

Resistência antimicrobiana da microbiota de queijos servidos em hospital oncológico do Rio de Janeiro-Brasil

Antimicrobial resistance of the microbiota of cheeses served in an oncology hospital in Rio de Janeiro-Brazil

Resistencia antimicrobiana de la microbiota de quesos atendidos en un hospital oncológico de Río de Janeiro-Brasil

Recebido: 01/09/2022 | Revisado: 15/09/2022 | Aceitado: 16/09/2022 | Publicado: 22/09/2022

Fabiana Montovanele de Melo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4817-7011>
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Brasil
E-mail: fabimontovanele@edu.unirio.br

Cristiane Rodrigues Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6306-4998>
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Brasil
E-mail: cristiane.silva@unirio.br

Gabriel Lopes Carvalho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3224-1303>
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Brasil
E-mail: gabriel.carvalho@edu.unirio.br

Victor Augustus Marin

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9827-6552>
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Brasil
E-mail: victor.marin@unirio.br

Resumo

A resistência bacteriana a antimicrobianos é um dos grandes desafios atuais para saúde pública. Uma importante preocupação é a alimentação fornecida em ambiente hospitalar, por sua capacidade de poder veicular genes de resistência aos antimicrobianos. Esse estudo teve como objetivo avaliar a resistência antimicrobiana, e caracterizar os genes de resistência de bactérias gram-negativas na microbiota de amostras de queijos servidos a pacientes internados em um hospital público do Rio de Janeiro. Esta pesquisa utilizou uma metodologia para captar a microbiota Gram-negativa resistente aos antimicrobianos. O teste de difusão em disco e a reação em cadeia da polimerase (PCR) foram realizados para investigar, respectivamente, a resistência fenotípica e genotípica de bactérias Gram-negativas aos antimicrobianos testados. As microbiotas de todas as amostras de queijo apresentaram alta resistência fenotípica. Em 62,5% das amostras, a resistência atingiu mais de nove antimicrobianos testados. Cinco antimicrobianos não apresentaram suscetibilidade em 100% das amostras analisadas. Com exceção do antimicrobiano ciprofloxacina, foram encontrados percentuais de resistência acima de 62% em todas as amostras, incluindo cefalosporina de quarta geração. Todas as amostras de queijo abrigavam genes de resistência. Foram encontrados sete diferentes genes de resistência, em 34 microbiotas de bactérias Gram-negativas, sendo eles: *int-1*, *int-2*, *ctx*, *shv*, *tem*, *tetA* e *tetB*. Concluímos a presença alarmante de genes potencialmente resistentes a antimicrobianos em queijos servidos a pacientes oncológicos, indicando que esse alimento pode ser um veiculador de bactérias com genes de resistência em ambiente hospitalar.

Palavras-chave: Resistência bacteriana; Alimento; Antimicrobiano; Bactéria Gram-negativa; Infecção hospitalar.

Abstract

Bacterial resistance to antimicrobials is one of the major challenges for public health today. An important concern is food provided in a hospital environment, due to its ability to transmit antimicrobial resistance genes. This study aimed to evaluate antimicrobial resistance, and characterize the resistance genes of gram-negative bacteria in the microbiota of cheese samples served to patients admitted to a public hospital in Rio de Janeiro. This research used a methodology to capture the Gram-negative microbiota resistant to antimicrobials. The disk diffusion test and the polymerase chain reaction (PCR) were performed to investigate, respectively, the phenotypic and genotypic resistance of Gram-negative bacteria to the tested antimicrobials. The microbiota of all cheese samples showed high phenotypic resistance. In 62.5% of the samples, resistance reached more than nine tested antimicrobials. Five antimicrobials did not show susceptibility in 100% of the samples analyzed. With the exception of the antimicrobial ciprofloxacin, resistance

percentages above 62% were found in all samples, including fourth-generation cephalosporin. All cheese samples harbored resistance genes. Seven different resistance genes were found in 34 microbiota of Gram-negative bacteria, namely: *int-1*, *int-2*, *ctx*, *shv*, *tem*, *tetA* and *tetB*. We conclude the alarming presence of potentially antimicrobial-resistant genes in cheeses served to cancer patients, indicating that this food may be a carrier of bacteria with resistance genes in a hospital environment.

Keywords: Bacterial resistance; Food; Antimicrobial; Gram-negative bacteria; Hospital infection.

