

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA  
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Bruna Amatto Duarte Pires

**IDENTIFICAÇÃO, SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA E IDENTIFICAÇÃO  
FILOGENÉTICA DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE QUEIJO MINAS FRESCAL**

Rio de Janeiro  
2017

Bruna Amatto Duarte Pires

**IDENTIFICAÇÃO, SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA E IDENTIFICAÇÃO  
FILOGENÉTICA DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE QUEIJO MINAS FRESCAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária.

Orientador: Dr. Victor Augustus Marin  
Co-orientador: Dra. Shirley de Mello Pereira Abrantes

Rio de Janeiro

2017

Catálogo na fonte  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde  
Biblioteca

Pires, Bruna Amatto Duarte

Identificação, susceptibilidade antimicrobiana e identificação filogenética de *Escherichia coli* isoladas de queijo Minas Frescal / Bruna Amatto Duarte Pires. – Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ, 2017.

79 f. : il.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária)– Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2017.

Orientadores: Victor Augustus Marin, Shirley de Mello Pereira Abrantes

1. *Escherichia coli*. 2. Microbiologia de Alimentos. 3. Contaminação de Alimentos. 4. Queijo. 5. Controle de Qualidade. I. Título

Identification, antimicrobial susceptibility and phylogenetic identification of *Escherichia coli* isolated from Minas Frescal cheese

Bruna Amatto Duarte Pires

**IDENTIFICAÇÃO, SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA E IDENTIFICAÇÃO  
FILOGENÉTICA DE *Escherichia coli* ISOLADAS DE QUEIJO MINAS FRESCAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Doutor em Vigilância Sanitária.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

Helena Pereira da Silva Zamith (Doutor)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Rinaldini Coralini Filippo Tancredi (Doutor)  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

---

Eliana Rodrigues Machado (Doutor)  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

---

Victor Augustus Marin (Doutor) - Orientador  
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

---

Shirley de Mello Pereira Abrantes (Doutor) - Orientador  
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Dedico este trabalho a memória do meu avô José Amatto e a vida do meu filho Bento Amatto P. Barbosa

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pela dádiva da vida e por estar sempre ao meu lado nas dificuldades, angústias, conquistas e felicidades;

Com imenso carinho, aos meus pais, meus maiores exemplos, pela ajuda nas dificuldades, pelos conselhos diante das indecisões, pelas comemorações frente a cada vitória e acima de tudo, pelo eterno amor.

Ao meu marido Leonardo, pelo amor, pela dedicação, pela paciência nos meus momentos de desespero, pela espera nos momentos da minha ausência, pelo apoio, incentivo, companheirismo durante esses anos. E principalmente por sempre me apresentar pontos de vista diferentes para as questões da vida. Te amo.

Ao meu filho, Bento Amatto, por dar significado a minha vida. Por me fazer querer ser melhor a cada dia, me dar animo e coragem para ir em busca dos meus objetivos para tornar nossa vida melhor.

A minha irmã, Luana, pela amizade, amor, cumplicidade, pelos conselhos e por estar sempre presente em todos os momentos.

Ao Professor Dr. Victor Augustus Marin, pela orientação deste estudo, pelo convívio nestes anos, pela disponibilidade, dedicação e principalmente neste último ano pela compreensão e amizade.

A Professora Dra Shirley de Mello Pereira Abrantes, pela coorientação deste estudo, pela disponibilidade, pelo pronto atendimento em cada solicitação minha e pelo exemplo profissional.

A coordenação da Pós Graduação pela oportunidade e ajuda financeira. Aos demais membros docentes, a todo time da secretaria pela paciência e colaboração. E um agradecimento especial a coordenadora Kátia Christina Leandro, pela amizade, confiança, incentivo e por ter sido sempre tão acessível e dedicada.

A aluna de nutrição da UNIRIO Juliana Wolff Salles de Oliveira, por toda ajuda nas análises de PCR, pela identificação quase imediata que tivemos, pela amizade e risadas diárias durante o período que trabalhamos juntas.

A técnica da faculdade de nutrição da UNIRIO Cristiane Rodrigues Silva pela calma, tranquilidade e colaboração no preparo de todas as placas e soluções necessárias para execução do estudo.

À FAPERJ pelo apoio financeiro;

E a todos meus amigos e familiares que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém.

Dalai Lama

## RESUMO

A descoberta dos antibióticos e a sua utilização em terapia anti-infecciosa constituiu um progresso inquestionável da medicina do século XX. No entanto, a eficácia dos agentes antibacterianos foi rapidamente superada pela capacidade que as bactérias têm de se oporem à sua ação. Estas podem adquirir resistência aos antibióticos, quer pela modificação do seu genoma por mutação, quer por incorporação dos genes provenientes de outros microrganismos por diferentes sistemas de transferência genética. O uso intensivo de agentes antimicrobianos em animais para uso alimentar contribuiu para o surgimento e disseminação de bactérias resistentes nos seres humanos, em especial cepas de *E. coli* com diversos fenótipos resistentes aos antibióticos. O objetivo deste estudo foi o isolamento, identificação, avaliação da sensibilidade a antimicrobianos, pesquisa de genes de resistência e caracterização filogenética de estirpes de *Escherichia coli* isoladas de queijo Minas Frescal. Foram avaliadas trinta amostras de queijo Minas Frescal e todas apresentaram contaminação por *E.coli*. Foram então avaliados trinta isolados de *E.coli* através do Teste de Sensibilidade Antimicrobiana para dezessete agentes antimicrobianos e quinze isolados (50%) apresentaram resistência a uma ou mais classes de antimicrobianos. Os isolados que apresentaram resistência fenotípica foram também examinados quanto a presença de 24 genes de resistência antimicrobiana através de Reação em Cadeia e Polimerase (PCR) e PCR Multiplex, e todos amplificaram para um ou mais genes de resistência. A presença dos genes *intl1*, *intl2*, *intl3* e as regiões variáveis dos integrons de classe 1 e de classe 2 foram examinados através de PCR. Um dos isolados analisados foi positivo para o integron de classe 1 e para o integron de classe I variável, um segundo isolado amplificou para o integron de classe 2, 3 e também para o intergron de classe II variável. Outros quatro isolados amplificaram apenas para o integron de classe I variável e um último isolado para o integron de classe 3. Para o estudo filogenético os trinta isolados de *E.coli* foram avaliados para verificar se pertenciam a um dos 8 filogrupos já conhecidos: A, B1, B2, C, D, E, F e o clado I. Nenhum dos isolados amplificou para nenhum dos 4 genes descritos na PCR quadruplex, quando isso ocorre o próprio estudo de referência indica que deve ser realizada a PCR para clados crípticos a fim de identificar se esses isolados são pertencentes a algum dos cinco clados crípticos existentes. O resultado foi negativo

para os cinco clados crípticos avaliados, sendo assim, não foi possível a caracterização filogenética dos isolados de *E.coli*.

Palavras chaves: Resistência antimicrobiana. *E.coli*. Integron. Caracterização filogenética. Queijo Minas Frescal.

## ABSTRACT

The discovery of antibiotics and its use in anti-infections therapy has been an undeniable progress of the twenty century medicine. Nevertheless, the efficiency of antibacterial agents has been fastly overcome by the capacity of bacteria to oppose to its action. Bacteria can acquire resistance to antibiotics by modification in its genome by mutation or by incorporation of genes originated by other microorganisms from different transference of genetic systems. The intensive use of antimicrobial agents in animals for food usage has contributed for the appearance and dissemination of resistant bacteria in human beings, especially *E.coli* strains with different phenotype resistant to antibiotics. The objective of this study was the isolation, identification, evaluation of antimicrobial susceptibility and phylogenetic characterization of *Escherichia coli* strains, isolated from Minas Frescal cheese. Thirty samples of Minas Frescal cheese were evaluated and all were contaminated by *E. coli*. Thirty *E. coli* isolates were evaluated through the the Antimicrobial Sensitivity Test for seventeen antimicrobial agents and fifteen isolates (50%) presented resistance to one or more classes of antimicrobial. Isolates that showed phenotypic resistance were also examined for the presence of 24 antibiotic resistance genes by Polymerase chain reaction (PCR) and Multiplex PCR, and all isolates amplified for one or more resistance genes. The presence of Int 1, Int2, Int3 genes and the variable regions of integrons of class 1 and 2 were examined through PCR. One of the isolates analyzed was positive for class 1 and for variable class 1 integron. Another isolate amplified for class 2, 3 integron and for variable class 2 integron. Four others isolates amplified only for variable class 1 integron and one last isolate amplified for class 3 integron. For the phylogenetic characterization, the thirty *E. coli* isolates were evaluated to verify if they belonged to one of the eight acknowledged phylogroups: A, B1, B2, C, D, E, F and clade I. None of the isolates amplified for none of the four genes described in quadruplex PCR. When this happens, the benchmark study indicates that PCR for cryptic clades should be performed, in order to identify if those isolates belong to any of the five existing cryptic clades. Such investigation was carried out and the result was negative for the five cryptic clades evaluated; not being possible the phylogenetic characterization of *E. coli* isolates.

Key words: Antimicrobial resistance. *E. coli*. Integron. Phylogenetic characterization. Minas frescal cheese.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura do Integron. ....	21
Figura 2 - Como a resistência a antibióticos ocorre. ....	22
Figura 3- Etapas do processo de produção de queijo minas frescal. ....	24
Figura 4 – Imagem da Placa 3M™ Petrifilm™ após o isolamento da <i>E.coli</i> .....	32
Quadro 1- Antibióticos utilizados no Teste de Sensibilidade Antimicrobiana, suas respectivas classes e quantidades. ....	34
Quadro 2: Resultados Teste de Sensibilidade Antimicrobiana (TSA) X <i>Polimerase Chain Reaction</i> (PCR) de acordo com o isolado resistente de <i>E.coli</i> estudado .....	47

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genes, tamanhos e referências que foram utilizados para identificação genética de resistência antimicrobiana. ....	36
Tabela 2. <i>Primers</i> e temperaturas de anelamento que foram utilizados para identificação dos integrons. ....	37
Tabela 3. Genes, tamanhos e referência que foram utilizados na PCR Quadruplex para caracterização filogenética de <i>E.coli</i> . ....	38
Tabela 4. Genes, tamanhos e referência que foram utilizados na PCR para identificação de clados crípticos de <i>E. coli</i> . ....	39
Tabela 5. Resultados do Teste de Sensibilidade Antimicrobiana de acordo com o isolado resistente de <i>E.coli</i> estudado. ....	41
Tabela 6. Presença de genes de resistência de acordo com o isolado de <i>E. coli</i> resistente testado. ....	42
Tabela 7. Identificação dos integrons de acordo com o isolado de <i>E. coli</i> resistente testado. ....	43
Tabela 8. Resultado da PCR Quadruplex de acordo com o isolado resistente testado. ....	44
Tabela 9: Resultado da identificação de linhagens crípticas de <i>E.coli</i> de acordo com o isolado resistente testado. ....	45

## LISTA DE SIGLAS

AK	Amicacina
AMC	Amoxicilina/ ácido clavulânico
AMP	Ampicilina
BEM	<i>Eosin Methylene Blue Agar</i>
BP	Pares de base
C	Cloranfenicol
CAZ	Ceftazidima
CEI	Integrans cromossômicas
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CN	Gentamicina
CRO	Ceftriaxona
DTA	Doenças transmitidas por alimentos
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EMB	<i>Eosin Methylene Blue Agar</i>
ESBL	β-lactamases de espectro ampliado
ETP	Ertapenem
FEP	Cefepima
FOX	Cefoxitina
IPM	Imipenem
MAR	Múltipla resistência a antibióticos
MIS	<i>Mobile</i>
MLST	<i>Multi locus sequence type</i>
NA	Ácido nalidíxico
NMP	Número mais Provável
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	“ <i>Open reading frame</i> ” ou “cassetes”
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> / Reação em cadeia de polimerase
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	Ácido ribonucleico
S	Estreptomicina
SAM	Ampicilina / sulbactam

SXT	<i>Sulfazotrim - trimetopim + sulfatoxazol</i>
TE	Tetraciclina
TSA	<i>Trypticase soy agar</i>
TSA	Teste de sensibilidade antimicrobiana

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1 <i>Escherichia coli</i> .....	15
1.1.1 Grupos filogenéticos em <i>Escherichia coli</i> .....	16
1.1.1.1 <i>Técnica de PCR</i> .....	17
1.2 ANTIBIÓTICOS E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA.....	19
1.2.1 Integrons .....	20
1.3 UTILIZAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS PARA USO VETERINÁRIO E IMPACTO NO AUMENTO DE MICRORGANISMOS MULTI RESISTENTES .....	22
1.4 QUEIJO MINAS FRESCAL .....	23
1.5 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS - QUEIJO MINAS FRESCAL ..	26
1.6 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM ALIMENTOS: PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA E O PAPEL DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA .....	28
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	30
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
3.1 AMOSTRAGEM .....	31
3.2 ISOLAMENTO DA <i>E. COLI</i> .....	31
3.3 TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA (TSA).....	33
3.4 AMPLIFICAÇÃO DE GENES QUE PODEM CONFERIR RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA .....	35
3.5 DETECÇÃO DOS INTEGRONS .....	36
3.6 CARACTERIZAÇÃO DE GRUPOS FILOGENÉTICOS DE <i>E.coli</i> . .....	38
3.6.1 O método de Clermont et al., 2013 de filotipagem de <i>E. coli</i> .....	38
3.6.2 Identificação de linhagens crípticas de <i>E. coli</i> :.....	39
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
4.1 RESULTADOS ISOLAMENTO DE <i>E.coli</i> EM QUEIJO MINAS FRESCAL.....	40
4.2 RESULTADOS DO TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA .....	40
4.3 RESULTADOS PARA GENES QUE CODIFICAM RESISTÊNCIA .....	42
4.4 RESULTADOS INTEGRONS.....	43
4.5 RESULTADOS DA FILOTIPAGEM DE <i>E.coli</i> - MÉTODO DE CLERMONT E COLABORADORES (2013) .....	44

4.6 RESULTADOS DA IDENTIFICAÇÃO DE LINHAGENS CRÍPTICAS DE <i>E. coli</i> – MÉTODO DE CLERMONT E COLABORADORES (2011) .....	45
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>46</b>
5.1 TESTE FENOTÍPICO (TSA) X TESTE GENÉTICO (PCR) .....	46
5.2 ESTUDO FILOGENÉTICO .....	56
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>58</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>60</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O advento de medicamentos com atividade antimicrobiana foi um grande marco no tratamento de patologias infecciosas. No entanto, logo observou-se uma diminuição na eficácia de algumas dessas drogas no tratamento de determinadas infecções, pois as bactérias haviam adquirido mecanismos de resistência a certas classes de antibióticos. Tal fato tem trazido consequências graves à saúde pública ao restringir as opções terapêuticas disponíveis (GUIMARÃES et al., 2012).

As bactérias antibiótico resistentes tem a capacidade de transferir seus genes de resistência a outras bactérias através de diversos mecanismos de transferência genética. A aquisição e a transferência de genes de resistência aos antibióticos, associados à seleção exercida pelo uso intensivo destas substâncias na criação animal destinada ao consumo humano, corroboram a importância e a necessidade de avaliarmos a presença de bactérias antibiótico resistente em alimentos. Uma vez que o alimento pode contribuir para a disseminação de cepas resistentes aos agentes microbianos, não apenas cepas patogênicas, mas também aquelas comensais (CARDOSO; MARIN, 2014).

