Pathogen in Human Infections: Clinical Features and Antimicrobial Susceptibility Testing. **Pathogens (Basel, Switzerland)** v. 10, n. 11 , 1 nov. 2021.

ZGHEIB, Rita *et al.* Buttiauxella massiliensis sp. nov., Isolated from a Human Bone Infection. **Current microbiology** v. 79, n. 2 , 1 fev. 2022.

ANEXO I

Artigo submetido para publicação:

Revista Antibiotics

Fator de Impacto: 5,22

Ranqueamento JRC: Q1: Pharmacology & Pharmacy | Q2: Infectious Diseases

Physiological characteristics of putative enterobacteria associated with meat and fish available in Southern Brazilian retail markets: antimicrobial susceptibility, toxic metal tolerance and expression of efflux pumps

Renata Barros Silva, Jéssica Andrade, Vanessa Cordeiro Dias, Jéssica Carla Sequeto, Nayara Felga Santos, Vânia Lúcia da Silva and Cláudio Galuppo Diniz *

Laboratory of Microbial Physiology and Molecular Genetics, Center for Studies in Microbiology, Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Federal University of Juiz de Fora, 36036-330, Brazil

* Correspondence: claudio.diniz@ufjf.br

Abstract: Multidrug-resistant (MDR) mesophilic facultatively anaerobic Gram-negative rods are a public health issue and their spread from animal source foods to humans is of concern worldwide. Hence, the aim of this study was, to examine the antibiotic susceptibility patterns and physiological aspects including tolerance to toxic metals and screening of efflux pumps expressing isolates among enterobacteria isolated from meat (chicken, beef, pork) and fish samples acquired from retail establishments in a Brazilian urban Centre of over 2,300,000 inhabitants. The study revealed that 62.9% of isolated bacteria were resistant to at least one antimicrobial, of which 32.3% and 8.1% were resistant to one and two of the tested drugs, respectively. Resistance of up to six antimicrobials was also observed (0.9%). Of the total 22.7% were classified as MDR. Chicken was the meat that harbored most MDR isolates and fish, the least. It was not possible to distinguish the different types of meat or fish considering resistance patterns. MDR isolates showed higher tolerance to mercury and cadmium salts and increased activity of efflux mechanisms compared to other susceptible or resistant strains. In One Health perspective occurrence of putative MDR bacteria in fresh meat and fish draws attention to the antimicrobial resistance phenomenon in open environment.

Keywords: meat; antimicrobials; resistance; *Enterobacteriaceae*; toxic metals.

Citation: To be added by editorial staff during production.

Academic Editor: Firstname Last-name

Received: date
Accepted: date
Published: date

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Animal-source foods (ASF) are an important component of the human diet and a significant source of high-quality nutrients, but their consumption is a key point of exposure to foodborne infections [1–4]. The Centers for Disease Control and Prevention (CDC) estimates that close to 48 million people in the USA are infected by foodborne pathogens annually, leading to 128,000 hospitalizations [5]. In addition to the social impact, the annual economic burdens are estimated to be of up to \$90 billion and together, these facts highlight the importance of preemptive measures to improve food safety as a whole [6].

Among the etiological agents of foodborne illnesses, enterobacteria species formerly characterized as *Enterobacteriaceae*, now included in *Enterobacteriaceae*, *Morganeliaceae* and *Yersiniaceae* families (order *Enterobacterales*) are some of the most frequent [3,7–9]. Species notably recognized as foodborne pathogens include *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* among others. They are commonly associated to gastrointestinal distress and the infections are in general self-limiting. Nonetheless, these infections may evolve to systemic disease and death might be an outcome particularly in vulnerable groups, such as the elderly, children, pregnant women and

the immunocompromised [10]. Extraintestinal infections can also occur, including blood stream infections, meningitis, post-infectious reactive arthritis, spleen infection, chronic kidney disease, hemolytic uremic syndrome, and osteomyelitis [8].

Against this background, infections caused by antimicrobial resistant (AMR) enterobacteria have significant clinical and economic impacts, and their presence in meat constitutes a major threat to public health. Several accounts of multidrug resistance (MDR) among this group in different types of meat have been recorded all over the world, indicating the issue is generalized [1,2,11]. Resistance to antibiotics is a natural phenomenon, but the misuse and exaggerated application of these drugs in human health and animal husbandry have led to the spread of AMR bacteria even in the food chain [12]. Moreover, there is growing evidence of co-selection of AMR in bacteria exposed to biocides and toxic metals used by the agri-food industry [13]. Once in the food matrix or human gastrointestinal tract, AMR bacteria could transfer genetic resistance determinants among themselves via genetic mobile elements, which aggravates even further the matter of food safety [14,15]. For this reason, it is of utmost importance to tackle the issue of antimicrobial resistance with a One Health approach, acknowledging the inextricable nature of human, animal and environmental health [16].

Controlling the spread of enterobacteria found in meats retailed domestically and internationally is essential for reducing the economic and social impact of the diseases caused by them and improving food security for the population. Considering Brazil's position as one of the largest meat exporters worldwide, vigilance studies are crucial due to the implications of spread of *Enterobacteriales* members for public health and the potential for dissemination of MDR strains. This study aims to analyze the physiological aspects and antibiotic susceptibility patterns of representative enterobacteria isolated from chicken, beef, pork and fish available in retail market as low-processed food of animal origin.

2. Results

2.1 Bacterial isolation and total viable counts

Overall, 436 bacteria samples were isolated and presumptively characterized as enterobacteria. Gram-negative non-enterobacteria and Gram-positive bacteria were stored under -80°C for further studies. Regarding the total bacteria count in the evaluated meat and fish samples, mean viable counts (\log_{10} CFU/g) were 5.92 BA, 4.97 in EMB and 4.75 in MSA. Detailed viable counts are presented in table 1. The bacterial quantification showed no statistically significant differences between the means obtained from the total count of microorganisms, Gram-positive cocci counts and Gram-negative rods counts derived from poultry, beef and pork samples. However, the same didn't happen for counts obtained from fish samples, where the mean of Gram-positive cocci counts was significantly lower than the other samples ($p < 0.05$).