Resumen

La resistencia bacteriana a los antimicrobianos es uno de los principales desafíos para la salud pública en la actualidad. Una preocupación importante es la alimentación proporcionada en un ambiente hospitalario, debido a su capacidad para transmitir genes de resistencia a los antimicrobianos. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la resistencia antimicrobiana y caracterizar los genes de resistencia de bacterias gramnegativas en la microbiota de muestras de queso servidas a pacientes ingresados en un hospital público de Río de Janeiro. Esta investigación utilizó una metodología para capturar la microbiota Gram negativa resistente a los antimicrobianos. La prueba de difusión en disco y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron para investigar, respectivamente, la resistencia fenotípica y genotípica de las bacterias Gram negativas a los antimicrobianos probados. La microbiota de todas las muestras de queso mostró una alta resistencia fenotípica. En el 62,5% de las muestras, la resistencia alcanzó a más de nueve antimicrobianos probados. Cinco antimicrobianos no mostraron sensibilidad en el 100% de las muestras analizadas. A excepción del antimicrobiano ciprofloxacino, se encontraron porcentajes de resistencia superiores al 62% en todas las muestras, incluidas las cefalosporinas de cuarta generación. Todas las muestras de queso albergaban genes de resistencia. Se encontraron siete genes de resistencia diferentes en 34 microbiotas de bacterias Gram negativas, a saber: *int-1*, *int-2*, *ctx*, *shv*, *tem*, *tetA* y *tetB*. Concluimos la alarmante presencia de genes potencialmente resistentes a los antimicrobianos en quesos servidos a pacientes con cáncer, lo que indica que este alimento puede ser portador de bacterias con genes de resistencia en un ambiente hospitalario.

Palabras clave: Resistencia bacteriana; Alimento; Antimicrobiano; Bacterias Gram-negativo; Infección hospitalaria.

1. Introdução

A resistência aos antimicrobianos é apontada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma preocupante ameaça para a saúde humana, sendo responsável por aumentos na morbimortalidade, nas internações hospitalares prolongadas e no aumento dos custos nos serviços de saúde (Collignon, 2013; *World Health Organization* [WHO], 2020). A globalização, o uso inadequado de antimicrobianos na comunidade e no ambiente hospitalar, bem como seu uso excessivo na agricultura e pecuária, podem ser listados como os principais fatores de risco para disseminação de bactérias resistentes a antimicrobianos (Martins & Rabinowitz, 2020; O'Neill, 2014). Em geral, as pesquisas têm constatado um aumento na incidência de bactérias resistentes, inclusive a antimicrobianos de amplo espectro e aos de descoberta mais recente, indicando que os mecanismos de adaptação das bactérias têm avançado numa velocidade superior à capacidade de descoberta de novos medicamentos (Cerceo et al., 2016; Kaye & Pogue, 2015). Neste sentido, as bactérias Gram-negativas têm se revelado um importante desafio para os serviços de saúde, pois além de possuírem uma membrana extracelular que lhes conferem maior resistência, possuem características intrínsecas, como a ação das bombas de efluxo, que impedem que agentes antimicrobianos atinjam seu alvo, permitindo sua rápida disseminação (Randall et al., 2013).

Inicialmente, as bactérias resistentes eram mais restritas ao ambiente hospitalar, mas agora podem ser encontradas em todos os lugares, como no meio ambiente, em seres humanos, em animais, na água e nos alimentos (Organização Pan-Americana da Saúde [OPA], 2020). Os alimentos, em especial, têm sido comumente negligenciados como vetores transmissores de genes de resistência para os seres humanos. No entanto, os resíduos do uso indiscriminado de antimicrobianos na produção de animais e alimentos tem contribuído para seleção de bactérias resistentes, e devido às propriedades móveis de resistência, a transferência pode ocorrer através da cadeia alimentar, o que aumenta os riscos à saúde do homem (Bacanli & Başaran, 2019; Koch et al., 2017; Nisha, 2008).