### 1.1 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* (*E.coli*) é um membro típico da família *Enterobacteriaceae* que é constituída por bacilos Gram negativos, anaeróbios facultativos, fermentadores da glicose, redutores de nitrato a nitrito e oxidase-negativos (LOGAN, 1994). Ainda como característica geral desta família, observamos a capacidade de metabolizar uma variedade de substâncias como carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídios e ácidos orgânicos. Essas propriedades metabólicas são de grande importância e extensivamente usadas na classificação e identificação dos gêneros e espécies da família. Amostras típicas da espécie fermentam a lactose, com produção de ácido e gás, e não produzem acetoina através da metabolização da glicose, não utilizam citrato, não produzem sulfeto de hidrogênio e produzem indol a partir do triptofano (TRABULSI et al, 2004).

A *E.coli* foi isolada pela primeira vez em 1885, por Theodor Escherich, médico austríaco do final do século XIX, a partir de amostras fecais coletadas de crianças com diarreia. De modo geral, essa bactéria é considerada um comensal inofensivo, no entanto, diversas cepas dessa espécie apresentam potencial patogênico (NATARO et al., 2006). A grande maioria das amostras de *E. coli* é pertencente à microbiota intestinal, tanto de seres humanos quanto de animais de sangue quente. No entanto, aproximadamente 10% são patogênicas, podendo causar infecções intestinais e extra-intestinais (SANTOS et al., 2009). Grande parte das infecções determinadas por *E. coli* são debeladas espontaneamente pelo organismo, entretanto, em alguns casos faz-se necessário o estabelecimento de medidas terapêuticas, muitas vezes lançando mão de antimicrobianos (DIAS, 2011)

Essa bactéria é frequentemente isolada em alimentos e tem apresentado grande troca de material genético com outras espécies bacterianas; aumentando assim a possibilidade desse microrganismo transferir genes de resistência a antibióticos a patógenos bacterianos que causam doença em humanos (ALEXANDER et al., 2010).

O surgimento de isolados de *E. coli* com fenótipos de múltipla resistência a antibióticos, envolvendo co-resistência a quatro ou mais famílias independentes de antibióticos, tem sido previamente relatado e é considerado um problema de saúde grave (MAYNARD et al., 2003). A transferência de resistência determinada por elementos genéticos móveis incluindo plasmídeos, transposons, de genes cassetes em integrons (CARATTOLI, 2001) e a alteração na regulação do *locus* múltipla resistência a antibióticos (*mar*) (ALEKSHUN & LEVY, 1997; OETHINGER, et al., 1998) são fatores importantes que podem contribuir para o aumento das bactérias multirresistentes (SÁENZ et al., 2004).

#### 1.1.1 Grupos filogenéticos em *Escherichia coli*

Devido a fenômenos evolutivos, vários grupos bacterianos têm se separado dentro das espécies de microrganismos. A caracterização destes grupos é muitas vezes prejudicada por limitações nas técnicas comumente empregadas para esta finalidade. Uma estratégia que vem sendo utilizada na identificação da origem evolutiva de *E. coli* extra-intestinais é a análise da distribuição dos marcadores de patogenicidade para classificação dos isolados nos grupos filogenéticos (JOHNSON et al., 2001). Segundo Clermont e colaboradores (2013), as análises filogenéticas têm mostrado que cepas deste agente podem ser classificadas dentro de oito filogrupos já conhecidos: A, B1, B2, C, D, E, F e o clado I.

Cepas desses grupos diferem entre si em suas características fenotípicas, incluindo a habilidade na utilização de diferentes açúcares, perfil de resistência aos antimicrobianos e temperatura ideal de crescimento (GORDON, 2004). O tamanho do genoma também varia entre os grupos filogenéticos, sendo que cepas dos grupos A e B1 têm o genoma menor que os grupos B2 e D (BERGTHORSSON; OCHMAN, 1998).

Os isolados também diferem de acordo com seus nichos ecológicos e presença de determinados fatores de virulência. Com isso, cepas dos grupos B2 e D não são freqüentemente encontradas em amostras ambientais (WALK et al., 2007). Já isolados de peixes, anfíbios, répteis e de amostras ambientais são geralmente classificadas nos grupos A ou B1 (GORDON; COWLING, 2003).

Análises filogenéticas têm sido frequentemente realizadas em bactérias, especialmente em *E. coli* isoladas de amostras humanas (JOHNSON et al., 2001; JOHNSON et al., 2002). Em 2000, um método de triplex *Polymerase Chain Reaction* (PCR) foi descrito por Clermont, Bonacorsi e Bingen para caracterizar os isolados de *E. coli* em grupos filogenéticos baseando-se na presença ou ausência de dois genes (*chuA* e *yjaA*) e um fragmento de DNA anônimo (TSPE4.C2). Tal técnica permitia que um isolado de *E. coli* fosse atribuído a um dos quatro filogrupos existentes até então: A, B1, B2 ou D. Entretanto, alguns isolados podem não ser claramente classificados por não pertencerem a um dos quatro grupos filogenéticos principais de *E. coli*.

O crescimento do número de dados de sequências *multi-locus* e genomas de *E. coli* refinou a compreensão da estrutura dos filogrupos e atualmente oito filogrupos são reconhecidos: sete (A, B1, B2, C, D, E, F) pertencem a *E. coli stricto sensu*, ao passo que o oitavo é a *E. coli* clado críptico I.

O agrupamento filogenético pode também ser realizado com auxílio de enzimas multilocus ou por ribotipagem. Porém, estas técnicas são complexas, laboriosas e necessitam de um banco com diferentes cepas. Com isso, a filogenia por meio de PCR utilizando quatro *primers* propostos por Clermont et al. (2013) é um método mais rápido e simples para classificação dos isolados de *E. coli* nos diferentes filogrupos.

#### 1.1.1.1 Técnica de PCR

Os métodos baseados na amplificação do DNA são menos afetados pelo tipo de processamento industrial implementado. O DNA como as proteínas sofrem desnaturação em altas temperaturas, mas tem sido observado que este pode ainda ser detectado por amplificação de fragmentos curtos (MEYER; CANDRIAN, 1996).

As seqüências de DNA únicas de uma espécie são um excelente meio de detecção e material de identificação de espécies. Este princípio tem sido aplicado extensivamente na identificação *forense* (BAKER; PALUMBI, 1994), parasitologia (ZARLENGA; HIGGINS, 2001), diagnóstico médico (MANGUIN et al., 2002) e ecologia microbiana (THERON; CLOETE, 2000).

A técnica de PCR foi concebida em 1983 por Kary Mullis, como um método de amplificação de seqüências específicas de DNA ou ácido ribonucleico (RNA). Repetidas séries do ciclo envolvem a desnaturação do DNA molde, o anelamento dos primers ou iniciadores e a extensão dos *primers* anelados pela DNA polimerase resultando em uma acumulação exponencial de fragmentos específicos. Devido à extensão do *primer*, os produtos sintetizados em um ciclo podem servir de molde para os próximos e o número de cópias do fragmento alvo dobra a cada ciclo (ERLICH, 1992).

A introdução da DNA polimerase termoestável (Taq polimerase) isolada de *Thermus aquaticus* transformou a PCR numa reação simples e robusta que pode ser automatizada por um termociclador. *Thermus aquaticus* é uma bactéria que foi descoberta em 1965 no Parque de Yellowstone, vive em águas com temperaturas que variam de 70-75°C. Dessa bactéria foram isoladas enzimas que toleram temperaturas de cerca de 100°C. Até então, a enzima utilizada para estender os *primers* anelados era inativada pelas altas temperaturas requeridas para separar as duas bandas de DNA no início de cada ciclo da PCR. Conseqüentemente novas enzimas tinham que ser adicionadas durante cada ciclo (ERLICH, 1992).

No presente estudo uma técnica de PCR baseada na pesquisa de genes específicos relacionados a *E.coli* será utilizada para identificação filogenética de isolados dessa bactéria. A mesma técnica será também utilizada na identificação de genes de resistência nos isolados estudados.

## 1.2 ANTIBIÓTICOS E RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A descoberta dos antibióticos e a sua utilização em terapia anti-infecciosa constituiu um progresso inquestionável da medicina do século XX. No entanto, a eficácia dos agentes antibacterianos foi rapidamente superada pela capacidade que as bactérias têm de se oporem à sua ação. A resistência antimicrobiana aparece porque o genoma bacteriano é extremamente dinâmico, embora pequeno e econômico. Em geral, as atividades essenciais de uma bactéria são codificadas por um só cromossomo, e as não essenciais, como a defesa contra drogas e a transferência gênica, que levam à recombinação, são codificadas por elementos móveis (plasmídios, transposons e integrons), que não fazem parte do cromossomo (SOUZA, 1998; MOTA et al, 2005).

A origem da resistência antimicrobiana pode ser genética ou não (cromossômica e extra cromossômica). Na de origem não genética, ou seja, fenotípica, a bactéria adquire resistência à determinada droga, momentaneamente e, não consegue transmiti-la para sua progênie. Este mecanismo de origem não genética, geralmente está relacionado a processos de multiplicação bacteriana necessários para a maioria das ações antibacteriana das drogas (MOTA et al, 2005).

Já a resistência genética, está relacionada à presença de genes no microrganismo que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas. Estas podem adquirir resistência aos antibióticos, quer pela modificação do seu genoma por mutação, quer por incorporação dos genes provenientes de outros microrganismos por diferentes sistemas de transferência genética. É freqüente encontrar estirpes resistentes a várias classes de antibacterianos (TAVARES, 2000).

De acordo com Tavares (2000), a resistência das diversas espécies bacterianas aos antimicrobianos é extremamente variável entre os países, regiões e a origem hospitalar ou comunitária das estirpes. Algumas espécies apresentam resistência amplamente difundida em todo o mundo, enquanto que outras mantêm em todos os países notável sensibilidade às drogas ativas.

No caso da *E. coli*, o tratamento para infecções causadas por esta bactéria, tem sido cada vez mais dificultado pelo surgimento de resistência à maioria dos agentes antimicrobianos de primeira linha (SABATÉ et al., 2008). Estirpes de *E. coli* são altamente capazes de adquirir e transferir genes de resistência a antimicrobianos (JOUINI et al, 2009; KOOJ & WOO, 2011) e tem demonstrado troca de material genético com outras espécies de bactérias. É possível que este microorganismo possa passar os genes de resistência a antibióticos para patógenos bacterianos transitórios que causam doença em seres humanos (ALEXANDER et al., 2010).

A aquisição e a transferência de genes de resistência aos antibióticos associados à seleção exercida pelo uso intensivo destas substâncias explicam a situação alarmante em medicina humana em escala mundial (DE SÁ, 2010).

### 1.2.1 Integrons

“O rápido aparecimento de resistência a antibióticos entre bactérias é, em grande parte, devido à difusão de genes de resistência aos antibióticos através da transferência genética horizontal, mediada por plasmídeos, transposons e integrons” (WHITE et al. 2001). Um sistema conhecido como integrons: Elementos genéticos bacterianos com uma estrutura específica consistindo em dois segmentos conservados que ladeiam uma região central contendo “*open reading frame*” (ORF) ou “cassetes” que codificam para uma resistência antimicrobiana específica; tem sido identificados em bactérias multiresistentes (Figura 1).

Figura 1- Estrutura do Integron.



Fonte: Aula de Genética Bacteriana -Profa Francis Moreira Borges

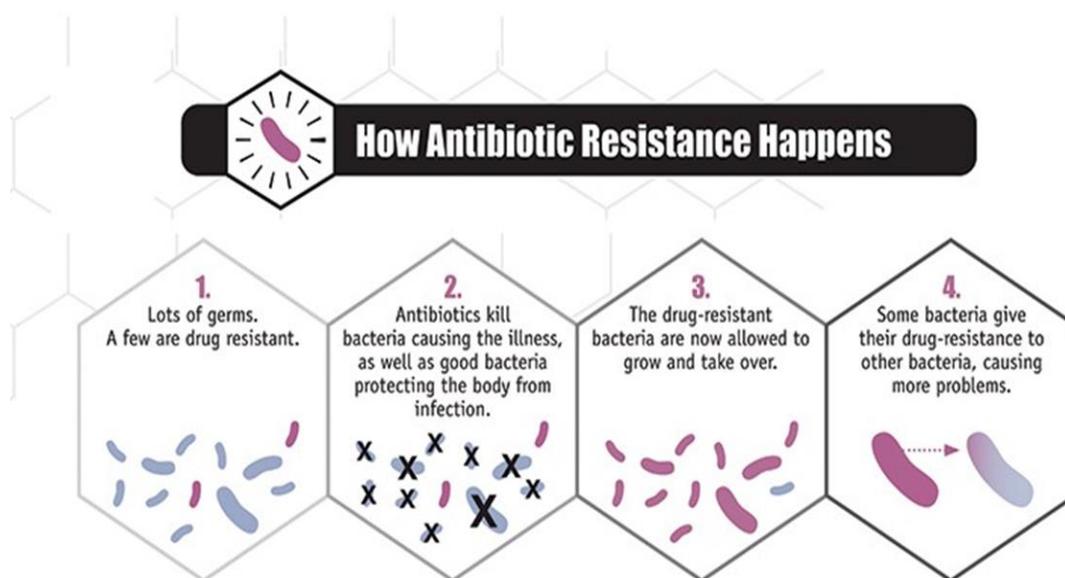
Existem quatro diferentes classes de integrons em bactérias que transportam genes para resistência antimicrobiana, cada integron contém um gene de integrase distinto (Leverstein-Van, 2003). Integrons de classe 1 são os mais comuns e podem carrear um número variável de até nove genes cassetes (MATHAI, GRAPE, KRONVALL, 2004). Integrons de classe 2 são mais conservados e geralmente carregam três genes cassetes (*dfr1a*, *sat1*, *aadA1*). Os integrons de classe 3 e 4 têm sido observados apenas em alguns casos no Japão e na Índia (ARAKAWA et al., 1995; HOCHHUT et al, 2001), e são bem mais raros.(MATHAI, GRAPE, KRONVALL, 2004).

Os integrons desempenham um papel importante na aquisição e difusão de genes de resistência a antibióticos (GUERIN et al. 2009) e também na propagação da multirresistência em bactérias gram-negativas, devido à sua capacidade de capturar os genes cassetes a partir do ambiente e incorporá-los ao local específico de recombinação (WHITE et al. 2001). Assim, a detecção e caracterização dos integrons contendo genes de resistência aos antibióticos são passos fundamentais na avaliação do potencial de um determinado ambiente representar um reservatório de resistência aos antibióticos (YAQOOB et al., 2011).

### 1.3 UTILIZAÇÃO DE ANTIBIÓTICOS PARA USO VETERINÁRIO E IMPACTO NO AUMENTO DE MICRORGANISMOS MULTI RESISTENTES

O uso intensivo de agentes antimicrobianos em animais para uso alimentar contribuiu para o surgimento e disseminação de bactérias resistentes nos seres humanos, em especial cepas de *E. coli* com diversos fenótipos resistentes aos antibióticos, envolvendo a co-resistência para quatro ou mais famílias distintas de antibióticos (RAMOS et al., 2012). Em seu trabalho, Del Fiol e colaboradores (2010), relata que o uso indiscriminado e irresponsável de antibióticos, terapêutica ou profilaticamente, em uso humano ou veterinário, passando ainda pela utilização no crescimento animal e propósitos agrícolas, tem favorecido a pressão seletiva, mostrando como resultado a seleção e predominância de espécies bacterianas cada vez mais resistentes. Como demonstrado na figura 2.