Table 1. Mean Bacterial viable counts (\log_{10} UFC/g) in meat and beef samples considering different selective culture for Gram-positive and Gram-negative human putative bacteria.

| Source | | BA ¹ | EMBA ² | MSA ³ |
|--------------------------------------|---------|------------------|-------------------|------------------|
| Meat | Beef | 5.69 | 4.94 | 5.00 |
| | Pork | 5.82 | 4.95 | 5.28 |
| | Chicken | 6.04 | 4.85 | 4.97 |
| Fish | | 6.14 | 5.16 | 3.77* |
| Total (mean count; sd ⁴) | | 5.92; ± 0.17 | 4.97; ± 0.11 | 4.75; ± 0.58 |

¹BA = Blood Agar – culture for total mesophilic facultatively anaerobic bacteria; ²EMBA = Eosin Methylene Blue Agar – selective culture for Gram-negative rods; ³MSA = Manitol Salt Agar -

selective culture for Gram-positive cocci; ⁴sd = standard deviation. * $p < 0.05$ when compared the mean values to the other samples in the same selective medium.

2.2 Antimicrobial susceptibility patterns

With exception for gentamicin and meropenem, resistance to all tested antimicrobials was observed. Beta-lactam drugs were the less effective with resistance rates observed of 39.1% against cefazolin, 30.5% against ampicillin, followed by resistance rates of 18.1% and 17.7% against amoxicillin/clavulanic acid and ceftazidime, respectively (Table 2). In lower rates, resistance was also observed against tetracycline (6.3%), chloramphenicol (3.3%), sulphazotrim (3.0%), ciprofloxacin (1.6%), aztreonam (1.4%), levofloxacin (1.1%) ceftazidime (1.2%), ceftriaxone (0.5%), cefepime (0.5%) and amikacin (0.2%).

Although resistance to chloramphenicol, sulphazotrim and tetracycline was observed for bacteria isolates from all types of meat and fish, it was more frequent in representative bacteria from pork meat (Table 2). The same is also true for ampicillin and amoxicillin/clavulanic acid in isolates derived from chicken. Amikacin was not effective in one isolate derived from beef, and aztreonam in some isolates derived from chicken and fish. Resistance to ceftriaxone and cefepime was observed only among bacteria isolated from fish samples, albeit their resistance rates for the other tested drugs were generally lower compared to isolates from other meats (Table 2).

Table 2. Antimicrobial susceptibility patterns (%) of mesophilic facultatively anaerobic Gram-negative rods presumptively characterized as enterobacteria isolated from meat and fish samples.

| Antimicrobial- Drugs | Bacterial source | | | | | | | | Total (n=436) | |
|-------------------------|------------------|-----|-----------------|-----|-------------------|-----|-----------------|-----|------------------|------------|
| | Beef (n=91) | | Pork (n=112) | | Chicken (n=91) | | Fish (n=136) | | R | I |
| | R | I | R | I | R | I | R | I | | |
| AMP | 31.9 | 6.5 | 29.5 | 5.4 | 45.0 | 11 | 20.6 | 5.9 | 30.5 | 6.0 |
| ATM | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 3.3 | 0.0 | 2.21 | 0.0 | 1.4 | 0.0 |
| AMC | 22.0 | 3.2 | 17.9 | 5.4 | 26.3 | 6.5 | 10.3 | 2.2 | 18.1 | 3.0 |
| AMI | 1.1 | 1.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.2 | 0.0 |
| GEN | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| CIP | 1.1 | 0.0 | 3.6 | 1.8 | 2.2 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.6 | 0.5 |
| LEV | 1.1 | 0.0 | 1.8 | 0.0 | 2.2 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.1 | 0.0 |
| CFZ | 46.2 | 0.0 | 33.5 | 0.0 | 46.1 | 0.0 | 34.5 | 0.0 | 39.1 | 0.0 |
| CFO | 23.1 | 4.4 | 17.0 | 2.7 | 23.0 | 3.2 | 11.0 | 2.9 | 17.7 | 3.3 |
| CAZ | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 3.3 | 1.0 | 1.5 | 0.7 | 1.2 | 0.2 |
| CRO | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.5 | 0.0 | 0.5 | 0.0 |
| CPM | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.5 | 0.0 | 0.5 | 0.0 |
| CLO | 2.2 | 0.0 | 5.4 | 2.7 | 4.4 | 0.0 | 0.7 | 0.0 | 3.3 | 0.5 |
| MPM | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| SUT | 2.2 | 0.0 | 5.4 | 0.0 | 2.2 | 0.0 | 2.2 | 0.0 | 3.0 | 0.0 |
| TET | 6.6 | 0.0 | 8.9 | 1.8 | 5.5 | 2.2 | 4.4 | 2.2 | 6.3 | 1.6 |

R = % of resistance; I = intermediate resistance; AMP: ampicillin; ATM: aztreonam; AMC: amoxicillin / clavulanic acid; AMI: amikacin; GEN: gentamicin; CIP: ciprofloxacin; LEV: levofloxacin; CFZ: cefazolin; CFO: ceftazidime; CASE: ceftazidime; CRO: ceftriaxone; CPM: cefepime; CLO: chloramphenicol; MPM: meropenem; SUT: sulfazotrim; TET: tetracycline.

Out of all 436 isolates, 271 (62.9%) were resistant to at least one of the antimicrobial drugs, 32.3% of which were resistant to only one and 8.1% to two. According to the definition of multi-drug-resistance proposed by Magiorakos et al [17]. For the formerly *Enterobacteriaceae* (2012), it was found that isolates resistant to 3 or more of the tested antimicrobials (22.7%) could be considered MDR and derived from high-risk sources of contamination. Among this group, 7.9% of the isolates were resistant to three drugs, 11.4% to four, 2.3% to five and 0.9% to six of the tested antimicrobials (Table 3). One isolate exhibited the resistance phenotype ATM-CAZ (0.2%) and was considered MDR by classical definition.

Isolates resistant to at least one of the tested antimicrobials represented 72.6% of the bacteria isolates from beef samples, 71.5% of the ones from chicken, 67.8% of the ones from pork and 48.4% of the ones from fish. Chicken was the meat from which fewer isolates resistant to one drug (26.4%) were obtained when compared to other meats and fish, however it was the one that harbored the most considered multiresistant bacteria (34.3%). Unlike isolates from chicken, beef and pork that presented MDR to up to 6 antimicrobials, resistance to more than 5 drugs was not observed for fish isolated bacteria, source also related to the least isolates considered MDR (11.7%) (Table 3).