No âmbito hospitalar, o consumo desses alimentos contaminados por bactérias que abrigam genes de resistência antimicrobiana, pode ser particularmente perigoso em função de fatores de risco encontrados na população hospitalizada, como

por exemplo, a fragilidade do sistema imunológico e as modificações da constituição microbiana natural do trato gastrointestinal (Lund & O'Brien, 2011; San Millan, 2018). Pacientes mais frágeis em unidades de terapia intensiva, neonatologia e oncologia, são os mais afetados por infecções hospitalares. Tratamentos no combate ao câncer, como a quimioterapia e realização de cirurgia de grande porte, podem ser comprometidos na ausência de antimicrobianos eficazes (WHO, 2020).

O teste de sensibilidade antimicrobiana é crucial para orientar a escolha terapêutica, o mais difundido entre os laboratórios clínicos, é o teste fenotípico, o qual a partir do teste de disco-difusão, é realizada a medição dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano (Didelot et al., 2012). Os valores obtidos são interpretados de acordo com a escolha dos pontos de corte, definidos por comitês internacionais, tais como o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e/ou o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), e especificamente, para cada espécie e agente antimicrobiano, a sensibilidade é categorizada em sensível, intermediário ou resistente (EUCAST, 2022; CLSI, 2022). No Brasil, em 2013, foi criado o Comitê Brasileiro de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana (BrCAST), e por seguimentos desde comitê, em 2019, foi padronizado o uso nacional das diretrizes do EUCAST, tendo como base os documentos da versão brasileira (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2018; *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* [BrCAST], 2018).

Todavia, com o surgimento de novos mecanismos de resistência bacteriana, nem sempre a caracterização fenotípica pode ser suficiente para confirmar a presença de um mecanismo de resistência, sendo necessário a aplicação de técnicas moleculares, para caracterização genotípica, que são capazes de detectar os genes responsáveis pela codificação dos mecanismos de resistência (Didelot et al., 2012). Apesar de ainda escasso, é crescente o interesse por pesquisa de genes de resistência em alimentos (De Paula et al., 2018; Peirano et al., 2006; Silva et al., 2020; Trocado et al., 2021; Xiong et al., 2019).

Em função da alimentação fornecida ao paciente ser uma possível fonte de contaminação hospitalar, a resistência aos antimicrobianos apresentada por bactérias também é uma questão relacionada à segurança dos alimentos. Desta maneira, essa pesquisa teve por objetivo analisar a resistência aos antimicrobianos em microbiotas Gram-negativas (MGN) de queijos servidos em ambiente hospitalar, a fim de contribuir para a elaboração de mecanismos de prevenção e controle que minimizem os efeitos negativos deste grave problema de saúde pública.

2. Metodologia

Amostragem

As amostras de queijo foram coletadas do serviço de nutrição de um hospital público em oncologia na cidade do Rio de Janeiro-RJ. Para cada tipo de queijo foram coletados dois lotes/marcas diferentes, totalizando oito amostras. As amostras foram transportadas em recipiente térmico, em um prazo máximo de duas horas, para o Laboratório de Controle Microbiológico de Alimentos da Escola de Nutrição (LACOMEN) pertencente a Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO).

Avaliação da Resistência Fenotípica

1 - Pré-seleção

As análises foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Silva et al. (2020). Seguindo a metodologia, foram colocados $25,0\text{g} \pm 0,2\text{g}$ de amostra em 225 mL de caldo Gram-negativo, que tem por finalidade o enriquecimento seletivo para o cultivo de organismos Gram-negativos (HiMedia, 2011). Posteriormente, foram incubados a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ para

pré-enriquecimento por 24 horas. Após este período, para a pré-seleção de microbiota resistente, foram transferidos 50 microlitros do caldo enriquecido para tubos contendo 5 mL de caldo triptona de soja - TSB (Oxoid, Reino Unido) e disco de antimicrobiano (Oxoid, Reino Unido) (*Centers for Disease Control and Prevention [CDC], 2009*). Foram selecionados onze tipos de antimicrobianos, sendo dez deles distribuídos de forma a representar cada classe da classificação de Ambler (Ambler, 1980) e um antimicrobiano monobactâmico, única classe dentro dos beta-lactâmicos não incluída na classificação. Os antimicrobianos selecionados foram: cefepima (30µg), ertapenem (10µg), gentamicina (10µg), ampicilina (10µg), ampicilina-sulbactam (10/10µg), cloranfenicol (30µg), tetraciclina (30µg), ciprofloxacina (5µg), ceftazidima (30µg), sulfametoxazol-trimetoprima (1.25/23.75µg) e aztreonam (30µg). A etapa de pré-seleção foi realizada em triplicata.