Figura 2 - Como a resistência a antibióticos ocorre.



Fonte: CDC site (<https://www.cdc.gov/getsmart/community/about/antibiotic-resistance-faqs.html>)

A alimentação animal é incrementada com suplementos e antibióticos para reduzir os riscos de epidemias em criações animais. Agentes antimicrobianos são administrados em níveis terapêuticos e subterapêuticos em animais produtores de alimentos, também para acelerar o ganho de peso e aumentar a eficiência alimentar (BOWER; DAESCHEL, 1999). Esta prática exerce uma pressão seletiva para genes resistentes a antimicrobianos, os quais levam à emergência de bactérias resistentes associadas com animais e produção de alimentos (KLEIN, PACK, REUTER, 1998). Há evidências que o tratamento indiscriminado de animais com antibióticos torne seus produtos e derivados fontes para resistência aos antibióticos na espécie humana (MOTA et al., 2005). Se bactérias antibiotico-resistentes são transferidas para humanos, através do consumo de produtos de origem animal, estas podem colonizar esses novos hospedeiros e passar a sua resistência antimicrobiana para outra bactéria já presente (COGHLAN, 1996).

Sendo assim, a presença de bactérias antibiótico-resistentes em alimentos é um sério problema para a saúde pública (MANIE et al., 1997) e é de extrema importância o isolamento e identificação desses agentes em laboratório, e a análise *in vitro* da sensibilidade antimicrobiana nas amostras isoladas. Desta forma, contribui-se para um melhor controle, com a utilização de terapêutica adequada, além de promover um decréscimo na resistência aos antibióticos (GUTIERREZ et al., 1990)

#### 1.4 QUEIJO MINAS FRESCAL

O leite é uma secreção da glândula mamária de mamíferos, de composição nutricional bastante rica, é indispensável à alimentação infantil humana e das crias dos animais. Contém componentes importantes para uma dieta saudável, como proteínas e cálcio. Apresenta, porém, alta perecibilidade, tanto química, pelos efeitos da oxidação, quanto biológica, pela atuação de microrganismos, que podem causar doenças (SILVA, 2005).

Entre os derivados do leite, o queijo é um dos principais produtos, tendo, ademais, alta demanda de consumo. É um concentrado protéico-gorduroso, cuja obtenção é feita mediante a coagulação do leite e posterior retirada do soro (SILVA, 2005). De acordo com o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal, entende-se por “Queijo Minas Frescal”, o queijo fresco obtido por coagulação enzimática do leite com coalho e/ou outras enzimas coagulantes apropriadas, complementada ou não com ação de bactérias lácticas específicas” (BRASIL, 2004). As etapas de produção do Queijo Minas Frescal podem ser visualizadas na Figura 3.

Figura 3- Etapas do processo de produção de queijo minas frescal.



Fonte (SILVA, 2005)

Esta variedade de queijo apresenta massa crua, coloração esbranquiçada, consistência mole e textura fechada. Normalmente é vendido na forma cilíndrica, com o peso variando em torno de 0,5 a 3 kg. O queijo acabado apresenta, em média, a seguinte composição: 55% a 58% de umidade; 17% a 19% de gordura; teor de sal variando entre 1,4% e 1,6%; e pH entre 5,0 e 5,3 (SILVA, 2005).

O queijo fresco do tipo Minas Frescal é um dos mais populares do Brasil, sendo produzido em larga escala e consumido por todas as camadas da população em diversas refeições durante todo o ano. É uma variedade não maturada, para o consumo imediato e de curta durabilidade no mercado (FURTADO, 1999).

Segundo Pinto e colaboradores, 2011, por ser de fabricação simples e de baixo custo, o queijo Minas Frescal representa a maioria dos queijos comercializados em feiras livres, bares e mercearias, sendo armazenados em sacos plásticos comuns, amarrados ou fechados com um fecho metálico, sem usar vácuo.

No Brasil existem vários tipos de queijos frescos produzidos de forma artesanal e industrial, tanto por pequenos produtores quanto por algumas indústrias. Esses queijos são muito populares e devido ao bom rendimento que proporcionam na fabricação, são comercializados a preços acessíveis a uma grande parcela da população (SENA et al., 2000).

O consumo anual de queijo no Brasil em 2007 foi de 3,1 kg *per capita*. Este valor vem crescendo ao longo dos anos, visto que no ano de 2000 o consumo era de 2,6 kg *per capita* (EMBRAPA, 2010). O queijo mais fabricado no Brasil em 2010 foi o queijo Prato, seguido pela Muçarela e em terceiro lugar o queijo Minas Frescal (EMBRAPA, 2010).

Em 2007, o Brasil produziu aproximadamente 25 milhões de toneladas de leite, sendo que 34% do total de leite submetido a fiscalização foi destinado à fabricação de queijos, perfazendo 580 mil toneladas (EMBRAPA, 2010). Tais dados demonstram a importância deste produto na alimentação da população brasileira.

Apesar das exigências para que o leite destinado a fabricação de queijos seja higienizado por meios físicos e submetidos à pasteurização, é intensa a comercialização dos queijos que não passam por tais especificações. Além disso, a contaminação do leite pós-pasteurização, a utilização de fermentos inativos, temperaturas inadequadas e incorretas condições de manufatura e armazenagem, contribuem também de forma efetiva para o comprometimento da qualidade do produto final (SALOTTI et al., 2006).

Muitos microrganismos, dentre eles destaca-se *E. coli*, tem sido encontrados no leite e produtos lácteos, como queijo, que é normalmente armazenado sob inadequadas temperaturas e consumidos sem qualquer tratamento térmico prévio. Eles são frequentemente associados a surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) (CAMPOS et al., 2009; OLTRAMARI et al., 2011).

Devido ao alto teor de umidade, valor de pH pouco ácido e grande manipulação durante a fabricação, o queijo Minas Frescal é extremamente susceptível aos fenômenos bioquímicos e microbiológicos que afetam as características de qualidade, rendimento e durabilidade. O queijo Minas Frescal, constantemente, apresenta contaminação por diversos patógenos de importância em saúde coletiva, destacando-se a *E. coli* (ALVES, 2010).

Visando evitar riscos à saúde, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) N°. 12 de 02 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001) estabelece o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Para queijos de muito alta umidade (55%) incluindo os queijos Minas Frescal, a legislação não discrimina a *E. coli*, como sendo um parâmetro específico de controle e a inclui na classe dos Coliformes a 45°C/g. No entanto o item 5.9.1 desta Resolução, dispõe que a denominação de "coliformes a 45°C" é equivalente à denominação de "coliformes de origem fecal" e de "coliformes termotolerantes" e que caso seja determinada a presença de *E. coli*, isto deve constar no laudo analítico.

## 1.5 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR ALIMENTOS - QUEIJO MINAS FRESCAL

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são definidas como doenças infecciosas ou tóxicas, causadas por agentes que penetram no organismo hospedeiro através da ingestão de alimentos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2003). Os alimentos ou água podem estar contaminados por bactérias, vírus, parasitas, toxinas, príons, agrotóxicos, produtos químicos e metais pesados (BRASIL, 2005).

Diversos fatores têm contribuído para o aparecimento das DTAs, entre os quais destacam-se: o crescente aumento da população; a existência de grupos populacionais vulneráveis ou mais expostos; o processo de urbanização desordenado e a necessidade de produção de alimentos em grande escala (BRASIL, 2010)

As DTAs em especial as causadas por microrganismos, revelam um crescente problema na saúde pública mundial (BEATTY, ADCOCK, SMITH, 2006; DEVASIA, JONES, WARD, 2006). Considerando que estas constituem um perigo relevante, a identificação da ocorrência de microrganismos nos alimentos vem sendo considerada prioridade básica em nosso país (BRASIL, 1997).

O número de casos de DTAs é difícil de estimar, mas foi relatado que em 2005 cerca de 1,8 milhões de pessoas morreram por doenças diarreicas. Uma grande proporção desses casos pode ser atribuída à contaminação de alimentos e água de consumo. A alta incidência de doenças diarreicas em diversos países em desenvolvimento sugere maior atenção a questões de sanidade dos alimentos (ALMEIDA et. al., 2013).

Pesquisadores do mundo inteiro vêm relatando a importância da qualidade microbiana dos alimentos (CUNHA; CUNHA, 2007), entretanto, tem sido difícil estimar a extensão global das DTA (TAUXE, 2002). Santana e colaboradores (2006) ressaltam que o Brasil conta com poucos dados epidemiológicos a respeito destas doenças. Gonçalves e colaboradores (2008) citam em sua revisão da literatura, alguns trabalhos sobre a ocorrência de morte de mais de 50.000 pessoas diariamente por infecções causadas por DTA nos países em desenvolvimento.

De acordo com a ANVISA, no período de 1999 a 2007 foram notificados no Brasil, 5.699 surtos de DTA, com 114.302 doentes e 61 óbitos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2009). Silva (2010) relata que 12 mil casos de DTA são notificados anualmente no Brasil.

A *E. coli* tem sido isolada de uma variedade de alimentos como carnes, pescados, frutas, vegetais e leite e seus derivados (LEE et al, 2009; LITTLE et al, 2008; SOLOMAKOS et al, 2009) que podem servir de veículo na transmissão de DTA (BAYLIS, 2009).

O queijo Minas Frescal é objeto de estudo de vários pesquisadores em diferentes regiões do Brasil, pois tem sido frequentemente relacionado à transmissão de doenças de origem alimentar, além do que, muitas são as espécies de microrganismos que têm sido encontradas no leite e em queijos (CARDOSO e ARAÚJO, 2004; ROOS et al., 2005).

Um exemplo é o estudo de Gonzales e colaboradores (2000) que analisou 44 amostras comerciais de queijo Minas Frescal, das quais conseguiram isolar 385 linhagens de *E. coli*, sendo cinco cepas enteropatogênicas. Ferreira e colaboradores (2011) avaliaram a qualidade microbiológica de queijos Minas Frescal comercializados em feiras livres da cidade de Uberlândia-MG e encontraram populações de coliformes termotolerantes acima de  $1,0 \times 10^3$  NMP/g em 65% das 20 amostras avaliadas.

## 1.6 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM ALIMENTOS: PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA E O PAPEL DA VIGILÂNCIA SANITÁRIA

O combate à resistência bacteriana aos antimicrobianos é um problema de saúde pública mundial e deve ser abordado sob vários aspectos. O entendimento dos processos relacionados à ação de antibióticos e ao surgimento da resistência, o planejamento, a síntese e avaliação farmacológica de novos agentes antimicrobianos mais potentes e sua posterior aplicação terapêutica de forma racional representam diferentes níveis de ações contínuas e interligadas (SILVEIRA et al., 2006).

Além disso, o custo financeiro de uma terapia fracassada por conta de microrganismos resistentes é muito grande, onerando ainda mais os sistemas públicos de saúde. Bactérias resistentes geram nova consulta, novos exames diagnósticos, nova prescrição, sem contar a provável internação e ocupação de leitos hospitalares (DEL FIOLE et al., 2010). Na União Européia, cerca de 25.000 pacientes morrem a cada ano de infecções causadas por bactérias multirresistentes selecionadas e os custos associados estão estimados em cerca de 1,5 bilhões de euros por ano. (ECDC/EMEA JOINT WORKING GROUP, 2009). Nos Estados Unidos da América, infecções com patógenos resistentes aos antimicrobianos custam ao sistema de saúde dos Estados Unidos mais de 20 bilhões de dólares por ano e geram mais de 8 milhões de dias de internamento adicionais (ROBERT et al, 2009).

Alguns estudos relataram que bactérias resistentes a antimicrobianos e genes de resistência poderiam ser transferidos diretamente para os seres humanos através da cadeia alimentar (SRINIVASAN, et al, 2008; JIANG; SHI, 2012). O emprego de antibióticos na pecuária numa concentração insuficiente para eliminar todas as bactérias patogênicas do organismo animal, pode levar ao aparecimento de linhagens bacterianas resistentes. Por meio do consumo de produtos de origem animal, como o leite e seus derivados, partes das bactérias resistentes acabam se disseminando e ocasionando a resistência bacteriana nos seres humanos (KORB et al, 2011). Estudos epidemiológicos afirmam que o consumo de produtos derivados de animais é uma via de desenvolvimento de bactérias resistentes no homem (PADILHA, 2000).

O isolamento de *E. coli* resistentes a antimicrobianos têm sido relatados a partir de diversos tipos de alimentos, como peixes, leite e outros (RYU et al., 2012a; RYU et al., 2012b; JIANG et al., 2012; OLTRAMARI et al., 2011). A *E. coli* adquiriu destacada relevância entre os microrganismos mais comumente envolvidos em doenças de difícil tratamento, devido a aquisição e disseminação de resistência a uma ampla gama de antimicrobianos. A possibilidade de que as *E. coli* apresentando resistência adquirida aos antimicrobianos sejam veiculadas através da cadeia alimentar as coloca como objeto de grande atenção da Saúde Pública.

Sendo assim, torna-se de grande valia conhecer o fenótipo e os genes envolvidos na resistência aos antibióticos para as *E. coli* que colonizam produtos alimentares, como o queijo Minas Frescal, já que estes podem atuar como reservatório de genes de resistência antimicrobiana (JOUINI et al., 2009).

A questão da resistência a antimicrobianos aponta ainda para o importante papel da Vigilância Sanitária no âmbito da verificação da qualidade microbiológica do alimento, no caso queijo Minas Frescal, que está sendo colocado à venda para a população. E principalmente avaliar a presença de bactérias multiresistentes neste alimento, que quando consumido pelo homem pode transferir a ele genes de resistência. Evitando assim, que o alimento seja um possível transmissor de bactérias multiresistentes ao homem.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo foi o isolamento, identificação, avaliação da sensibilidade a antimicrobianos e caracterização filogenética de estirpes de *Escherichia coli* isoladas de amostras de queijo Minas Frescal comercializadas para fins de consumo humano no município do Rio de Janeiro.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar *E. coli* em amostras de queijo Minas Frescal comercializadas para fins de consumo humano no município do Rio de Janeiro.
- Analisar a ocorrência de resistência a antimicrobianos em cepas de *E.coli* isoladas a partir do alimento escolhido.
- Avaliar a diversidade de determinantes genéticos associados à resistência a antimicrobianos, detectados através de PCR.
- Detectar integrons de classe 1, 2 e 3 nos isolados positivos através de PCR.
- Caracterizar os grupos filogenéticos de *E. coli* através de PCR.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 AMOSTRAGEM

Foram avaliadas 30 amostras industrializadas de queijos Minas Frescal de diferentes marcas comerciais, obtidas em supermercados do município do Rio de Janeiro. As amostras foram adquiridas inteiras e em sua embalagem original, não foram adquiridas amostras já fracionadas no local de venda. Todas as amostras estavam dentro do prazo de validade estipulado pela indústria produtora e expostas a venda para o consumidor em balcões ou ilhas de exposição dentro dos supermercados.