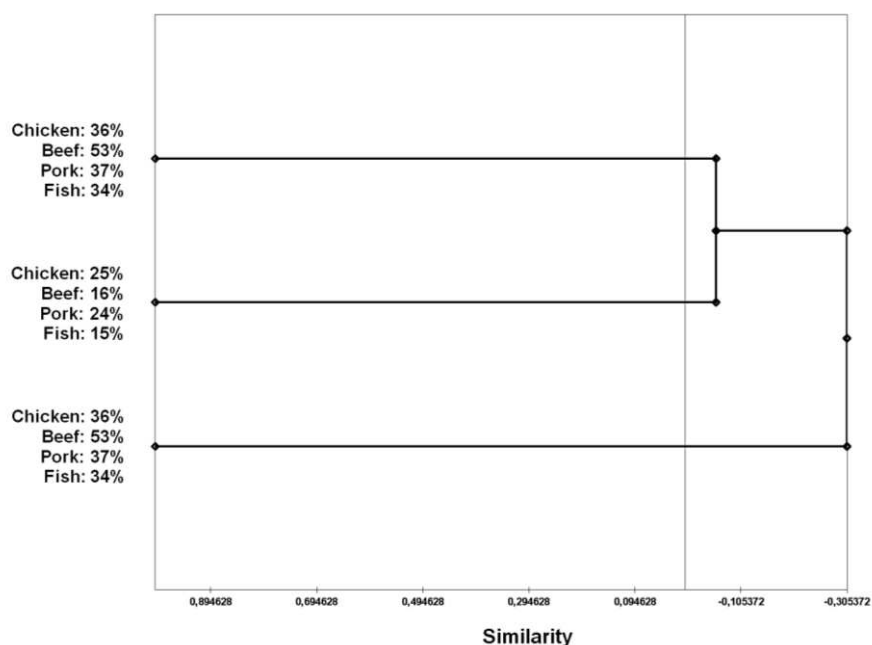
Table 3. Distribution of simultaneous antimicrobial-resistance phenotype (different drug pharmacological classes) among mesophilic facultatively anaerobic Gram-negative rods isolated from meat and fish samples.

| No. of resistance to drugs ^a | % of resistant isolates according to bacteria source | | | | Total (%) |
|---|--|------|---------|------------------------|-----------|
| | Beef | Pork | Chicken | Fish | |
| 1 | 41.8 | 33.0 | 26.4 | 30.1 | 32.3 |
| 2 | 9.9 | 9.8 | 11.0 | 6.6 | 8.1 |
| 3 | 5.5 | 10.7 | 8.8 | 4.4 | 7.9 |
| 4 | 13.2 | 9.8 | 20.9 | 5.1 | 11.4 |
| 5 | 1.1 | 2.7 | 3.3 | 2.2 | 2.3 |
| 6 | 1.1 | 1.8 | 1.1 | <i>nd</i> ^c | 0.9 |
| % of MDR ^b | 20.9 | 25.0 | 34.3 | 11.7 | 22.7 |

^aAntimicrobial resistance phenotypes simultaneously observed for a single bacteria isolate; ^bMDR = multidrug-resistant bacteria according to classification criteria proposed by Magiorakos et al. (2012); ^cdata not detected.

From the antimicrobial susceptibility patterns the hierarchical clustering analysis by UPGMA showed that the 436 bacteria isolates were divided into 3 distinct groups: A1, A2 and A3. Group A1 (n=171) is comprised of 36% of isolates derived from chicken samples, 53% from beef samples, 37% from pork samples and 34% from fish samples. A2 (n=84) is a group with 25% of the isolates from chicken samples, 16% from beef, 24% from pork and 15% from fish. In group A3 (n=181) it is observed 39% of isolates related to chicken samples, 31% related to beef samples, 39% related to pork samples and 51% related to fish samples (Figure 1).

Figure 1. Similarity phenogram from hierarchical clustering analysis by UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) with bootstrap of 1000X based on antimicrobial resistance or antimicrobial susceptibility of mesophilic facultatively anaerobic Gram-negative rods isolated from meat and fish samples.



2.3 Tolerance to toxic metals

The toxic metal tolerance patterns for the isolated bacteria are presented in terms of MIC₅₀, MIC₉₀ and the range of MICs for the isolated bacteria previously grouped accordingly to the number of antimicrobial classes for which they showed to be resistant: MDR (resistance to more than 3 classes), RES (resistance to 1-2 classes), SUS (no resistance recorded). The observed mercury tolerance was higher for MDR (MIC₉₀ = 256 µg/mL) if compared to RES and SUS groups (MIC₉₀ = 128 µg/mL and MIC₉₀ = 64 µg/mL, respectively). The same was observed for cadmium tolerance, wherein MIC₉₀ for the MDR group was 1,024 µg/mL, and 512 µg/mL for both the RES and SUS groups. The isolates from all three groups presented high tolerance to copper, nickel, zinc, and chromium, with a MIC₅₀ of ≥1,024 µg/mL (Table 4).

Table 4. Toxic metal tolerance patterns (µg/mL) of mesophilic aerobe and facultatively anaerobic Gram-negative rods presumptively characterized as enterobacteria isolated from meat and fish samples.

| Metal | MDR | | | RES | | | SUS | | |
|-------|-------------------|-------------------|------------|-------------------|-------------------|-----------|-------------------|-------------------|-----------|
| | MIC ₅₀ | MIC ₉₀ | Range | MIC ₅₀ | MIC ₉₀ | Range | MIC ₅₀ | MIC ₉₀ | Range |
| Ni | 1024 | >1024 | 1024->1024 | >1024 | >1024 | 512->1024 | 1024 | >1024 | 256->1024 |
| Zn | >1024 | >1024 | 512->1024 | >1024 | >1024 | 128->1024 | 1024 | >1024 | 256->1024 |
| Hg | 32 | 256 | 2 - 256 | 16 | 128 | 2 - 256 | 32 | 64 | 8 - 256 |
| Cd | 512 | 1024 | 128-1024 | 256 | 512 | 128-512 | 256 | 512 | 32-1024 |
| Cr | >1024 | >1024 | >1024 | >1024 | >1024 | >1024 | >1024 | >1024 | >1024 |
| Cu | >1024 | >1024 | >1024 | >1024 | >1024 | >1024 | 1024 | 1024 | 256-1024 |

Ni = Nickel (NiCl₂.6H₂O); Zn = Zinc (ZnSO₄.7H₂O); Hg = Mercury (HgCl₂); Cd = Cadmium (CdCl₂.H₂O); Cr = Chromium (Cr(NO₃)₃); Cu = Copper (CuSO₄); MDR = bacteria group for which resistance was observed to more than 3 antimicrobial classes; RES = bacteria group for which

resistance was observed to 1-2 antimicrobial classes; SUS = bacteria group for which antimicrobial resistance was not recorded.