2 - Seleção de resistência

Após 24 horas de crescimento, os tubos que apresentaram turvação foram qualificados para a avaliação da resistência. Para esta avaliação, foi feita uma adaptação da técnica de disco-difusão: em placa de agar MacConkey, uma alçada (10 microlitros) foi inoculada, de maneira a formar superfície homogênea, objetivando um meio diferencial e levemente seletivo para bactérias Gram-negativas. Na superfície da placa recém-semeada, foi colocado um disco de antimicrobiano, da classe selecionada, e em seguida, levada à estufa a 35°C ± 2°C por 16-18 horas (CDC, 2019; CLSI, 2018; Silva et al., 2020). Após o período de incubação, os diâmetros das zonas de inibição das MGN foram medidos e interpretados, como sensível, resistentes ou intermediário, de acordo com os parâmetros CLSI para família *Enterobacteriaceae* (CLSI, 2022). Os resultados foram comparados com a interpretação dos pontos de corte definidos pelo BrCAST (BrCAST/EUCAST, 2022).

Avaliação da Resistência Genotípica

1 - Extração de DNA

A extração de DNA das MGN classificadas como resistentes e intermediários foi realizada de acordo com as instruções do fabricante do kit comercial para extração de DNA genômico de bactérias Gram-negativas EasyPure® Genomic DNA Kit (TransGEN, Pequim, China).

2 - Reação em cadeia da polimerase – PCR

A caracterização molecular de genes das MGN foi realizada por PCR. A detecção de genes de resistência foi analisada a partir de *primers* específicos sintetizados pela *Eurofins Genomics* (Ebersberg, Alemanha) e *Invitrogen Thermo Fisher Scientific* (Califórnia, Estados Unidos), com base no perfil de ampliação das sequências de nucleotídeos publicados previamente (Azimi et al., 2013; Cavaco et al., 2016; Dallenne et al., 2010; Guo et al., 2015; Lanz et al., 2003; Leflon-Guibout et al., 2004; Poirel et al., 2011). Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 0,9% com uso de corante *Blue Green Loading Dye I* (LGC Biotecnologia, Brasil) e marcadores de peso molecular (100 pb DNA Ladder – Invitrogen, EUA) a uma voltagem de 90V. A visualização do gel foi realizada em transiluminador de ultravioleta (UV) (Forlab, Brasil).

Treze genes de resistência a antimicrobianos foram selecionados: β-lactâmicos (*shv*, *tem*, *ctx* e *oxa*), tetraciclina (*tetA* e *tetB*) carbapenêmicos (*oxa-48* e *kpc*), sistema genético de integrons (*int-1*, *int-2* e *int-3*), resistência às polimixinas (*mcr-1*) e resistência aos desinfetantes (*qacAE1*). A triagem de PCR para os *primers* selecionados foi feita em todas MGN, exceto para os genes *tetA* e *tetB*, rastreados somente em MGN resistentes ao antimicrobiano tetraciclina.

3. Resultados e Discussão

Resistência fenotípica

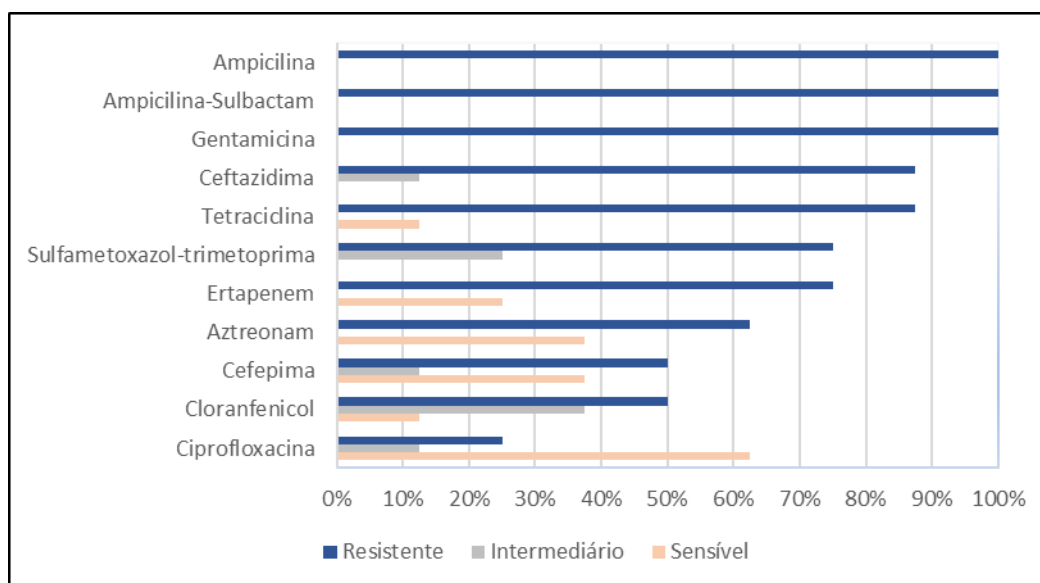
Na etapa de pré-seleção, 94,3% das MGN apresentaram turbidez por crescimento microbiano, indicando um mecanismo de resistência. As MGN apresentaram susceptibilidade a dois tipos de antimicrobianos de amplo espectro, ciprofloxacina (80%) e cloranfenicol (20%).