Depois de compradas todas as amostras foram armazenadas em recipiente isotérmico, sendo mantida a temperatura inferior a 8°C, para o transporte até o local de análise. Esta é a temperatura recomendada pela Portaria nº 352 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento para queijos do tipo Minas Frescal (BRASIL, 1997)

#### 3.2 ISOLAMENTO DA *E. COLI*

Para o isolamento da *E. coli* foram utilizadas Placa 3M™ Petrifilm™ para Contagem de *E. coli*. O sistema Petrifilm™ é uma alternativa mais rápida ao método de plaqueamento convencional. Ele utiliza uma mistura desidratada de nutrientes (ágar vermelho violeta bile), agente geleificante (solúvel em água fria), um indicador de atividade glicuronidásica (5-bromo-4cloro-3-indolil-β-D-glicuronideo) e um indicador tetrazólico para facilitar a enumeração das colônias sobre um filme (FORSYTHE, 2002). Esses componentes são impregnados nas camadas internas de dois filmes, o superior em polipropileno e o inferior em polietileno, sobrepostos e fixos apenas na extremidade superior, o que confere ao produto maior facilidade para manuseio (BATTAGLINI et al., 2012).

O isolamento utilizando as Placas 3M™ Petrifilm™ foi dividido em 4 etapas conforme preconizado pelo próprio manual:

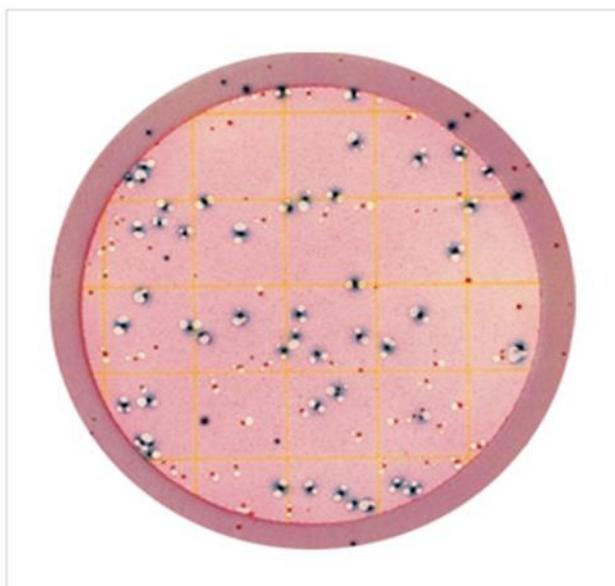
1) Preparo da amostra: Foi preparada uma diluição 1:10 ou superior da amostra. A amostra foi pesada num recipiente adequado, como saco para homogeneização ou outro recipiente estéril. Foi adicionada a quantidade adequada de água peptonada 0,1% e a amostra foi homogeneizada.

2) Inoculação: A Placa Petrifilm foi colocada em uma superfície plana. Levantou-se o filme superior e com a pipeta posicionada perpendicularmente à Placa Petrifilm foi colocado 1 ml da amostra no centro do filme inferior. O filme superior foi abaixado de forma a evitar a formação de bolhas de ar. Com o lado liso para baixo, o difusor foi colocado no filme superior sobre o inóculo e pressionado delicadamente para distribuir o inóculo na área circular antes do gel se formar.

3) Incubação: As placas foram incubadas por 48h+/- 2h a 45°C +/- 1°C com a face transparente para cima.

4) Interpretação: A contagem e identificação de colônias para *Escherichia coli* é evidenciada pela presença de colônias azuis com a formação de bolhas de gás. Isso ocorre, pois a enzima  $\beta$ -glucuronidase hidrolisa o substrato cromogênico do meio produzindo a cor azul (Figura 4)

Figura 4 – Imagem da Placa 3M™ Petrifilm™ após o isolamento da *E.coli*.



Fonte: Manual Placa 3M™ Petrifilm™ para Contagem de *E. coli* e coliformes

Após o isolamento foram realizadas mais duas etapas de Confirmação:

1) Confirmação microbiológica: Os isolados de *E.coli retirados da Placa Petrifilm* foram novamente plaqueados, agora em ágar EMB (*Eosin Methylene Blue Agar*) e incubados a 45°C por 24 h. Após a incubação foram retiradas as colônias de brilho verde metálico e essas plaqueadas em ágar TSA (*Trypticase soy agar*) e incubadas por mais 24 h a 45°C, após essa etapa foi feita a criopreservação das colônias em microtubos contendo 0,5 ml de caldo caseína e 0,1 ml de glicerol.

2) Confirmação genética: A presença do gene uid A (BEJ, 1991) foi examinada em todos os isolados estudados a fim de confirmar geneticamente que todos isolados estudados eram cepas de *E. coli* (Tabela 1).

### 3.3 TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA (TSA)

Todos os isolados de *E. coli* passaram pelo teste de sensibilidade antimicrobiana (TSA) para 17 agentes antimicrobianos: Para realização do teste foram utilizados discos impregnados com antimicrobianos: método de difusão em disco em ágar Mueller-Hinton, de acordo com os critérios do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (CLSI, 2015). A *E. Coli* ATCC 25929 foi utilizada como controle de qualidade do teste.

A quantidade de antibiótico presente em cada disco e abreviação dos agentes antimicrobianos que foram utilizados estão descritos no quadro 1.

Quadro 1- Antibióticos utilizados no Teste de Sensibilidade Antimicrobiana, suas respectivas classes e quantidades.

<b>Classe</b>	<b>Antibiótico</b>	<b>Quantidade no disco</b>
<b>B- lactâmico (penicilina)</b>	<b>Ampicilina (AMP)</b>	<b>10ug</b>
<b>B- lactâmico/ B-lactamase inibidor combinations</b>	<b>Amoxicilina/ ácido clavulânico (AMC)</b>	<b>20/10ug</b>
	<b>Ampicilina / sulbactam (SAM)</b>	<b>10/10ug</b>
<b>Tetraciclina</b>	<b>Tetraciclina (TE)</b>	<b>30ug</b>
<b>Cefalosporina (2º geração)</b>	<b>Cefoxitina (FOX)</b>	<b>30ug</b>
<b>Cefalosporina (3º geração)</b>	<b>Ceftriaxona (CRO)</b>	<b>30ug</b>
	<b>Ceftazidima (CAZ)</b>	<b>30ug</b>
<b>Cefalosporina (4º geração)</b>	<b>Cefepima (FEP)</b>	<b>30ug</b>
<b>Fluoroquinolona</b>	<b>Ciprofloxacina (CIP) 2º geração</b>	<b>5ug</b>
<b>Quinolona (1º geração)</b>	<b>Ácido nalidíxico (NA)</b>	<b>5ug</b>
<b>Carbapenêmico</b>	<b>Imipenem (IPM)</b>	<b>10ug</b>
	<b>Ertapenem (ETP)</b>	<b>10ug</b>
<b>Aminoglicosídeo</b>	<b>Gentamicina (CN)</b>	<b>10ug</b>
	<b>Amicacina (AK)</b>	<b>30ug</b>
	<b>Estreptomicina (S)</b>	<b>10ug</b>
<b>Inibidor da Via Folato</b>	<b>Sulfazotrim - trimetopim + sulfatoxazol (SXT)</b>	<b>30ug</b>
<b>Fenicóis</b>	<b>Cloranfenicol (C)</b>	<b>30ug</b>

O procedimento consiste no preparo de uma suspensão de bactérias de cultivo recente na escala 0,5 de Mac Farland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/ml), inoculação desta suspensão na superfície de uma placa de Agar Mueller Hinton, e adição dos discos de papel impregnados com antimicrobianos. Após a incubação em estufa, foi analisado o padrão de crescimento ou inibição ao redor de cada disco, sendo então medido o tamanho de cada halo e o resultado pesquisado em tabelas apropriadas do próprio CLSI, 2015 para determinar se a bactéria em análise é sensível, intermediária ou resistente ao antimicrobiano testado.

### 3.4 AMPLIFICAÇÃO DE GENES QUE PODEM CONFERIR RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

Todos os isolados que apresentaram resistência fenotípica a algum dos 17 antimicrobianos testados no TSA foram examinados quanto à presença de 24 genes de resistência antimicrobiana.

Foi detectada, através de ensaios de PCR e PCR multiplex a presença dos genes associados aos antimicrobianos descritos na tabela abaixo (Tabela 1):

Tabela 1. Genes, tamanhos e referências que foram utilizados para identificação genética de resistência antimicrobiana.

Gene	Tamanho (bp)	Referências
CTX	593	Monstein et al., 2007 Al- Agamy et al., 2014
Multiplex: TEM/ SHV/OXA	800/713/564	Dallene et al 2010
Tet A/ Tet B/ Tet C/ Tet D/ Tet E	372/288/379/436/442	Srinivasan, 2008.
Tet G	884	Ng, 2001.
MOX	520	
CIT	462	
DHA	405	Székely et al., 2013
EBC (MIR)	302	Pérez e Pérez and Hanson, 2002
ACC	346	
FOX	190	
Multiplex: GES/ PER/ VEB	398/520/648	Dallene et al 2010 Al- Agamy et al., 2014
OXA48	438	Poirel et al., 2011 Karuniawati et al., 2011
NDM	621	Poirel et al., 2011 Karuniawati et al., 2011
KPC	635	Azimi et al., 2013 Hong et al., 2012
IMP	188	Zeighami et al., 2014
VIM	390	Poirel et al., 2011 Karuniawati et al., 2011 Zeighami et al., 2014

### 3.5 DETECÇÃO DOS INTEGRONS

A presença dos genes *intl1*, *intl2*, *intl3* (que codificam para as classes 1, 2 e 3 integrases, respectivamente) e as regiões variáveis dos integrons de classe 1 e de classe 2 foram examinados através de PCR (Tabela 2) em todos os isolados de *E.coli* de acordo com o estudo de Ryu et al. (2012a).

Tabela 2. *Primers* e temperaturas de anelamento que foram utilizados para identificação dos integrons.

Region	Primer	DNA sequence (5'-3")	Tamanho (bp)	Temperatura de anelamento (°c)
intl1	int1-L	CTGCGTTCGGTCAAGGTTCT	882	68
	int1-F	GGAATGGCCGAGCAGATCCT		
	int2.F	CACGGATATGCGACAAAAAGGT		
intl2	int2.R	GTAGCAAACGAGTGACGAAATG	746	59
	int3.F	GCCTCCGGCAGCGACTTTCAG		
intl3	int3.R	ACGGATCTGCCAAACCTGACT	939	62
	5'CS	GCCATCCAAGCAGCAAG		
Intl1 região variável	3'CS	AAGCAGACTTGACCTGA	Variável	60
	hep74	CGGACGGCATGCACGATTTGTA		
Intl2 região variável	hep51	GATGCCATCGCAAGTACGAG	Variável	60

Todas as reações de PCR foram realizadas em um volume de 50 µL contendo 5 µL de tampão 10X, 50 pmol de cada pimer, 4 µL da solução de dNTP (2.5 mM de cada dNTP), 0,1 U/ µL de Taq Polimerase e 50 ng de DNA.

As reações de PCR foram realizadas sob as seguintes condições: Desnaturação inicial de 5 min a 94° C, seguida de 30 ciclos de desnaturação por 30 s a 94° C, anelamento de 30 s a temperatura variável de acordo com o integron pesquisado, extensão de 1 min a 72 ° C e uma etapa de extensão final de 5 min a 72°C.

### 3.6 CARACTERIZAÇÃO DE GRUPOS FILOGENÉTICOS DE *E.coli*.

#### 3.6.1 O método de Clermont et al., 2013 de filotipagem de *E. coli*

Clermont e colaboradores (2013) desenvolveram uma metodologia de quadruplex PCR que distingue os isolados de *E.coli* em 8 filogrupos já reconhecidos: A, B1, B2, C, D, E, F e o clade I (Tabela 3).

Tabela 3. Genes, tamanhos e referência que foram utilizados na PCR Quadruplex para caracterização filogenética de *E.coli*.

Gene	Tamanho (bp)	Referências
chuA	288	Clermont et al., 2013
yjaA	211	
TspE4.C2	152	
arpA	400	

Todas as reações de PCR foram realizadas em um volume de 20 µL contendo 2 µL de tampão 10X, 2 µM de cada dNTP, 2 U de Taq Polimerase, 3 µL de lisado bacteriano ou 2 µL de DNA e os *primers* apropriados.

As reações de PCR foram realizadas sob as seguintes condições: desnaturação 4 min a 94° C, 30 ciclos de 5 s a 94° C e 20 s a 59° C e um passo de extensão final de 5 min a 72 ° C.

### 3.6.2 Identificação de linhagens crípticas de *E. coli*:

Segundo Clermont e colaboradores (2013), quando o resultado é negativo para os quatro genes avaliados no quadruplex PCR (Tabela 3) é necessário confirmar se os isolados estudados são mesmo *E.coli*, isso é feito através de PCR para o gene uid A (BEJ, 1991), tal confirmação genética foi realizada logo após o isolamento das cepas de *E.coli* através da metodologia tradicional. Após a confirmação que os isolados realmente são *E.coli*, deve ser feita a PCR utilizando os *primers* para clados crípticos (Tabela 4) a fim de identificar se esses isolados são pertencentes a algum dos cinco clados crípticos existentes (CLERMONT ET AL., 2011).

Tabela 4. Genes, tamanhos e referência que foram utilizados na PCR para identificação de clados crípticos de *E. coli*.

Gene	Tamanho (bp)	Referências
aesI	315	
aesII	125	
chuIII	183	Clermont et al., 2011
chuIV	461	
chuV	600	

A reacção de PCR foi realizada em um volume total de 20  $\mu$ L contendo 2  $\mu$ L de tampão 10x, 20 pmol de cada iniciador, 2  $\mu$ M cada dNTP, 1 U de Taq polimerase, 3  $\mu$ L de lisado bacteriano ou 2  $\mu$ L de DNA. A PCR foi realizada nas seguintes condições: desnaturação 4 min a 94° C, 30 ciclos de 5s a 94° C e 30s a 63° C, e uma extensão final de 5 min a 72° C.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 RESULTADOS ISOLAMENTO DE *E.coli* EM QUEIJO MINAS FRESCAL

A maioria das amostras de queijo Minas Frescal avaliadas obtiveram na diluição 1:10 um número de isolados de *E.coli* considerado incontável. O que demonstra o nível de contaminação por esse microrganismo que esse alimento está susceptível. Para obtenção de isolados de *E.coli* padrão, ou seja, colônias de cor azul com formação de gás, foi necessário realizar a diluição da amostra a 1:1000 ou 1:10000.

### 4.2 RESULTADOS DO TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA

Todos os isolados foram testados no TSA e quinze apresentaram resistência a uma ou mais classes de antimicrobianos. Os resultados estão expostos na tabela 5.











## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 TESTE FENOTÍPICO (TSA) X TESTE GENÉTICO (PCR)

A discussão do trabalho será apresentada detalhando o resultado de cada isolado estudado, confrontando os resultados do teste fenotípico com o genético. A fim de facilitar a visualização os resultados foram demonstrados no Quadro abaixo (Quadro 2).