2.4 Phenotypic expression of efflux mechanisms

The expression of efflux mechanisms was determined by their ability to pump ethidium bromide out of the cell and, therefore, not emit fluorescence when under UV lighting. Similarly to the previously described for toxic metal tolerance, expression of efflux mechanisms is presented in terms of minimal concentration for fluorescence up to 50% of the tested samples (MFC₅₀), up to 90% of the tested samples (MFC₉₀) and range of recorded MFC. Besides, the isolated bacteria were grouped accordingly to the number of antimicrobial classes for which they showed to be resistant: MDR (resistance to more than 3 classes), RES (resistance to 1-2 classes), SUS (no resistance recorded). Thus, MFC₉₀ was 2.5 µg/mL for the MDR group and 2 µg/mL for the RES and SUS groups. In general, although the results may indicate similar efflux activity for all groups of enterobacteria evaluated, MFC₅₀ as well as the range in the EtBr concentration which caused any bacterial sample to emit fluorescence were lower in NS or SUS groups (Table 5).

Table 5. Expression of efflux mechanisms (µg/mL) in terms of bacterial ability to pump ethidium bromide (EtBr) out of the cell and do not emit fluorescence when under UV lighting among mesophilic aerobic and facultatively anaerobic Gram-negative rods presumptively characterized as enterobacteria isolated from meat and fish samples.

| EtBr efflux measure ^a | MDR | RES | SUS |
|----------------------------------|-----------|-----------|-----------|
| MFC ₅₀ | 2.0 | 1.5 | 1.5 |
| MFC ₉₀ | 2.5 | 2.0 | 2.0 |
| MFC Range | 1.0 – 2.5 | 1.0 – 2.5 | 0.5 – 2.5 |

^aMFC = minimal fluorescence concentration, up to 50% of the tested samples (MFC₅₀), up to 90% of the tested samples (MFC₉₀) and range of recorded MFC. MDR = bacteria group for which resistance was observed to more than 3 antimicrobial classes; RES = bacteria group for which resistance was observed to 1-2 antimicrobial classes; SUS = bacteria group for which antimicrobial resistance was not recorded.

3. Discussion

With the increasing consumption of ASF worldwide, meeting microbiological safety standards is important for producers, retailers, and consumers alike. According to the Brazilian legislation, the maximum count for mesophilic aerobic bacteria is 10⁶ CFU/g for poultry, beef and pork, which indicates microbial counts observed in this study meet the recommended values [18]. Even though the European Union has no similar legislation for poultry and fish, the means for mesophilic aerobes encountered here are still considerable. By the other hand, studies have reported that the lack of proper hygiene during meat handling by workers is a major source of Gram-positive cocci contamination for these products [19-21]. Taking that fish fillets (as those sampled) are sold pre-packaged by fishmongers and therefore would suffer less handling than poultry, pork and beef, which are kept open in refrigerated displays in butcher shops, the findings regarding Gram-positive counts in this study would corroborate the literature once these bacteria group counts were lower in fish samples.

According to the presumptive biochemical identification proposed by Procop et al., the assessment of glucose fermentation, sucrose and/or lactose fermentation, CO₂ production during glucose fermentation and hydrogen sulfide production allow for an estimate of enterobacteria [22]. This estimate enabled association between relevant genera for human health and of environmental significance. It is possible that the proximity of the two groups in the food matrix could facilitate the transference of antimicrobial resistance molecular markers from one another. Genus such as *Lelliottia*, typically non-

pathogenic bacteria found mainly in water and plants, have been known to harbor resistance genes of likely natural origin, and these could be transferred to other species of mesophilic aerobe and facultatively anaerobic Gram-negative rods [23,24]. The observed would, thus, be implicated on the emergence of new resistant pathogenic strains.

Resistance to cefazolin was the most frequent worrisome phenotype observed, followed by ampicillin, found in 39.1% and 30.5% of the isolates respectively. Although high, these rates of resistance are still lower compared to similar studies in India, China, Ghana and Uganda [2,25-27]. The use of penicillins and cephalosporins as growth promoting agents is not allowed in animal husbandry in Brazil, which indicates that the selective pressure responsible for the prevalence of this phenotype would be derived from a different source, especially considering the one health approach. As for other classes of antimicrobial groups, the results are comparable to studies conducted in Spain, Indonesia and Nigeria [28-30].

Nonetheless, the meat and fish samples, as those evaluated in this study are a potential source for the spread of AMR microorganisms, with some isolates being simultaneously resistant to up to six of the antimicrobials tested. The classification proposal for antimicrobial resistance in MDR, extensively drug-resistant (XDR) and pan drug-resistant (PDR) by Magiorakos et al., are widely recognized and scientifically accepted. Our results indicate that 22.7% of the isolated microorganisms in the present study express a phenotype compatible to multiple resistance to antimicrobials of clinical relevance [17]. One isolate showed resistance to only aztreonam and ceftazidime, and despite not fitting in the mentioned classification for MDR, it could be interpreted as being able to produce extended spectrum beta-lactamases or AMPc and be considered MDR by classical definition (Supplementary Table S1). It is worth noting that not all the antimicrobial categories proposed by the mentioned authors were tested, hindering the identification of XDR and PDR strains. Also, while species identification was not relevant and one of the goals in the present study, the resistance to antimicrobials found could be associated to the existence of intrinsically resistant bacterial species (e.g., *Citrobacter freundii*, *Klebsiella aerogenes*, and others) [31]. This does not exempt the fact that, in spite of the possibility of being tied to intrinsic resistance, molecular markers conferring resistance to the antibiotics tested are still present and could be transferred through mobile genetic elements.

The antimicrobial susceptibility patterns observed for the bacteria isolated from each of the different types of meat were very similar, wherein resistance to ampicillin, amoxicillin/clavulanic acid, ceftiofur and cefazolin was the most prevalent. Especially in the one health perspective, the patterns found may suggest that the indiscriminate use of these drug classes, whether in human or veterinary medicine, associated with the use and disposal of xenobiotics in the environment could be related to a strong selective pressure in the different settings of animal husbandry [16]. There is a link between these settings and the aquatic ecosystem where fish farming occurs as well, with studies showing water has an important role in connecting environments [32]. Hence, aquatic ecosystems play an important part in this scenario, allowing for an environmental network that contributes to the movement of antimicrobial resistance molecular markers and determinants. There is evidence that environmental, human and animal bacteria can harbor similar types of gene sequences and/or identical plasmid-borne resistance genes, even other mobile genome structures. These findings altogether, reinforce that environmental drug-resistant bacteria and their molecular markers of resistance are potentially transmitted to humans and their associated microbiota [33,34].

Adding to this scenario, it is also important to point out the common practice of storing unpacked pork, beef and poultry in the same refrigerated displays in Brazilian butcher shops, as well as using the same equipment to process the meats (cutting boards, knives, grinders and others). This might be, by the other hand associated to eventual cross-contamination that may result in the similarities between the microbiota found in each type of meat. While that may be the case, it was clear that poultry was the

most risk-associated type of meat, harboring the highest amounts of MDR *Enterobacteriaceae* (34.3%). This suggestion is in accordance with the findings of Skocková et al., wherein upon an analysis of *Escherichia coli* isolates derived from poultry, pork, beef, and venison, it was also concluded that poultry was the most risk-associated meat in terms of antibiotic resistance [35]. Anyway, to assess if resistance to certain types of antimicrobials was characteristic to one or more of the meats, we investigated whether individuals could be grouped according to their susceptibility patterns with a hierarchical clustering approach. Due to high homogeneity between the three resulting groups (A1, A2 and A3), it was not possible to separate the meats considering said susceptibility patterns. This indicates that resistance to the drugs tested in the present study is so widespread that the chain productions seem to be intrinsically related to the one health discussions and the role of the surrounding ecosystems in the widespread of antimicrobial resistance, especially soil and water.

The occurrence of metal tolerant foodborne pathogens has been reported by multiple studies. It is accepted that antimicrobial co-resistance and cross-resistance phenomena (resistance borne by adjacent genetic markers in mobile genome such as integrons and multiple-resistance physiological mechanisms related to one genetic marker, respectively) may be screened by toxic metal tolerance [36-38]. Nonetheless, the lack of technical standards for such experimental designs hinders data comparison. In order to bypass this limitation, the present toxic metal tolerance assays were performed according to the agar dilution technique as recommended by the CLSI and already published in previous studies by this paper's author's research group [31,39,40].

The isolates derived from all types of meat studied exhibited high tolerance to the toxic metals zinc (Zn), nickel (Ni), chromium (Cr) and copper (Cu). Animal husbandry and agriculture are among the greatest sources of environmental toxic metal contamination, which can also be carried throughout the food production chain [41]. It is possible that high selective pressure occurs in the environment due to the mentioned metals' build-up, which would result in the observed results. Indeed, Cu and Zn are frequently used in animal husbandry as antiseptics, feed supplements and in the prevention of piglet diarrhea [42]. The supplementation of Cr in multiple species is also common practice and has demonstrated a wide variety of positive physiological effects, such as improvements in fertility, fecundity, and stress [43]. Lastly, Ni is also supplemented in animal feed and had been shown to improve the performance of growing cattle by increasing urease activity [44].

Studies have also shown that the occurrence of MDR is positively related to tolerance to toxic metals in microorganisms [45]. Indeed, in the present study it was found that MIC₉₀ for mercury and cadmium in MDR were higher compared to those of the RES and SUS groups. As stated before, molecular markers such as those conferring tolerance to mercury are often found in transposons and integrons alongside antimicrobial resistance genes in Gram-negative bacteria [46,47]. Moreover, tolerance to cadmium is usually related to efflux mechanisms, which also plays an important part in the resistance by MDR microorganisms [48].

Bacterial efflux systems pose complex therapeutical challenges regarding resistance to antibiotics due to their amount and diversity [49]. These systems have frequently overlapping substrate recognition, and a single pump may be related to the expelling of several biocides, toxic ions and antibiotics [50]. Upon phenotypic expression analysis of efflux pumps in the bacteria isolates in this study, we observed high efflux activity for all groups tested, being the activity for the MDR group slightly higher. This could be related to the fact that the efflux pumps being expressed may not be linked only to antibiotic resistance, but rather to the extrusion of other compounds and ions. It is also worth noting that we only tested representatives of clinically relevant antibiotic classes in this study, and it is possible that the isolates present in the non-susceptible and susceptible groups could be resistant to other representatives of said classes. Further studies

are needed so as to better characterize the nature of the efflux mechanisms expressed and the impact of their expression in the environment.

4. Materials and Methods

4.1 Sample collection and microbiological quantification

Between 2018 and 2020, samples of beef knuckle (n=21), chicken breast (n=21), pork shank (n=21) and fish fillet (tilapia, n=21) were randomly acquired in 23 retail establishments located in Juiz de Fora (Southeast Brazil). Portions of 25g were aseptically weighed, grounded, and homogenized in 225 ml of sterile buffered peptone water for 1 minute. Serial dilutions of the homogenate until 10^{-4} were performed and 0.1 ml of each dilution was spread in Petri dishes containing the following culture media: Blood Agar (BA) (Kasvi, Brazil) for total viable counts of mesophilic aerobic bacteria colony forming units (CFUs); Eosin Methylene Blue Agar (EMBA) (Kasvi, Brazil) for selective count of Gram-negative rods and Manitol Salt Agar (MSA) (Kasvi, Brazil) for selective count of Staphylococci. All plates were incubated at 37°C for 24 hours and counting was performed in plates containing between 30 and 300 colonies. After that, 3 to 5 representative colonies of each morphotype present in the plates were selected and cultivated in Brain-Heart Infusion Agar (BHI) (Kasvi, Brazil) for further analysis regarding their morphotinctorial aspects using Gram staining, and then stored at -20°C.

4.2 Characterization of enterobacteria and antimicrobial susceptibility patterns

Enterobacteria, which included representative members of *Enterobacteriaceae*, *Morganellaceae* and *Yersiniaceae* families, were screened among Gram-negative rods based on their ability to ferment glucose, sucrose and/or lactose, as well as gas production which included differential H₂S [22]. Antimicrobial susceptibility testing of the isolated enterobacteria was conducted by the disc diffusion technique using Mueller-Hinton Agar (Kasvi, Brazil) and antimicrobial impregnated discs (DME – Brazil) [51]. The tested antimicrobial agents were: ampicillin (AMP, 10 µg), aztreonam (ATM, 30 µg), amoxicillin/clavulanic acid (AMC, 30 µg), amikacin (AMI, 30 µg), gentamicin (GEN, 10 µg), ciprofloxacin (CIP, 5 µg), levofloxacin (LEV, 5 µg), cefazolin (CFZ, 30 µg), cefoxitin (CFO, 30 µg), ceftazidime (CAZ, 30 µg), ceftriaxone (CRO, 30 µg), cefepime (CPM, 30 µg), chloramphenicol (CLO, 30 µg), meropenem (MPM, 10 µg), sulfamethoxazole/trimethoprim (SUT, 25 µg) and tetracycline (TET, 30 µg). After incubation at 37°C for 24 hours, the zones of growth inhibition were measured, and the values compared to the 29th edition of the CLSI M100 protocol for determining of antimicrobial susceptibility patterns [31]. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* ATCC 35218, and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 were used for quality control, according to guidelines [31]. Considering the antimicrobial resistance patterns, the isolated bacteria were clustered as multidrug-resistant (MDR) according to the criteria proposed by Magiorakos et al. (2012). Further it was used to determine which isolates could be considered multidrug-resistant and evaluate the sample's contaminating source level of risk [17].