Quadro 2: Resultados Teste de Sensibilidade Antimicrobiana (TSA) X Polimerase Chain Reaction (PCR) de acordo com o isolado resistente de *E.coli* estudado

ISOLADOS																													
A		B		C		D		E		F		G		H		I		J		K		L		M		N		O	
TSA	PCR	TSA	PCR	TSA	PCR	TSA	PCR	TSA	PCR	TSA	PCR	TSA	PCR	TSA	PCR	TSA	PCR	TSA	PCR	TSA	PCR	TSA	PCR	TSA	PCR	TSA	PCR	TSA	PCR
Ampicilina	TEM	Tetraciclina	TEM	Ampicilina	TEM	Ampicilina	TEM	Ampicilina	TEM	Ampicilina	TEM	Ceftriaxona	TEM	Ceftriaxona	TEM	Estreptomicina	TEM	Ácido nalidíxico	TEM	Ampicilina	TEM	Ácido nalidíxico	TEM	Estreptomicina	TEM	Amicacina	TEM	Ampicilina	TEM
	VIM			Estreptomicina	VIM	Amoxicilina/ ac. Clavulânico		Estreptomicina	Integron I Var. 600	Cefoxitina	VIM	Ácido nalidíxico	VIM	Ácido nalidíxico	Integron III	Ácido nalidíxico			Imipenem	Integron I Var. 1100			Amoxicilina/ ac. clavulânico	Integron I	Estreptomicina	SHV	Ácido nalidíxico		
				Amoxicilina/ ac. Clavulânico	TET B	Cefoxitina				Integron I Var. 600	Cefepima											Integron I Var. 600	Ampicilina	Integron I Var. 1100	Ampicilina				
				Tetraciclina	Integron II						Ceftazidima												Ampicilina / sulbactam	Tetraciclina					
				Cefoxitina	Integron III																		Cefoxitina						
					Integron II Var. 1500																		Ceftriaxona						
																							Sulfazotrim						
																							Ácido nalidíxico (NA)						
																							Imipenem						
																							Ertapenem						
																							Ertapenem						
																							Cefepima						
																							Ertapenem						
																							Ceftazidima						

- Isolado M

O isolado "M" apresentou fenótipo de resistência para os seguintes antimicrobianos: ampicilina, amoxicilina/ ácido clavulânico, ampicilina/ sulbactam, cefoxitina, ceftriaxona, sulfazotrim, ácido nalidíxico, imipenem e ertapenem. Já no teste genético foram encontrados os genes: TEM, Integron I e I variável.

Segundo Karuniawati, Saharman, Lestari (2013), o integron de classe I é o integron mais frequentemente responsável por carrear genes de resistência e a produção da enzima  $\beta$ -lactamase é um dos mecanismos de resistência mais comum. Os genes frequentemente responsáveis por esta resistência são transportados pelos integrons de classe I. As enzimas são: serina- $\beta$ -lactamase de classe A (KPC), serina- $\beta$ -lactamase de classe D (OXA) e metalo- $\beta$ -lactamase de classe B (VIM, IMP, NDM, e NDM-1) (KARUNIAWATI, SAHARMAN, LESTARI, 2013).

Mohamed, Hassan, Ahmed (2016), avaliaram a prevalência de integrons de classe 1, 2, e 3 e resistência a carbapenêmicos em bactérias gram-negativas. Tal estudo detectou a presença de integron de classe I na maioria dos isolados resistentes a carbapenêmicos. Resultado semelhante ao encontrado no presente estudo, uma vez que dos três isolados com fenótipo de resistência para carbapenêmicos (imipenem e ertapenem), apenas um (isolado N) possuía o fenótipo de resistência para carbapenêmicos e não amplificou para integron. Os outros dois isolados (K e M) com fenótipo de resistência amplificaram para Integron I e/ou I variável.

Sendo assim, podemos associar os fenótipos de resistência encontrados neste estudo a ampicilina, amoxicilina/ ácido clavulânico, ampicilina/ sulbactam, imipenem e ertapenem a presença do Integron de classe I e de classe I variável neste isolado.

A presença do gene TEM pode estar relacionado à resistência aos antibióticos cefoxitina e ceftriaxona, segunda e terceira geração de cefalosporinas respectivamente. A revisão escrita por Rubin; Pitout (2014) descreveu mais detalhadamente essa relação entre a presença do gene e as resistências que ocasiona: A primeira  $\beta$ -lactamase do tipo TEM foi isolada pela primeira vez em 1965 na Grécia (PATERSON; BONOMO, 2005). A enzima foi nomeada para uma paciente Temoneira e conferia resistência à penicilina e à primeira geração de cefalosporinas (PATERSON E BONOMO, 2005). Só até a década de 1980 foram descobertos TEM 1, 2 e 13 mutantes com atividade de espectro estendido (PATERSON E BONOMO, 2005).

#### - Isolado C

O isolado “C” apresentou fenótipo de resistência para os seguintes antimicrobianos: ampicilina, estreptomicina, tetraciclina, cefoxitina e amoxicilina/ ácido clavulânico. Já no teste genético foram encontrados os genes: TEM, VIM, TET B e Integron I, II e II variável.

O fenótipo de resistência à tetraciclina pode nesse caso ser comprovado pela existência do gene TET B. As tetraciclinas compõem a classe de antimicrobianos quantitativamente mais usados na terapia animal, seguida pelos macrolídeos, lincosamidas, penicilinas, sulfonamidas, aminoglicosídeos, entre outros (SCHWARZ; CHASLUSDANCLA, 2001). Os principais mecanismos, descritos na literatura, atribuídos à resistência bacteriana a tetraciclina são a proteção ribossomal e o efluxo ativo, comumente encontrado em bactérias Gram-negativas (PEREIRA-MAIA et al., 2010). Como é o caso do microorganismo testado no presente estudo, a *E. coli*.

A confirmação do gene VIM junto aos genes de Integron I, II e II variável corrobora o já descrito por diversos autores (MIRIAGOU et. al., 2010; CARATTOLI, 2009; TATO et. al. 2010): A importância da sua disseminação mundial entre diferentes espécies de bactérias se deve a sua localização em elementos genéticos móveis, como o integron por exemplo.

Assim como no isolado M, a presença do integron I pode estar associado ao perfil de resistência a ampicilina e amoxicilina/ácido clavulânico. Dentre outros motivos, pela possível presença do gene VIM estar localizado no integron e este ser uma carbapenamase do tipo metalo- $\beta$ -lactamases.

A presença do gene TEM pode também estar envolvido na resistência a cefoxitina (2<sup>o</sup> geração de cefalosporinas).

#### - Isolado N

O isolado “N” apresentou fenótipo de resistência para: amicacina, estreptomicina, ampicilina, tetraciclina, cefoxitina, ceftriaxona, cefepima, ceftazidima, imipenem e ertapenem. No teste genético foram encontrados os genes: TEM e SHV.

Tradicionalmente, os isolados produtores de ESBL ( $\beta$ -lactamases de espectro ampliado), principalmente blaTEM e produtores de blaSHV, exibem co-resistência a aminoglicosídeos, tetraciclinas e sulfonamidas (CANTÓN; COQUE, 2006, MOROSINI et al., 2006). Tal evidência pode explicar o fato do isolado ter demonstrado resistência fenotípica aos aminoglicosídeos (amicacina, estreptomicina) e a tetraciclina.

Segundo Rubin; Pitout (2014), as enzimas  $\beta$ -lactamases SHV foram descritas pela primeira vez na década de 1970, SHV-1 demonstrou atividade contra as penicilinas e a primeira geração de cefalosporinas (LIVERMORE, 2008; MATTHEW, HEDGES, SMITH, 1979). Fato que no isolado estudado explica a presença de resistência a ampicilina, antibiótico que pertence ao grupo das penicilinas.

ESBLs de tipo SHV, mutantes das enzimas “progenitoras” SHV-1 e SHV-11, juntamente com ESBLs do tipo TEM, se destacaram na década de 1980 como causa da resistência à cefalosporina entre as *Enterobacteriaceae* (PITOUT, 2012). Tal fato justifica a ocorrência neste isolado especificamente, que contém os dois genes (TEM e SHV), do fenótipo de resistência a cefalosporinas de segunda, terceira e quarta geração (cefoxitina, ceftriaxona, ceftazidima, cefepima). As cefalosporinas são antibióticos enquadrados dentro do conceito de drogas betalactâmicas, pois possuem similaridade estrutural com as penicilinas. As cefalosporinas foram introduzidas na década de 60, pelo fato de as penicilinas não serem mais efetivas contra estafilococos. São classificadas em cefalosporinas de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> geração. Atualmente o grupo mais abrangente das cefalosporinas é o das de terceira geração, devido às suas características farmacocinéticas e ao seu ampliado espectro de ação (SILVA et al., 2014).

Bora e colaboradores (2014) realizaram um estudo para determinar a presença de genes blaTEM, blaSHV e blaCTXM em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL. Entre os três genótipos ESBL incluídos no seu estudo, o genótipo mais prevalente em isolados produtores de ESBL foi o blaCTXM em *E. coli* (88,67%) e blaTEM em *K. pneumoniae* (77,58%). O genótipo ESBL menos prevalente foi blaSHV e a taxa de prevalência de blaSHV em isolados de *K. pneumoniae* (50,57%) foi maior que a de *E. coli* (13,20%). Por outro lado, verificou-se que a combinação de blaTEM e blaCTXM possuía 33,01% em isolados de *E. coli*, enquanto que blaTEM, blaSHV e blaCTXM juntos possuíam 20,11% dos isolados de *K. pneumoniae*. Tal resultado diverge do resultado encontrado no presente estudo, onde foi confirmada a presença dos dois genes juntos (blaTEM e blaSHV) em apenas um (6,6%) dos isolados de *E. coli* (isolado M) retirado a partir de uma amostra de queijo Minas Frescal. Em todos os outros isolados testados (100%) a presença do gene TEM foi confirmada.

Já o trabalho de Juma e colaboradores (2016) apresentou resultado semelhante ao avaliar a presença de genes blaTEM e blaSHV em isolados de *E. coli*: A presença do gene TEM foi prevalente quando comparada ao gene SHV. Resultado corroborado também pelo estudo de Freitas e colaboradores (2003).

- Isolados: B, O, I e J

Os isolados apresentaram fenótipo de resistência a diferentes classes de antimicrobianos, como pode ser visualizado no quadro 1. No entanto não foi confirmado o genótipo de resistência para todas as classes de antibióticos.

Esses isolados amplificaram apenas para o gene TEM; gene que amplificou em 100% das amostras avaliadas no presente estudo. A presença do gene TEM provavelmente está associado à resistência a ampicilina, ceftriaxona e cefoxitina.

Já o fenótipo de resistência ao ácido nalidixico, antibiótico pertencente à classe das quinolonas possivelmente se deve a presença nestes isolados de outros elementos móveis que possam carrear os genes de resistência a esta classe de antibiótico. Segundo Cunha e colaboradores (2016), normalmente os mecanismos de resistência a classe das quinolonas e a terceira geração de cefalosporinas são mediados por plasmídeos e envolvem a produção de enzimas que hidrolisam os antibióticos, como as ESBL ou bombas de efluxo e proteção do alvo da molécula dos antimicrobianos, no caso da resistência a quinolonas (BUSH,2010; JACOBY, STRAHILEVITZ, HOOPER, 2014). Elementos genéticos móveis como plasmídeos, transposons e integrons têm um papel crucial na disseminação e evolução de genes que codificam essas enzimas entre bactérias (PERRY, WESTMAN, WRIGHT,2014). No presente estudo não foi avaliada a presença de outros elementos móveis além dos integrons.

#### - Isolado A

O isolado “A” apresentou no TSA fenótipo de resistência para ampicilina. Já no PCR apresentou genótipo para TEM e VIM

Como já discutido acima, a presença do gene TEM pode conferir resistência a classe das penicilinas.

Dentro das carbapenemases, as metalo- $\beta$ -lactamases de classe B, como VIM, IMP e NDM, desempenham um papel importante devido à sua disseminação mundial entre diferentes espécies bacterianas, que se baseia na sua localização em elementos genéticos móveis (FISHER et. al.,2012).

Fisher e colaboradores (2012) ao avaliarem a presença do gene blaVIM em *E. coli* constataram que os genes blaVIM foram encontrados em integrons e/ou transposons diferentes. Fato que difere do resultado encontrado no presente estudo, onde a presença do gene foi confirmada, mas não houve confirmação de integron. Sugerindo que o gene VIM está em outro elemento móvel que não integron.

#### - Isolado E

Apresentou fenótipo de resistência para os antibióticos ampicilina e estreptomicina. Já no teste genético amplificou para TEM e Integron de classe I variável.

Como já exposto acima, a resistência a ampicilina pode ser explicada devido a presença tanto do gene TEM como do Integron de classe I variável. Segundo Paterson e Bonomo (2005), desde sua descoberta a presença do gene TEM já conferia resistência à penicilina. Por outro lado, segundo Karuniawati, Saharman, Lestari (2013), os genes frequentemente responsáveis pela produção da enzima  $\beta$ -lactamase são normalmente transportados pelos integrons de classe I. Sendo assim podemos sugerir que o gene blaTEM esteja dentro do integron de classe I variável.

Já a resistência à estreptomicina, que faz parte da classe dos aminoglicosídeos, também se deve provavelmente a presença do gene TEM, uma vez que os isolados produtores de ESBL principalmente blaTEM exibem co-resistência a aminoglicosídeos (CANTÓN; COQUE, 2006, MOROSINI et al., 2006).

#### - Isolado F

O isolado apresentou resistência fenotípica a ampicilina e cefoxitina, e amplificou para TEM, VIM e Integron de classe I variável.

Os resultados apresentados por esse isolado se assemelham aos resultados do isolado C e as referências utilizadas para justificar os resultados fenotípicos se aplicam também a esse isolado: A presença do gene VIM associado ao integron, uma vez que este gene normalmente está localizado em elementos móveis (MIRIAGOU et. al., 2010; CARATTOLI, 2009; TATO et. al. 2009) e sua relação com a resistência a ampicilina. A resistência fenotípica a segunda geração de cefalosporina, aqui representada pelo antimicrobiano cefoxitina também foi justificada acima pela presença do gene TEM.

- Isolados: G, H e L

O isolado “G” apresentou resistência fenotípica a antibióticos de terceira e quarta geração de cefalosporinas (ceftriaxona, ceftazidima e cefepima) além de ácido nalidíxico. Na parte molecular, apresentou genótipo de resistência a TEM e VIM. Já o isolado “H” apresentou fenótipo de resistência a ceftriaxona e ácido nalidíxico e genótipo de resistência para TEM e Integron III. Por último o isolado “L”, que apresentou resistência fenotípica a ácido nalidíxico e genótipo para: TEM, VIM e Integron de classe I variável. Por terem tido resultados relativamente semelhantes estes isolados serão discutidos juntos.

A resistência fenotípica as diversas classes de cefalosporinas apresentadas pelos isolados G e H podem ser explicadas pela presença do gene TEM, como já discutido anteriormente.