In an epidemiological typing approach to better characterize the relationships between bacteria source and antimicrobial susceptibility patterns, a binary matrix of resistance or susceptibility to the tested drugs was drawn to enable a similarity phenogram based on hierarchical clustering analysis by UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean) with bootstrap of 1000X.

4.3 Tolerance to toxic metals

The minimum inhibitory concentration (MIC) for toxic metals was determined through the agar dilution method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines for antimicrobial drugs [31]. However, since there are no standards for toxic metal susceptibility, the results were classified as high or low tolerance to toxic metals.

The selected metals were chosen according to their environmental availability and biological relevance: nickel ($\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Vetec, Brasil), zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Vetec, Brasil), mercury (HgCl_2) (Vetec, Brasil), cadmium ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) (Vetec, Brasil), chromium ($\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$) (Vetec, Brasil) and copper (CuSO_4) (Vetec, Brasil). Sterile solutions of the toxic metals were added to Mueller-Hinton Agar plates to achieve final concentrations ranging from 0.6 to 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$. These plates were inoculated using a multiple inoculator and incubated at 37°C for 24 hours away from light. The assay was performed in duplicate and plates containing pure Mueller-Hinton Agar were used as control.

4.4 Phenotypic expression of efflux mechanisms

The expression of efflux mechanisms was assessed through the Cartwheel method with modifications [52]. Suspensions corresponding to 0.5 in the McFarland scale were prepared with each of the isolates in the study, corresponding to 1.5×10^8 CFU/mL. Inoculation was carried out with a multiple inoculator in Mueller-Hinton Agar plates containing varying concentrations of Ethidium Bromide (Promega, USA) (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), which were later incubated at 37°C for 24 hours away from light. Afterwards, results were analyzed using UV light in a transillumination system. The assay was performed in duplicate and plates containing pure Mueller-Hinton Agar were used as control.

4.5 Statistical analysis

During data analysis, the Dixon Test was used to exclude the outliers present in each group so as to avoid overestimation of means. Statistical significance was calculated using the Kruskal-Wallis multiple comparisons test ($p = 0.05$) and the Steel-Dwass Post-Hoc test was applied for comparison of individual means.

5. Conclusions

Overall, the present study offers insights on the occurrence of MDR and the antimicrobial resistance levels of mesophilic aerobe and facultatively anaerobic Gram-negative rods presumptively characterized as enterobacteria in the most commonly consumed types of meat and fish in Brazil. Even though high levels of resistance to the antimicrobial drugs tested weren't found in general, resistance to drugs of clinical importance, was still present, which raises concerns regarding the safety for consumption of the products. Poultry proved to be the highest risk-associated type of meat among those tested, highlighting the fact that information regarding the microbiota of retail meats is of utmost importance so as to develop a sustainable One Health strategy to tackle the issue of AMR. The fact that meats can be a source of MDR microorganisms constitutes a serious public health and environmental issue.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1, Figure S1: title; Table S1: title; Video S1: title.

Author Contributions: Conceptualization, C.G.D, V.L.S.; methodology, C.G.D, V.L.S, and V.C.D.; formal analysis, R.B.S and J.A.; investigation, R.B.S, J.A., J.S. and N.F.S; resources, C.G.D., V.L.S.; data curation, C.G.D, V.L.S, and V.C.D.; writing—original draft preparation, R.B.S., C.G.D; writing—review and editing, R.B.S., C.G.D, V.L.S, and V.C.D.; supervision, C.G.D, V.L.S, and V.C.D; project administration, C.G.D.; funding acquisition, C.G.D, V.L.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Please add: This research was funded by National Council for Scientific Development (CNPq), Research Support Foundation of the State of Minas Gerais (FAPEMIG).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors are grateful to the Integrated Research Laboratory, PPGCBIO. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Kulasooriya, G.D.B.N.; Amarasiri, M.K.U.T.; Abeykoon, A.M.H.; Kalupahana, R.S. Salmonella, Campylobacter and Escherichia coli in Raw Chicken Meat, Chicken Products and Cooked Chicken in Retail Markets in Kandy, Sri Lanka. *Sri Lanka Vet J* 2019, 66, 19–26.
- Sharma, J.; Kumar, D.; Hussain, S.; Pathak, A.; Shukla, M.; Prasanna Kumar, V.; Anisha, P.N.; Rautela, R.; Upadhyay, A.K.; Singh, S.P. Prevalence, Antimicrobial Resistance and Virulence Genes Characterization of Nontyphoidal Salmonella Isolated from Retail Chicken Meat Shops in Northern India. *Food Control* 2019, 102, 104–111.
- Heredia, N.; García, S. Animals as Sources of Food-Borne Pathogens: A Review. *Animal Nutrition* 2018, 4, 250–255.
- Yu, H.; Elbediwi, M.; Zhou, X.; Shuai, H.; Lou, X.; Wang, H.; Li, Y.; Yue, M. Epidemiological and Genomic Characterization of Campylobacter Jejuni Isolates from a Foodborne Outbreak at Hangzhou, China. *Int J Mol Sci* 2020, 21.
- CDC Burden of Foodborne Illnesses in the United States | Estimates of Foodborne Illness | CDC Available online: <https://www.cdc.gov/foodborneburden/burden/index.html> (accessed on 20 September 2022).
- Scharff, R.L. The Economic Burden of Foodborne Illness in the United States. In *Food Safety Economics*; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2018; pp. 123–142.
- Hindermann, D.; Gopinath, G.; Chase, H.; Negrete, F.; Althaus, D.; Zurfluh, K.; Tall, B.D.; Stephan, R.; Nüesch-Inderbinen, M. Salmonella Enterica Serovar Infantis from Food and Human Infections, Switzerland, 2010–2015: Poultry-Related Multidrug Resistant Clones and an Emerging ESBL Producing Clonal Lineage. *Front Microbiol* 2017, 8, 1–9.
- Riley, L.W. Extraintestinal Foodborne Pathogens. *Annu Rev Food Sci Technol* 2020, 11, 275–294.
- Adeolu, M.; Alnajjar, S.; Naushad, S.; Gupta, R.S. Genome-Based Phylogeny and Taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: Proposal for Enterobacteriales Ord. Nov. Divided into the Families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae Fam. Nov., Pectobacteriaceae Fam. Nov., Yersiniaceae Fam. Nov., Hafniaceae Fam. Nov., Morganellaceae Fam. Nov., and Budviciaceae Fam. Nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016, 66, 5575–5599.
- Jackson, P.; Meah, A. Re-Assessing Vulnerability to Foodborne Illness: Pathways and Practices. *Crit Public Health* 2018, 28, 81–93.
- Randall, L.P.; Lodge, M.P.; Elviss, N.C.; Lemma, F.L.; Hopkins, K.L.; Teale, C.J.; Woodford, N. 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. *Int J Food Microbiol* 2017, 241, 283–290.
- Finley, R.L.; Collignon, P.; Larsson, D.G.J.; McEwen, S.A.; Li, X.Z.; Gaze, W.H.; Reid-Smith, R.; Timinouni, M.; Graham, D.W.; Topp, E. The Scourge of Antibiotic Resistance: The Important Role of the Environment. *Clin Infect Diseases* 2013, 57, 704–710.
- Wales, A.D.; Davies, R.H. Co-Selection of Resistance to Antibiotics, Biocides and Heavy Metals, and Its Relevance to Foodborne Pathogens. *Antibiotics* 2015, Vol. 4, Pages 567–604 2015, 4, 567–604.
- Stecher, B.; Denzler, R.; Maier, L.; Bernet, F.; Sanders, M.J.; Pickard, D.J.; Barthel, M.; Westendorf, A.M.; Krogfelt, K.A.; Walker, A.W.; et al. Gut Inflammation Can Boost Horizontal Gene Transfer between Pathogenic and Commensal Enterobacteriaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, 109, 1269–1274.
- Schjørring, S.; Krogfelt, K.A. Assessment of Bacterial Antibiotic Resistance Transfer in the Gut. *Int J Microbiol* 2011, 2011.
- Nadimpalli, M.; Delarocque-Astagneau, E.; Love, D.C.; Price, L.B.; Huynh, B.T.; Collard, J.M.; Lay, K.S.; Borand, L.; Ndir, A.; Walsh, T.R.; et al. Combating Global Antibiotic Resistance: Emerging One Health Concerns in Lower-and Middle-Income Countries. *Clin Infect Diseases* 2018, 66, 963–969.
- Magiorakos, A.P.; Srinivasan, A.; Carey, R.B.; Carmeli, Y.; Falagas, M.E.; Giske, C.G.; Harbarth, S.; Hindler, J.F.; Kahlmeter, G.; Olsson-Liljequist, B.; et al. Multidrug-Resistant, Extensively Drug-Resistant and Pandrug-Resistant Bacteria: An International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance. *Clin Microb and Infect* 2012, 18, 268–281.
- Brazil. Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. Official Methods for the Analysis of Products of Animal Origin /Ministry of Agriculture, Livestock and Supply. secretary of Agricultural Defense. Brasília, MAPA, 2022, ISBN 978-85-7991-155-2
- Podpečan, B.; Pengov, A.; Vadnjak, S. The Source of Contamination of Ground Meat for Production of Meat Products with Bacteria Staphylococcus aureus. *Slov Vet Research* 2007, 44, 25–30.
- Atlabachew, T.; Mamo, J. Microbiological Quality of Meat and Swabs from Contact Surface in Butcher Shops in Debre Berhan, Ethiopia. *J Food Qual* 2021, 2021.

21. Kuncara, M.C.; Yuliati, F.N.; Prahesti, K.I. The Total Plate Count, *Staphylococcus Aureus*, and PH Value of Raw Chicken Meat Sold at the Traditional Markets in Maros Regency. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci* 2021, 788, 012157. 490-491
22. Procop, G.W.; Church, D.L.; Hall, G.S.; Janda, W.M.; Koneman, E.W.; Schreckenberger, P.C.; Woods, G.L. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*; 7th ed.; Wolters Kluwer: Alphen aan den Rijn, Netherlands, 2017, pp. 375 - 515; 492-493
23. Leister, C.; Hügler, M. Genome Analysis of *Enterobacter Asburiae* and *Lelliottia Spp.* Proliferating in Oligotrophic Drinking Water Reservoirs and Lakes. *Appl Environ Microbiol* 2022, 88. 494-495
24. Reitter C, Neuhaus K, Hügler M. Draft Genome Sequences of *Enterobacter spp.*, *Lelliottia spp.*, and *Serratia spp.*, Coliform Bacteria from Drinking Water Reservoirs and Lakes. *Microbiol Resour Announc* 2021 Aug 12;10(32): e0062221 496-497
25. Yang, X.; Huang, J.; Zhang, Y.; Liu, S.; Chen, L.; Xiao, C.; Zeng, H.; Wei, X.; Gu, Q.; Li, Y.; et al. Prevalence, Abundance, Serovars and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* Isolated from Retail Raw Poultry Meat in China. *Sci of The Tot Environ* 2020, 713, 136385. 498-500
26. Dsani, E.; Afari, E.A.; Danso-Appiah, A.; Kenu, E.; Kaburi, B.B.; Egyir, B. Antimicrobial Resistance and Molecular Detection of Extended Spectrum β -Lactamase Producing *Escherichia Coli* Isolates from Raw Meat in Greater Accra Region, Ghana. *BMC Microbiol* 2020, 20, 1–8. 501-503
27. Onohuean, H.; Igere, B.E. Occurrence, Antibiotic Susceptibility and Genes Encoding Antibacterial Resistance of *Salmonella Spp.* and *Escherichia Coli* From Milk and Meat Sold in Markets of Bushenyi District, Uganda. *Microbiol Insights* 2022, 15, 117863612210889. 504-506
28. Yulistiani, R.; Praseptiangga, D.; Supyani; Sudibya; Raharjo, D.; Shirakawa, T. Prevalence of Antibiotic-Resistance *Enterobacteriaceae* Strains Isolated from Chicken Meat at Traditional Markets in Surabaya, Indonesia. *IOP Conf Ser Mater Sci Eng* 2017, 193, 012007. 507-509
29. Díaz-Jiménez, D.; García-Meniño, I.; Fernández, J.; García, V.; Mora, A. Chicken and Turkey Meat: Consumer Exposure to Multidrug-Resistant *Enterobacteriaceae* Including *Mcr*-Carriers, Uropathogenic *E. Coli* and High-Risk Lineages Such as ST131. *Int J Food Microbiol* 2020, 331, 108750. 510-512
30. Uzeh, R.E.; Adewumi, F.; Odumosu, B.T. Antibiotic Resistance and Plasmid Analysis of *Enterobacteriaceae* Isolated from Retail Meat in Lagos Nigeria. *One H Out* 2021, 3. 513-514
31. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 28th ed.; CLSI Document M100 ED32:2018; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2018. 515-516
32. Cherak, Z.; Loucif, L.; Moussi, A.; Rolain, J.M. Epidemiology of Mobile *Colistin* Resistance (*Mcr*) Genes in Aquatic Environments. *J Glob Antimicrob Resist* 2021, 27, 51–62. 517-518
33. Schauss, T.; Glaeser, S.P.; Gütschow, A.; Dott, W.; Kämpfer, P. Improved Detection of Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia Coli* in Input and Output Samples of German Biogas Plants by a Selective Pre-Enrichment Procedure. *PLoS One* 2015, 10, e0119791. 519-521
34. Ewers, C.; Bethé, A.; Semmler, T.; Guenther, S.; Wieler, L.H. Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing and AmpC-Producing *Escherichia Coli* from Livestock and Companion Animals, and Their Putative Impact on Public Health: A Global Perspective. *Clin Microb and Infect* 2012, 18, 646–655. 522-524
35. Skočková, A.; Koláčková, I.; Bogdanovičová, K.; Karpíšková, R. Characteristic and Antimicrobial Resistance in *Escherichia Coli* from Retail Meats Purchased in the Czech Republic. *Food Control* 2015, 47, 401–406. 525-526
36. Castro, H.; Douillard, F.P.; Korkeala, H.; Lindström, M. Mobile Elements Harboring Heavy Metal and Bacitracin Resistance Genes Are Common among *Listeria Monocytogenes* Strains Persisting on Dairy Farms. *mSphere* 2021, 6. 527-528
37. Ejaz, H.; Junaid, K.; Yasmeen, H.; Naseer, A.; Alam, H.; Younas, S.; Qamar, M.U.; Abdalla, A.E.; Abosalif, K.O.A.; Ahmad, N.; et al. Multiple Antimicrobial Resistance and Heavy Metal Tolerance of Biofilm-Producing Bacteria Isolated from Dairy and Non-Dairy Food Products. *Foods* 2022, 11. 529-531
38. Mustafa, G.R.; Zhao, K.; He, X.; Chen, S.; Liu, S.; Mustafa, A.; He, L.; Yang, Y.; Yu, X.; Penttinen, P.; et al. Heavy Metal Resistance in *Salmonella Typhimurium* and Its Association with Disinfectant and Antibiotic Resistance. *Front Microbiol* 2021, 12. 532-533
39. da Silva, V.L.; Caçador, N.C.; da Silva, C. dos S.F.; Fontes, C.O.; Garcia, G.D.; Nicoli, J.R.; Diniz, C.G. Occurrence of Multidrug-Resistant and Toxic-Metal Tolerant *Enterococci* in Fresh Feces from Urban Pigeons in Brazil. *Microbes Environ* 2012, 27, 179. 534-535
40. Resende, J.A.; Silva, V.L.; Fontes, C.O.; Souza-Filho, J.A.; de Oliveira, T.L.R.; Coelho, C.M.; César, D.E.; Diniz, C.G. Multidrug-Resistance and Toxic Metal Tolerance of Medically Important Bacteria Isolated from an Aquaculture System. *Microbes Environ* 2012, 27, 449–455. 536-538
41. al Salah, D.M.M.; Laffite, A.; Sivalingam, P.; Poté, J. Occurrence of Toxic Metals and Their Selective Pressure for Antibiotic-Resistant Clinically Relevant Bacteria and Antibiotic-Resistant Genes in River Receiving Systems under Tropical Conditions. *Environ Sci and Pol Res* 2022, 29, 20530–20541. 539-541
42. Yazdankhah S, Skjerve E, Wasteson Y. Antimicrobial resistance due to the content of potentially toxic metals in soil and fertilizing products. *Microb Ecol Health Dis* 2018 Dec 11;29(1):1548248. 542-543
43. Lindemann, M.D.; Lu, N. *Use of Chromium as an Animal Feed Supplement. The Nutritional Biochemistry of Chromium (III)*; 2nd ed; Elsevier: Amsterdam, Netherlands, 2019, 79–125. 544-545