Já a presença do fenótipo de resistência ao ácido nalidíxico (quinolona), comum aos três isolados, também pode ser explicada devido à presença do gene TEM. Segundo Hadizadeh e colaboradores (2017), os organismos produtores de ESBL são resistentes não apenas aos betalactâmicos, mas a maioria das outras famílias de antibióticos, como aminoglicosídeos e quinolonas, fato que resulta na limitação de opções terapêuticas

ESBLs são enzimas comumente derivadas das famílias de enzimas TEM ou SHV (MEHRGAN; RAHBAR, 2008). O aumento de resistência à classe das quinolonas entre patógenos humanos gram-negativos também é uma preocupação (POMBA et al, 2009; JEONG et al, 2005).

Diversos mecanismos contribuem para a resistência a quinolonas; os genes *qnr* mediados por plasmídeo são um mecanismo comum de resistência a quinolona (NORDMANN; POIREL, 2005). Tem sido sugerido que a relação entre o gene *qnr* e ESBLs está coassociada com genes que codificam ESBL (HADIZADEH et al, 2017). Níveis elevados de resistência a quinolona em cepas clínicas de *E. coli* e outras bactérias produtoras de ESBL foram reportados em diversos estudos (JIANG et al, 2008; POIREL et al, 2006; LAVIGNE et al, 2006).

Contudo, a maioria dos estudos recentes sobre genes ESBL descobriu que tais genes foram localizados em integrons. Assim sendo, os genes ESBLs podem ser localizados em integrons e facilmente transferidos para várias bactérias (HADIZADEH et al, 2017).

Os estudos descritos acima corroboram os resultados encontrados, uma vez que a resistência a quinolona, no trabalho representado pelo ácido nalidíxico, esteve sempre associada à presença do gene TEM, e em dois dos três isolados foi detectada a presença do integron, confirmando que os genes que codificam para as ESBL podem estar localizados no integron.

- Isolado K

Apresentou resistência fenotípica a ampicilina e imipenem; no teste molecular de PCR amplificou para TEM e Integron de classe I variável.

O estudo de Evangelista-Barreto et al, 2016 avaliou a presença de *Escherichia coli*, bem como o perfil de resistência antimicrobiana entre os isolados bacterianos em queijos artesanais produzidos e comercializados em Cruz das Almas, Bahia. A bactéria *Escherichia coli* apresentou resistência fenotípica a ampicilina e imipenem em 16,7% das amostras estudadas; resultado semelhante ao encontrado no presente estudo (13,3%).

Os carbapenêmicos, como o imipenem, constituem a terapia antimicrobiana de escolha para o tratamento de infecções hospitalares graves por Gram negativos, no entanto, o uso exagerado de antibióticos, principalmente cefalosporinas de espectro ampliado, associado às falhas no controle da infecção, tem favorecido o aparecimento da resistência (POSSEBON; CAMARGO, 2003; EVANGELISTA-BARRETO et al, 2016).

A existência de cepas de *E. coli* resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos e veiculadas em queijos é preocupante, uma vez que a maioria dos genes para a produção de enzimas  $\beta$ -lactamases, residem em regiões móveis do DNA bacteriano, tornando-os facilmente transferíveis para outras bactérias (SPINDLER et al., 2012). Tal trabalho corrobora o resultado encontrado no presente estudo, onde o isolado apresentou resistência fenotípica a ampicilina e amplificou o gene para Integron de classe I variável, sugerindo que o gene que codifica para a resistência a ampicilina está no integron de classe I variável.

## 5.2 ESTUDO FILOGENÉTICO

No estudo filogenético, nenhum isolado amplificou para nenhum dos 4 genes descritos na PCR quadruplex descrita por Clermont e colaboradores (2013). Fato que demonstra que nenhum isolado estudado pertence a um dos 8 filogrupos (A, B1, B2, C, D, E, F e o clado I) já reconhecidos.

Doumith e colaboradores (2012) já haviam atentado para as incongruências apresentadas pelo primeiro trabalho de Clermont e colaboradores (2000) que descrevia um triplex PCR para atribuir rapidamente isolados de *E. coli* a um dos quatro principais grupos filogenéticos: B1, B2, e D. Doumith et al, 2012 encontraram ampliações de PCR inconsistentes ou baixa eficiência de amplificação que levaram alguns isolados a serem atribuídos a um filogrupo aparentemente anômalo. Outros grupos de estudo também relataram perfis incomuns de PCR ou relataram incongruência entre o tipo de sequência multilocus (MLST) e o tipo de grupo filogenético atribuído para alguns isolados (MENDONÇA et al, 2011; MOLINA-LOPEZ et al. 2011; RUIZ et al, 2011; SMET et al. 2010).

O método utilizado no presente estudo foi retirado do trabalho de Clermont e colaboradores (2013). A metodologia descrita neste trabalho foi aprimorada a partir da revisão do estudo publicado no ano 2000 do mesmo grupo de pesquisadores (CLERMONT et al, 2000). Nesse caso, segundo Clermont e colaboradores (2013), a revisão do método trouxe melhoria na especificidade e detecção de novos filogrupos. No entanto ao avaliarmos os resultados encontrados no presente estudo, podemos mais uma vez constatar incongruência nos mesmos, uma vez que nenhum isolado amplificou para nenhum dos 4 genes descritos.

Foi então realizada a PCR para clados crípticos (CLERMONT et al, 2011), conforme solicitado pela literatura (CLERMONT et al, 2013) a fim de identificar se esses isolados são pertencentes a algum dos cinco clados crípticos existentes. Tal investigação foi realizada e o resultado foi negativo para os 5 clados crípticos avaliados; não sendo possível então a caracterização filogenética dos isolados através da metodologia utilizada.

Existem atualmente três esquemas de MLST para *E. coli*, afim de determinar o filogrupo ou o complexo clonal de uma estirpe (CLERMONT, GORDON, DENAMOUR, 2015). Linhagens crípticas altamente divergentes no nível dos nucleótidos, mas semelhantes fenotípicamente a *E. coli*, foram relatadas e denominadas *Escherichia* clades I a V (CLERMONT et al., 2011; LUO et al., 2011; WALK et al., 2009). Para evitar o tempo e o custo associados ao MLST tradicional, vários métodos alternativos foram desenvolvidos para determinar a identidade de estirpe. O método baseado em PCR foi proposto inclusive para identificar os clados crípticos de *Escherichia* (CLERMONT et al., 2011).

Clermont e colaboradores (2015) relatam em seu estudo que deve-se acrescentar uma advertência para todas essas abordagens, como as PCR são baseadas em um ou dois *loci*; embora a *E. coli* tenha uma estrutura clonal, ocorrem eventos de recombinação. Logo, pode-se esperar que em alguns casos estes métodos que dependem de um ou dois *loci* apresentem resultados errôneos devido a eventos de recombinação.

Walk e colaboradores (2009) avaliaram linhagens crípticas do gênero *Escherichia* através de MLST (Multi locus sequence type). A análise demonstrou que há pelo menos 5 clados de *Escherichia* sem nome. *E. Coli*, CI, CIII e CIV são linhagens jovens, tendo divergido nos últimos 19 a 31 milhões de anos. A causa da incongruência filogenética é muitas vezes pouco clara porque é difícil diferenciar os efeitos da mutação, recombinação e seleção natural. Outro estudo comparando as filogenias de genes únicos de 1.878 genes nucleares em 20 genomas de *E. coli* descobriu que mais da metade das árvores (55%) eram incongruentes (TOUCHON et al, 2009).

Sugere-se então, que a impossibilidade de caracterização filogenética dos isolados de *E.coli* estudados oriundos de queijo Minas Frescal, se deva a fenômenos genéticos de recombinação e transferência de genes. Fato este, que torna as PCR para filogrupos e clados crípticos inespecíficas.

## 6. CONCLUSÃO

O estudo verificou a presença de incontáveis isolados de *E.coli* na maioria das amostras de marcas comerciais de queijo Minas Frescal. Fato que por si só já demonstra contaminação bacteriana de origem fecal neste tipo de alimento.

Trinta isolados de *E.coli* provenientes de queijo Minas Frescal foram testados quanto à resistência a antimicrobianos, quinze (50%) apresentaram resistência fenotípica a uma ou mais classes de antimicrobianos. Esses mesmos isolados ao serem testados quanto a presença de genes de resistência apresentaram todos (100%) resistência a no mínimo um dos genes testados, o que na maioria dos casos corrobora o fenótipo apresentado.

A presença do integron foi confirmada em 46,6% dos isolados resistentes testados, demonstrando a importância deste na disseminação de genes de resistência entre bactérias.

A caracterização filogenética dos isolados através das metodologias utilizadas não foi possível; uma vez que nenhum isolado se mostrou pertencente aos filogrupos ou clados crípticos descritos nas metodologias.

Espera-se que o trabalho desenvolvido possa colaborar na geração de dados que melhorem a caracterização das *E. coli* antibiótico resistentes presentes em queijo Minas Frescal e sua disseminação através deste alimento. Fato este que permitirá que sejam estudadas novas estratégias para prevenir os problemas gerados por esse microrganismo, e tornar os tratamentos com antibióticos mais eficientes.

Considera-se interessante promover novos estudos sobre cepas de *E. coli* através da caracterização filogenética, a fim de termos uma perspectiva até mesmo global deste microrganismo, possibilitando a realização de uma análise molecular e epidemiológica mais ampla e detalhada.

No âmbito da Vigilância Epidemiológica e Sanitária considera-se de grande valia estudos relacionados à administração de antimicrobianos em criações animais voltados para a produção de alimentos. Uma vez que esta é a principal forma das bactérias presentes no trato gastro intestinal animal adquirirem resistência.

Ainda visando a Vigilância Sanitária, estudos sobre as Boas Práticas de Fabricação e Análise de Pontos Críticos de Controle na produção deste alimento são considerados de extrema importância, uma vez que através destes conseguir-se-ia mapear as etapas críticas de produção no que diz respeito a contaminação microbiológica do alimento e atuar mais especificamente nestes pontos prevenindo a contaminação e tornando o alimento inócuo para o consumo humano.

Espera-se ainda que este trabalho sirva como alicerce para novos estudos e políticas de saúde pública para que o alimento não venha a ser um reservatório ou transmissor de bactérias multirresistentes ao homem.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Rede de comunicação, vigilância e investigação de surtos em alimentos- RCVISA. Disponível em: < [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/aulas/i\\_rcvisa/fortalecimento\\_investigacao\\_diana.ppt](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/aulas/i_rcvisa/fortalecimento_investigacao_diana.ppt) >. Acesso em 17 de setembro de 2012.

AL-AGAMY, M. H; SHIBL, A. M; ALI, M. S; KHUBNANI, H; RADWAN, H. H; LIVERMORE, D. M. Distribution of  $\beta$ -lactamases in carbapenem-non-susceptible *Acinetobacter baumannii* in Riyadh, Saudi Arabia. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 2, p. 17–21, 2014.

ALEKSHUN, M. N; LEVY, S. B. Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the mar regulon. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 41, p. 2067–2075, 1997.

ALEXANDER, T. W; INGLIS, G. D; YANKE, L. J; TOPP, E; READ, R. R; REUTER, T; ET AL. Farm-to-fork characterization of *Escherichia coli* associated with feedlot cattle with a known history of antimicrobial use. **Int. J. Food Microbio**, v.137, p.40–48, 2010.

ALMEIDA DE, J. C; PAULA DE, C. M. S; SVOBODA, W. K; LOPES, M. O; PILONETTO, M. P; ABRAHÃO, W. M; GOMES, E. C. Epidemiological profile of foodborne diseases outbreaks occurred in Parana state, Brazil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 34, n. 1, p. 97-106, jan./jul. 2013

ALVES, C. C. C. **Comportamento da *Escherichia coli* em queijo minas frescal elaborado com utilização de *Lactobacillus acidophilus* e acidificação direta com ácido láctico**. 2010. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)- Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2010.

ARAKAWA, Y; MURAKAMI, M; SUZUKI, K; ITO, H; WACHAROTAYANKUN, R; OHSUKA, S; et al. A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, p. 1612–1625, 1995.

AZIMI, L; LARI, A. R; TALEBI, M; NAMVAR, A. E; SOLEYMANZADEH-MOGHADAM, S. Evaluation of Phenotypic Methods for Detection of *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase-Producing *K. Pneumoniae* in Tehran. **J Med Bacteriol**, v.2, n. 3/ 4, p. 26-31, 2013.

BAKER, C.S.; PALUMBI, S.R. Which whales are hunted. A molecular genetic approach to monitoring whaling. **Science**, 265, p. 1538–1539, 1994.

BATTAGLINI, A. P. P; FAGNANI, R; TAMANINI, R; BELOTI, V. Qualidade microbiológica do ambiente, alimentos e água, em restaurantes da Ilha do Mel/PR. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 741-754, 2012.

BAUER, A. W, KIRBY, W. M, SHERRIS, J. C, TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Amer. J. Clin. Pathol**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BAYLIS, C. Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by Verocytotoxin producing Escherichia coli. **Int J Dairy Technology**, v. 62, n.3, p.293-307, 2009.

BEATTY, M; ADCOCK, P; SMITH, S. Epidemic diarrhea due to enterotoxigenic Escherichia coli. **Clinical Infectious Diseases**, v.42, p.329–34, 2006.

BEJ, A. K; DICESARE, J. L; HAFF, L; ATLAS, R. M. Detection of Escherichia coli and Shigella spp. in Water by using the Polymerase Chain Reaction and Gene Probes for uid. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, v.4, p. 1013-1017. 1991.

BERGTHORSSON, U; OCHMAN, H. Distribution of Chromosome length variation in natural isolates of Escherichia coli. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 15, n. 1, p. 6–16, 1998.

BOWER, C. K; DAESCHEL, M. A. Resistance responses of microorganisms en food environments. **Int. J. Food. Microbiol**, v. 50, p. 33-34, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 4, de 01 de março de 2004. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade do Queijo Minas Frescal. **Diário Oficial da União**, Brasília, 05 mar. 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 352, de 04 de setembro de 1997. Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Queijo Minas Frescal. **Diário Oficial da União**, 08 set. 1997, 3 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual integrado de prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília: **Editora do Ministério da Saúde**, 2010. 158 p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual\\_integrado\\_vigilancia\\_doencas\\_alimentos.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_integrado_vigilancia_doencas_alimentos.pdf). Acesso em: 10 mai. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância epidemiológica das doenças transmitidas por alimentos no Brasil 1999 – 2004. **Boletim Eletrônico Epidemiológico**, Brasília, DF, 2005, n. 6, p. 1.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. **Diário Oficial da União**, 03 jan. 2001, Seção 1, p.1.

BUSH, K. Bench-to-bedside review: the role of beta-lactamases in antibiotic-resistant Gramnegative infections. **Crit. Care**, v. 14, p. 224, 2010.

CAMPOS, M. R. H; ANDRÉ, M. C. D. P. B; BORGES, L. J; KIPNIS, A; PIMENTA, F. C; SERAFINI, A. B. Genetic heterogeneity of *Escherichia coli* strains isolated from raw milk, minas frescal cheese, and food handlers. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 61, n. 5, p. 1203-1209, 2009.

CARATTOLI, A. Importance of integrons in the diffusion of resistance. **Vet. Res**, v. 32, p. 243–259, 2001.

CARATTOLI A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae, **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, p. 2227-38, 2009.

CARDOSO, L; ARAÚJO, W. M. C. Parâmetros de qualidade em queijos comercializados no Distrito Federal, no período de 1997– 2001. **Higiene Alimentar**, v. 18, n. 123, p. 49-53, 2004.

CARDOSO, P; MARIN, J. M. Resistência antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli* provenientes de queijo muçarela artesanal produzido no Brasil. **Ars Veterinaria**, v. 30, n. 2, p. 104-108, 2014.

CDC. **Antibiotic Resistance Questions and Answers**. 2015. Disponível em: <https://www.cdc.gov/getsmart/community/about/antibiotic-resistance-faqs.html>. Acesso em: 3 jul. 2017.

CLERMONT, O; BONACORSI, S; BINGEN, E. Rapid and Simple Determination of the Escherichia coli Phylogenetic Group. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, p. 4555- 4558, 2000.

CLERMONT, O; CHRISTENSON, J. K; DENAMUR, E; GORDON, D. M. The Clermont Escherichia coli phylo-typing method revised: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n.1, p. 58–65, 2013.

CLERMONT, O; GORDON, D; DENAMOUR, D. Guide to the various phylogenetic classification schemes for Escherichia coli and the correspondence among schemes. **Microbiology**, v. 161, p. 980–988, 2015.

CLERMONT, O; GORDON, D. M; BRISSE, S; WALK, S. T; DENAMUR, E. Characterization of the cryptic Escherichia lineages: rapid identification and prevalence. **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 9, p. 2468–2477, 2011.

CLSI. CLSI document M100-S20. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2015.

COGHLAN, A. Animal antibiotics threaten hospital epidemics. **New Scientist**. v. 7, p. 151, 1996.

COSTA, M. M; MALBONI, F; WEBER, S. S; FERRONATO, A. I; SCHRANK, I. S; VARGAS, A. P. C. Patotipos de Escherichia coli na suinocultura e suas implicações ambientais e na resistência aos antimicrobianos. **Arquivo Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 76, n. 3, p. 509-516, 2009.

CUNHA, A.S.; CUNHA, M.R. Toxinfecção alimentar por *Staphylococcus aureus* através do leite e seus derivados, bem como o elevado potencial patogênico de resistência às drogas. **Saúde e Ambiente em Revista**, v. 2, n. 1, p. 105-114, 2007.

CUNHA, M. P; FRANCO, L. S; CARVALHO, V. M; MORENO, A. M; KNÖBL, T. Plasmídeos e genes de resistência às quinolonas e cefalosporinas de terceira geração em amostras clínicas e comensais de Escherichia coli isoladas de frangos de corte, poedeiras e perus no Brasil. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 14, n. 1, p. 93-94, 2016.

DALLENNE, C; DA COSTA, A; DECRE´, D; FAVIER, C; ARLET, G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, p. 490–495, 2010.

DEL FIOL, F. S; LOPES, L. C; TOLEDO, M. I; de BARBERATO-FILHO, S. Perfil de prescrições e uso de antibióticos em infecções comunitárias. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** [online], v. 43, n. 1, p. 68-72, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v43n1/a15v43n1>. Acesso em: 17 mai. 2017

DE SÁ, C. M. F. **ESBL em enterobactérias no Centro Hospitalar Póvoa de Varzim/Vila do Conde**. 2010. 96 f. Dissertação (Mestrado em microbiologia) - Universidade de Aveiro, Aveiro, 2010

DEVASIA, R. A; JONES, T. F; WARD, J. Endemically acquired foodborne outbreak of enterotoxin producing *Escherichia coli* serotype O169:H41. **American Journal of Medicine**, v. 119, p. 168, 2006.

DIAS, M. T. **Caracterização genotípica e avaliação da susceptibilidade antimicrobiana de cepas patogênicas de *Escherichia coli* isoladas de queijo minas frescal**. 2011. Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária)- Biologia Parasitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Rio de Janeiro, 2011.

ECDC/EMEA Joint Working Group. ECDC/ EMEA Joint Technical Report: **The bacterial challenge: time to react**. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2009. Disponível em: [http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Forms/ECDC\\_DispForm.aspx?ID=444](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Forms/ECDC_DispForm.aspx?ID=444), Acesso em 9 de junho de 2017.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Leite. **Estatísticas do Leite**. 2010. Disponível em: [www.cpgl.embrapa.br](http://www.cpgl.embrapa.br). Acesso em 10 de setembro de 2012.

ERLICH, H.A. **PCR: technology: principles and applications for DNA amplification**. New York/Oxford: Oxford University Press. 1992.

EVANGELISTA-BARRETO, N. S; SANTOS, G. C. F; SOUZA, J. S; BERNARDES, F. S; SILVA, I. P. Queijos artesanais como veículo de contaminação de *Escherichia coli* e estafilococos coagulase positiva resistentes a antimicrobianos. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 10, n. 1, p. 55 – 67, jan – marc. 2016.

FERREIRA, R. M; SPINI, J. C. M; CARRAZZA, L. G; SANTA'ANA, D. S; OLIVEIRA, M. T; ALVES, L. R; CARRAZZA, T. G. Quantificação de coliformes totais e termotolerantes em queijo Minas Frescal artesanal. **PUBVET**, v. 5, n. 5, Art 1022, 2011.

FISCHER, J; RODRÍGUEZ, I; SCHMOGER, S; FRIESE, A; ROESLER, U; HELMUTH, R; GUERRA, B. Escherichia coli producing VIM-1 carbapenemase isolated on a pig farm. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 7, p. 1793-1795, 2012.

FORSYTHE, S. J. Microbiologia da segurança alimentar. Trad. Maria Carolina Minardi Guimarães e Cristina Leonhardt – Porto Alegre: **Artmed**, p. 216-211, 2002.

FREITAS, A. L. P. D; MACHADO, D. P; SOARES, F. D. S. C; BARTH, A. L. Beta-lactamases de espectro ampliado em Klebsiella spp e em Escherichia coli obtidas em um hospital escola brasileiro: detecção, prevalência e tipagem molecular. Brazil. **J. Microbiol.**, v. 34, p. 344-348, 2003.

FURTADO, M. M. **Principais Problemas dos Queijos: Causas e Prevenção**. São Paulo: Fonte Comunicações e Editora, 1999. p. 176.

GONÇALVES, F. A; NETO, M. A; BEZERRA, J. N. S; MACRAE, A; SOUSA, O. V; FONTELES-FILHO, A. A; VIEIRA, R. H. S. F. Antibacterial activity of guava, psidium guajava linnaeus, leaf extracts on diarrhea-causing enteric bacteria isolated from seabob shrimp, Xiphopenaeus kroyeri (HELLER). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 1, p. 11-15, 2008.

GONZALEZ A. G. M; ROSA A. C. P; ANDRADE J. R. C; TIBANA A. Enteropathogenicity markers in Escherichia coli strains isolates from soft white cheese and poultry in Rio de Janeiro, **Brazil Food Microbiol**, v. 17, n. 3, p. 321-328, 2000.

GORDON, D. M., COWLING, A. The distribution and genetic structure of Escherichia coli in Australian vertebrates: host and geographic effects. **Microbiology**, USA, v. 149, p. 3575- 3586, 2003.

GORDON, D. M. The influence of ecological factors on the distribution and genetic structure of Escherichia coli. In: NEIDHARDT, F. et al. **Escherichia Coli and Salmonella Typhimurium: Cellular and Molecular Biology**. Washington DC, USA: American Society for Microbiology, 2004. [Online] [http://www.ecosal.org/ecosal/index.jsp\(2004\)](http://www.ecosal.org/ecosal/index.jsp(2004)).

GUERIN, E; CAMBRAY, G; SANCHEZ-ALBEROLA, N; CAMPOY, S; ERILL, I; DA RE, S; GONZALEZ-ZORN, B; BARBÉ, J; PLOY, M. C; MAZEL, D; The SOS Response Controls Integron Recombination. **Science**, v. 324, n. 5930, p. 1034, 2009.

GUIMARAES, A. G; CARDOSO, R. C. V.; AZEVEDO, P. F.; MENESES, R. B. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de queijos coalho. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 2, p. 259-265, 2012.

GUTIERREZ, L. M. GARCIA LOPEZ, M. L; OTERO, A; GARCIA FERNANDEZ, M. C; MORENO, B. Incidence of staphylococci in ovine mastitic milk and antibiotic susceptibility of the strains. **Milchwissenschaft**, v. 45, p. 778-781, 1990.

HADIZADEH, M; NOROUZI, A; TAGHADOSI, R; MOHEBI, S; MOHAMMADI, M; HASANZADEH, A; MOGHADAM, M. T. Prevalence of qnr, intl, and intl genes in extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Escherichia coli isolated from clinical samples in Iran. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v.16, n. 1, p. 141-147, 2017.

HOCHHUT, B; LOTFI, Y; MAZEL, D; FARUQUE, S. M; WOODGATE, R; WALDOR, M. K. Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in vibrio cholerae O139 and O1 SXT constins. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, p. 2991–3000, 2001.

HONG, S. S; KIM, K; HUH, J. Y; JUNG, B; KANG, M. S; HONG, S. G. Multiplex PCR for Rapid detection of genes encoding class A carbapenemases. **Ann Lab Med**, v. 32, p. 359-361, 2012.

JACOBY, G. A; STRAHILEVITZ, J; HOOPER, D. C. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance. **Microbiol Spectr**, v. 2, p. 1-24, 2014.

JEONG, J-Y; YOON, H. J; KIM, E. S; LEE, Y; CHOI, S-H; KIM, N. J; WOO, J. H; KIM, Y. S. Detection of qnr in clinical isolates of Escherichia coli from Korea. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 6, p. 2522-2524, 2005.

JIANG, H; TANG, D; LIU, Y; ZHANG, X; ZENG, Z; XU, L; HAWKEY, P. M. Prevalence and characteristics of b-lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in Escherichia coli isolated from farmed fish in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p.1-4, 2012.

JIANG, X; SHI, L. Distribution of tetracycline and trimethoprim sulfamethoxazole resistance genes in aerobic bacteria isolated from cooked meat products in Guangzhou. **China Food Control**, v. 26, 2012.

JIANG, Y; ZHOU, Z; QIAN, Y; WEI, Z; YU, Y; HU, S; LI, L. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr and aac (6')-Ib-cr in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in China. **J Antimicrob Chemother**, v. 61, n. 5, p. 1003-1006, 2008.

JOHNSON, J. R; DELAVARI, P; KUSKOWSKI, M; STELL, A L. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence associated traits in *Escherichia coli*. **The Journal of Infectious Diseases**, USA, v. 183, p. 78-88, jan., 2001.

JOHNSON, J. R; OSWALD, E; O'BRYAN, T. T; KUSKOWSKI, M. A; SPANJAARD, L. Phylogenetic Distribution of Virulence-Associated Genes among *Escherichia coli* Isolates Associated with Neonatal Bacterial Meningitis in The Netherlands. **The Journal of Infectious Diseases**, USA, v. 185, p. 774-784, mar. 2002.

JOUINI, A; BEN SLAMA, K; SÁENZ, Y; KLIBI, N; COSTA, D; VINUÉ, L; ARAZAGA, M; BOUDABOUS, A; TORRES, C. Detection of multiple-antimicrobial resistance and characterization of the implicated genes in *Escherichia coli* isolates from foods of animal origin in Tunis. **Journal of Food Protection**, v. 72, p. 1082-1088, 2009.

JUMA, B. W; KARIUKI, S; WAIYAKI P. G; MUTUG, M. M; BULIMO, W. D. The prevalence of TEM and SHV genes among Extended-Spectrum Beta-Lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. **African Journal of Pharmacology and Therapeutics.**, vol. 5, n. 1, p. 1-7, 2016.

KARUNIAWATI, A; SAHARMAN, Y. R; LESTARI, D. C. Detection of carbapenemase encoding genes in enterobacteriace, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* isolated from patients at intensive care unit cipto Mangunkusumo Hospital in 2011. **The Indonesian Journal of Internal Medicine**, v. 45, n. 2, 2013.

KLEIN, G; PACK, A; REUTER, G. Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany. **Appl. Environ. Microbiol**, v. 64, p. 1825-1830, 1998.

KOO, H. J; WOO, G. J. Distribution and transferability of tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. 407-413, 2011.

KORB, A; BRAMBILLA, D. K; TEIXEIRA, D. C; RODRIGUES, R. M. Riscos para a saúde humana do uso de antibióticos na cadeia produtiva leiteira. **Rev. Saúde Públ**, Florianópolis, v. 4, n. 1, 2011.

LAVIGNE, J-P; MARCHANDIN, H; DELMAS, J; BOUZIGES, N; LECAILLON, E; CAVALIE, L; JEAN-PIERRE, H; BONNET, R; SOTTO, A. qnrA in CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates from France. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 12, p. 4224-4228, 2006.

LEE, G. Y; JANG, H. I; HWANG, I. G; RHEE, M. S. Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry, and pork in Korea. **Int J Food Microbiol**. v. 134, p. 196-200, 2009.

LEVERSTEIN-VAN HALL, M. A; BLOK, H. E. M; DONDEERS, A. R. T; PAAUW, A; FLUIT, A.C; VERHOEF, J. Multidrug resistance among Enterobacteriaceae is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. **J Infect Dis.**, v.187, p. 251–259, 2003.

LITTLE, C. L; RHOADES, J. R; SAGOO, S. K; HARRIS, J; GREENWOOD, M; MITHANI, V; GRANT, K; LAUHLIN, J. Microbiological quality of retail cheeses made from raw, thermized or pasteurized milk in the UK. **Food Microbiol**. v. 25, p. 304–312, 2008.

LIVERMORE, D. M. Defining an extended-spectrum beta-lactamase. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 14, p. 3–10. 2008.

LOGAN, N. A. Bacterial systematics. **Oxford: Blackwell scientific publications**, p. 263, 1994.

LUO, C; WALK, S. T; GORDON, D. M; FELDGARDEN, M; TIEDJE, J. M; KONSTANTINIDIS, K. T. Genome sequencing of environmental *Escherichia coli* expands understanding of the ecology and speciation of the model bacterial species. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, p. 7200–7205, 2011.

MANGUIN, S.; KENGNE, P.; SONNIER, L.; HARBACH, R.E.; BAIMALI, V.; TRUNG, H.D.; COOSEMANS, M. SCAR markers and multiplex PCR-based identification of isomorphic species in the *Anopheles dirus* complex in Southeast Asia. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 16, p. 46–54, 2002.

MANIE, T; KHAN, S; BRÖZEL, V. S; VEITH, W. J; GOUWS, P. A. Antimicrobial resistance of bacteria isolated from slaughtered and retail chickens in South Africa. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, p. 253- 258, 1997.

MATHAI, E; GRAPE, M; KRONVALL, G. R. Integrons and multidrug resistance among *Escherichia coli* causing community-acquired urinary tract infection in southern India. **APMIS**, v.112, p. 159– 164, 2004.

MATTHEW, M; HEDGES, R. W; SMITH, J. T. Types of beta-lactamase determined by plasmids in gram-negative bacteria. **J. Bacteriol.**, v. 138, p. 657–662, 1979.

MAYNARD, C; FAIRBROTHER, J. M; BEKAL, S; SANSCHAGRIN, F; LEVESQUE, R. C; BROUSSEAU, R; MASSON, L; LARIVIE`RE, S; HAREL, J. Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 47, p. 3214– 3221, 2003.