-
44. Singh, A.; Kumar, M.; Kumar, V.; Roy, D.; Kushwaha, R.; Vaswani, S.; Kumar, A. Effects of Nickel Supplementation on Antioxidant Status, Immune Characteristics, and Energy and Lipid Metabolism in Growing Cattle. *Biol Trace Elem Res* 2019, 190, 65–75. 546
547
548
 45. Chen, Y.; Guo, X.; Niu, Z.; Lu, D.; Sun, X.; Zhao, S.; Hou, L.; Liu, M.; Yang, Y. Antibiotic Resistance Genes (ARGs) and Their Associated Environmental Factors in the Yangtze Estuary, China: From Inlet to Outlet. *Mar Pollut Bull* 2020, 158, 111360. 549
550
 46. Khesin, R.B.; Karasyova, E. v. Mercury-Resistant Plasmids in Bacteria from a Mercury and Antimony Deposit Area. *Mol and Gen Genetics* 1984, 197, 280–285. 551
552
 47. Yang, S.; Deng, W.; Liu, S.; Yu, X.; Mustafa, G.R.; Chen, S.; He, L.; Ao, X.; Yang, Y.; Zhou, K.; et al. Presence of Heavy Metal Resistance Genes in *Escherichia Coli* and *Salmonella* Isolates and Analysis of Resistance Gene Structure in *E. Coli* E308. *J Glob Antimicrob Resist* 2020, 21, 420–426. 553
554
555
 48. Nies, D.H. Microbial Heavy-Metal Resistance. *Appl Microb and Biotech* 1999 51:6 1999, 51, 730–750. 556
 49. Abd El-Aziz, N.K.; Tartor, Y.H.; Gharieb, R.M.A.; Erfan, A.M.; Khalifa, E.; Said, M.A.; Ammar, A.M.; Samir, M. Extensive Drug-Resistant *Salmonella* Enterica Isolated from Poultry and Humans: Prevalence and Molecular Determinants Behind the Co-Resistance to Ciprofloxacin and Tigecycline. *Front Microbiol* 2021, 12. 557
558
559
 50. Willers, C.; Wentzel, J.F.; du Plessis, L.H.; Gouws, C.; Hamman, J.H. Efflux as a Mechanism of Antimicrobial Drug Resistance in Clinically Relevant Microorganisms: The Role of Efflux Inhibitors. *Expert Opin Ther Targets* 2017, 21, 23–36. 560
561
 51. Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherris, J.C.; Turck, M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *Am J Clin Pathol* 1966, 45, 493–496. 562
563
 52. Martins, M.; Viveiros, M.; Couto, I.; Costa, S.S.; Pacheco, T.; Fanning, S.; Pagès, J.; Aamaral, L. Identification of Efflux Pump-Mediated Multidrug-Resistant Bacteria by the Ethidium Bromide-Agar Cartwheel Method. *In Vivo (Brooklyn)* 2011, 25, 171–178. 564
565
566