MENDONCA, N; CALHAU, V; LIN, T; BOAVENTURA, L; RIBEIRO, G; DA SILVA, G. J.. Unusual genotype of a uropathogenic *Escherichia coli* strain assigned to the B2 phylogenetic group. **J. Clin. Microbiol.**, v. 49, p. 3105–3106, 2011.

Mehrgan, H; Rahbar, M. Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in a tertiary care hospital in Tehran, Iran. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, p. 147-151, 2008.

MEYER, R.; CANDRIAN, U. PCR-based DNA analysis for the identification and characterization of food components. **Lebensmittel-Wissenhauf und-Technologie**, v. 29, p. 1-9, 1996.

MIRIAGOU V; CORNAGLIA G; EDELSTEIN, M; GALANI, I; GISKE, C. G; GNIADKOWSKI, M; MALAMOU-LADA, E; MARTINEZ-MARTINEZ, L; NAVARRO, F; NORDMANN, P; PEIXE, L; POURNARAS, S; ROSSOLINI, G. M; TSAKRIS, A; VATOPOULOS, A; CANTÓN, R. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. **Clin Microbiol Infect**, v. 16, p. 112-22, 2010.

MOHAMED, M. S. E; HASSAN, A. T; AHMED, S. M. K. Prevalence of Class 1, 2, and 3 Integrons and CarbapenemResistance in Gram-negative bacteria. **Egyptian Journal of Medical Microbiology**, v. 25, n.3, p. 67-73, 2016.

MOLINA-LOPEZ J; OZORES, G. A; APARICIO, R. M. R; PARRA, S. G; BERROCAL, M. E. G; CASTRO, R. H; HERNÁNDEZ, H. A M; Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 5, p. 840–849, 2011.

MONSTEIN, H. J; ÖSTHOLM-BALKHED, Å; NILSSON, N. V; NILSSON, M; DORNBUSCH, K; NILSSON, L. E. Multiplex PCR amplification assay for rapid detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M genes in Enterobacteriaceae. **APMIS**, v. 115, p. 1400–1408, 2007.

MOROSINI, M. I; CASTILLO, M. G; COQUE, T. M; VALVERDE, A; NOVAIS, A; LOZA, E; BAQUERO, F; CANTON, R. Antibiotic Coresistance in Extended-Spectrum--Lactamase-Producing Enterobacteriaceae and In Vitro Activity of Tigecycline. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n.8, v. 50, p. 2695–2699, 2006.

MOTA, R. A; SILVA, K. P. C; FREITAS, M. F. L; PORTO, W. J. N; SILVA, L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Braz J vet Res anim Sci**, São Paulo, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

NATARO, J. P; MAI, V; JOHNSON, J; BLACKWELDER, W. C; HEIMER, R; TIRRELL, S; EDBERG, S. C; BRADEN, C. R; MORRIS Jr., J. G; HIRSHON, J. M. Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, p. 402-407, 2006.

NG, L. K; MARTIN, I; ALFA, M; MULVEY, M. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. **Molecular and Cellular Probes**, v.1 5, p. 209–215, 2001.

NORDMANN, P; POIREL, L. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. **J Antimicrob Chemother**, v. 56, n. 3, p. 463-469, 2005.

OETHINGER, M. I; PODGLAJEN, W.V; KERN, LEVY, S.B. Overexpression of the marA or soxS regulatory gene in clinical topoisomerase mutants of *Escherichia coli*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.42, p.2089–2094, 1998.

OLTRAMARI, K; RIOS, M. C; BERGAMASCO, R; MACHISKI JR, M. Resistência a antimicrobianos em *Escherichia coli* isolada de leite pasteurizado. Revista Tecnológica, Edição Especial V Simpósio de Engenharia, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, p. 57-61, 2011.

PADILHA, T. **Resistência antimicrobiana x produção animal: uma discussão internacional**. Brasília: Embrapa, 2000. (Coletânea Rumos e Debates). Disponível em: <<http://www.embrapa.br:8080/aplic/rumos.nsf>>. Acesso em 18 ago. 2012.

PATERSON, D. L; BONOMO, R. A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 18, p. 657–686. 2005.

PEREIRA-MAIA, E. C; SILVA, P. P; ALMEIDA, W. B; SANTOS, H. F; MARCIAL, B. L; RUGGIERO, R; GUERRA, W. Tetraciclinas e glicilciclinas: uma visão geral. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 700-706, 2010.

PERRY, J. A; WESTMAN, E. L; WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome: what's new? **Curr Opin Microbiol**, v. 21C, p. 45–50, 2014.

PINTO, F. G. S; SOUZA, M; SALING, S; MOURA, A. C. Qualidade microbiológica de queijo minas frescal comercializado no município de Santa Helena, PR, Brasil. **Arq. Inst. Biol**, São Paulo, v. 78, n. 2, p. 191-198, 2011.

PITOUT, J. D. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: an update on antimicrobial resistance, laboratory diagnosis and treatment. **Expert Rev. Anti Infect. Ther.**, v. 10, p. 1165–1176, 2012.

POIREL, L; LEVIANDIER, C; NORDMANN, P. Prevalence and genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA and QnrS in Enterobacteriaceae isolates from a French university hospital. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 12, p. 3992-3997, 2006.

POIREL, L; WALSH, T. R; CUVILLIER, V; NORDMANN, P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 70, p. 119–123, 2011.

POMBA, C; DA FONSECA, J. D; BAPTISTA, B. C; CORREIA, J.D; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. Detection of the pandemic O25- ST131 human virulent *Escherichia coli* CTX-M-15- producing clone harboring the qnrB2 and aac (6')-Ib-cr genes in a dog. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 1, p. 327-328, 2009.

POSSEBON, M. I; CAMARGO, E. A. Resistência bacteriana aos carbapenêmicos. **RBM Revista Brasileira de Medicina**, v. 60, n. 6, p. 378-378, 2003.

RAMOS, S; SILVA, N; CANIÇA, M; CAPELO- MARTINEZ, J. L; BRITO, F; IGREJAS, G; POETA, P. High prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from animals at slaughter: a food safety risk. **J Sci Food Agric**, Published online in Wiley Online Library. 2012. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.5814/full>. Acesso em: 17 mai. 2017.

ROBERTS, R. R; HOTA, B; AHMAD, I; SCOTT, R. D; FOSTER, S. D; ABBASI, F; SCHABOWSKI, S; KAMPE, L. M; CIAVARELLA, G. G; SUPINO, M; NAPLES, J; CORDELL, R; LEVY, S. B; WEINSTEIN, R. A. Hospital and societal costs of antimicrobial-resistant infections in a Chicago teaching hospital: implications for antibiotic stewardship. **Clin Infect Dis**. v. 49, p. 1175-1184, 2009.

ROOS, T. B; SCHEID FILHO, V. B; TIMM, C. D; OLIVEIRA, D. S. Avaliação microbiológica de queijo colônia produzido na cidade de Três Passos, RS. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 19, n. 132, p. 94-96, 2005.

RUBIN, J. E; PITOUT, J. D. D. Extended-spectrum b-lactamase, carbapenemase and AmpC producing *Enterobacteriaceae* in companion animals. **Veterinary Microbiology**, v. 170, p. 10–18, 2014.

RUIZ DEL CASTILLO, B; OCAMPO-SOSA, A. A; MARTINEZ-MARTINEZ, L. Detection of phylogenetic group B1 *Escherichia coli* by multiplex PCR: description of a new amplification pattern. **Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.**, v. 29, p. 785–786, 2011.

RYU, S. H; PARK, S. G; CHOI, S. M; HWANG, Y. O; HAM, H. J; KIM, S. U; LEE, Y. K; KIM, M. S; PARK, G. Y; KIM, K. S; CHAE, Y. Z. Antimicrobial resistance and resistance genes in *Escherichia coli* strains isolated from commercial fish and seafood. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, p. 14–18, 2012a.

RYU, S. H; LEE, J. H; PARK, S. H; SONG, M. O; PARK, S. H; JUNG, H. W; PARK, G. Y; CHOI, S. M; KIM, M. S; CHAE, Y. Z; PARK, S. G; LEE, Y. K. Antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from commercial and cooked foods. **International Journal of Food Microbiology**, 2012b.

SABATÉ, M; PRATS, G; MORENO, E; BALLESTÉ, E; BLANCH, A. R; ANDREU, A. Virulence and antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from human and animal wastewater. **Research in Microbiology**, v. 159, p. 288-293, 2008.

SÁENZ, Y; BRINAS, L; DOMÍNGUEZ, E; RUIZ, J; ZARAZAGA M; VILA, J; TORRES C. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 10, p. 3996–4001, 2004.

SALOTTI, B. M; CARVALHO, A. C. F. B; AMARAL, L. A; VIDAL-MARTINS, A. M. C; CORTEZ, A. L. Qualidade microbiológica do queijo Minas frescal comercializado no município de Jaboticabal, SP, Brasil. **Arq. Inst. Biol**, São Paulo, v. 73, n. 2, p. 171-175, 2006

SANTOS, A. C. M; ZIDKO, A. C. M; PIGNATARI, A. C. C; GALES, A. C; SILVA, R. M. A virulência de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC). **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 392-400, 2009.

SCHWARZ, S; CHASLUS-DANCLA, E. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. **Veterinary Research**, v. 32, n. 3-4, p. 201-225, 2001.

SENA, M. J; CERQUEIRA, M. M. O. P; MORAIS, C. F. A; CORRÊA, E. S; SOUZA, M. R. Características físico-químicas de queijo de coalho comercializado em Recife-PE. **Higiene Alimentar**, v. 14, n. 74, p. 41-44, 2000.

SILVA, F. T. **Queijo Minas frescal**. Brasília, DF: Embrapa- Informação Tecnológica, 2005.

SILVA, T. F. A; FILHO, M. A. A; BRITO, M. R. M. B; FREITAS, R. M. mecanismo de ação, efeitos farmacológicos e reações adversas da ceftriaxona: Uma revisão de literatura. **Revista eletrônica de farmácia**, v.11, n.3, p. 48–57, 2014.

SILVA, W. P. Segurança Alimentar. In: XV Encontro Nacional sobre Metodologias e Gestão de Laboratórios da Embrapa, 2010. Disponível em: <http://www.cpact.embrapa.br>. Acesso em: 15 de julho de 2012.

SILVEIRA, G. P; NOME, F; GESSER, J. C; SÁ M. M; TERENCEZI, H. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Quim. Nova**, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006.

SMET, A; MARTEL, A; PERSOONS, D; DEWULF, J; HEYNDRICKX, M; CLAEYS, G; LONTIE, M; MEENSEL, B. V; HERMAN, L; HAESEBROUCK, F. Characterization of extended-spectrum betalactamases produced by *Escherichia coli* isolated from hospitalized and nonhospitalized patients: emergence of CTX-M-15-producing strains causing urinary tract infections. **Microb. Drug Resist.**, v. 16, p. 129 –134, 2010.

SOLOMAKOS, N; GOVARIS, A; ANGELIDIS, A. S; POURNARAS, S; BURRIEL, A. R; KRITAS, S; PAPAGEORGIOU, D. K. Occurrence, virulence genes and antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157 isolated from raw bovine, caprine and ovine milk in Greece. **Food Microbiol**, v. 26, n. 8, p. 865-871, 2009.

SOUZA, C. S. Uma guerra quase perdida. **Revista Ciência Hoje**, v. 23, n. 138, p. 27-35, 1998.

SPINDLER, A; OTTON, L. M; FUENTEFRIA, D. B; CORCAO, G. Betalactams resistance and presence of class 1 integron in *Pseudomonas* spp. isolated from untreated hospital effluents in Brazil. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 102, n. 1, p. 73-81, 2012.

SRINIVASAN, V; NAM, H; SAWANT, A. A; HEADRICK, S. I; NGUYEN, L. T; OLIVER, S. P. Distribution of Tetracycline and Streptomycin Resistance Genes and Class 1 Integrons in Enterobacteriaceae Isolated from Dairy and Nondairy Farm 293 Soils. **Microbial ecology**, v. 55, p. 184–193, 2008.

SZÉKELYA, E; DAMJANOVAC, I; JÁNVÁRIC, L. E; VAS, K; MOLNÁR, S; BILCA, D. V; LORINCZI, L. K; TÓTH, A. First description of blaNDM-1, blaOXA-48, blaOXA-181 producing Enterobacteriaceae strains in Romania. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, p. 697– 700, 2013.

TATO, M; COQUE, T. M; BAQUERO, F; CANTÓN, R. Dispersal of carbapenemase *bla*<sub>VIM-1</sub> gene associated with different Tn402 variants, mercury transposons, and conjugative plasmids in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, p. 320-327, 2010.

TAUXE, R. V. Emerging foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 78, p. 31 – 41, 2002.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** [online], vol. 33, n. 3, p. 281-301, 2000.

THERON, J.; CLOETE, T.E. Molecular techniques for determining microbial diversity and community structure in natural environments. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 26, p. 37–57, 2000.

TOUCHON, M. C; HOEDE, O; TENAILLON, V; BARBE, S; BAERISWYL, P; BIDET, E; BINGEN, S; BONACORSI, C; BOUCHIER, O; BOUVET, A; CALTEAU, H; CHIAPELLO, O; CLERMONT, S; CRUVEILLER, A; DANCHIN, M; DIARD, C; DOSSAT, M. E; KAROUI, E; FRAPY, L; GARRY, J. M; GHIGO, A. M; GILLES, J; JOHNSON, C; LE BOUGUENEC, M; LESCAT, S; MANGENOT, V; MARTINEZ-JEHANNE, I; MATIC, X; NASSIF, S; OZTAS, M. A; PETIT, C; PICHON, Z; ROUY, C. S; RUF, D; SCHNEIDER, J; TOURRET, B; VACHERIE, D; VALLENET, C; MEDIGUE, E. P; ROCHA, DENAMUR, E. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. **PLoS Genet.**, v. 5, p.1000344, 2009.

TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2004. p. 269-310.

WALK, S. T; ALM, E. W;. CALHOUN, L. M; MLADONICKY, J. M; WHITTAM, T. S. Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. **Environmental Microbiology**, England, v. 9, n. 9, p. 2274-2288, set., 2007.

WALK, S. T; ALM, E. W; GORDON, D. M; RAM, J. L; TORANZOS, G. A; TIEDJE, J. M; WHITTAM, T. S. Cryptic Lineages of the Genus *Escherichia*. **Appl. Environ. Microbiol.**; v. 75, n. 20, p. 6534-6544, out. 2009.

WHITE, P. A; MCIVER, C. J; DENG, Y; RAWLINSON, W. D. Integrons and genes cassettes in the Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v. 45, p. 2658-2661, 2001.

YAQOOB, M; WANG, L. P; FANG, T; CHENG-PING LU. Occurrence and transmission of class 1 and 2 integrons among phenotypic highly ampicillin-resistant avian *Escherichia coli* isolates from Pakistan. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 27, p. 2041–2050, 2011.

ZARLENGA, D. S; HIGGINS, J. PCR as diagnostic and quantitative technique in veterinary parasitology. **Veterinary Parasitology**, v. 101, n. 3-4, p. 215-230, 2001.

ZEIGHAMI, H; HAGHI, F; HAJIAHMADI, F. Molecular characterization of integrons in clinical isolates of betalactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Iran. **Journal of Chemotherapy**, 2014.