A análise da suscetibilidade, com a interpretação dos pontos de corte, demonstrou que as MGN de todas as amostras de queijo mantiveram alta resistência fenotípica, variando de 54,5% a 100% (CLSI, 2022). Dentre as quinze amostras que apresentaram resultados suscetíveis, cinco foram suscetíveis na etapa de pré-seleção e dez, na etapa de interpretação do teste disco-difusão.

Oito (9,1%) das MGN analisadas foram classificadas como intermediárias e, de acordo com o CLSI (2022), indica que a concentração de antimicrobiano, capaz de inibir o crescimento bacteriano, alcança níveis sanguíneos e teciduais, porém, as taxas de resposta são menores do que para isolados suscetíveis, significando um certo grau de incerteza na sua eficácia terapêutica. Sendo assim, considerando a resistência intermediária, neste estudo, a categoria intermediária, foi somada a de resistente.

Contemplando os resultados por antimicrobianos, de um total de onze antimicrobianos testados, alarmantemente, cinco não apresentaram suscetibilidade em 100% das amostras de queijo (ampicilina, ampicilina-sulbactam, gentamicina, ceftazidima e sulfametoxazol-trimetoprima). Os antimicrobianos cloranfenicol e tetraciclina, chegaram a totalizar resistência em 87,5% das amostras de queijo, seguido pelo ertapenem, que apresentou 75%. As distribuições dos percentuais por antimicrobiano estão dispostas na Figura 1. Percentuais ainda mais elevados foram encontrados em um estudo que avaliou resistência em queijo minas frescal, onde 100% das amostras apresentaram resistência ao carbapenêmico ertapenem (Silva et al., 2020). Apesar de menor, o percentual encontrado nesta pesquisa também é preocupante, considerando que os carbapenêmicos suscetíveis à família *Enterobacteriaceae* estão incluídos na lista global de patógenos prioritários para o desenvolvimento de pesquisa de novos antimicrobianos (WHO, 2017).

Figura 1 - Resistência fenotípica por amostra de queijo de acordo com os antimicrobianos testados.



Métodos de pré-seleção (turbidez) + teste de disco-difusão. Fonte: Autores.

Um estudo realizado na Eslováquia detectou 59% de resistência antimicrobiana em isolados de bactérias isoladas de leite e produtos lácteos, sendo a ampicilina o antimicrobiano mais comum ao qual as bactérias expressaram resistência. Em nosso estudo a ampicilina não apresentou suscetibilidade em 100% das amostras de queijo. A resistência a outros antimicrobianos testados também foi menor do que em nosso estudo, 17,3% das amostras foram resistentes à tetraciclina e 3,1% eram resistentes ao cloranfenicol (Hleba et al., 2015). Assim como em nosso estudo, Nilsson (2021) observou que isolados de cepas bacterianas de queijos suecos apresentaram resistência à ampicilina e ao cloranfenicol. Em outro estudo, que avaliou presença de *Staphylococcus Aureus Resistentes à Meticilina (MRSA)* em leite e produtos lácteos produzidos no Egito, foi detectado alto nível de resistência (53%) aos antimicrobianos. Penicilina e tetraciclina corresponderam, respectivamente, 87,9% e 65,2% (Al-Ashmawy et al., 2016).

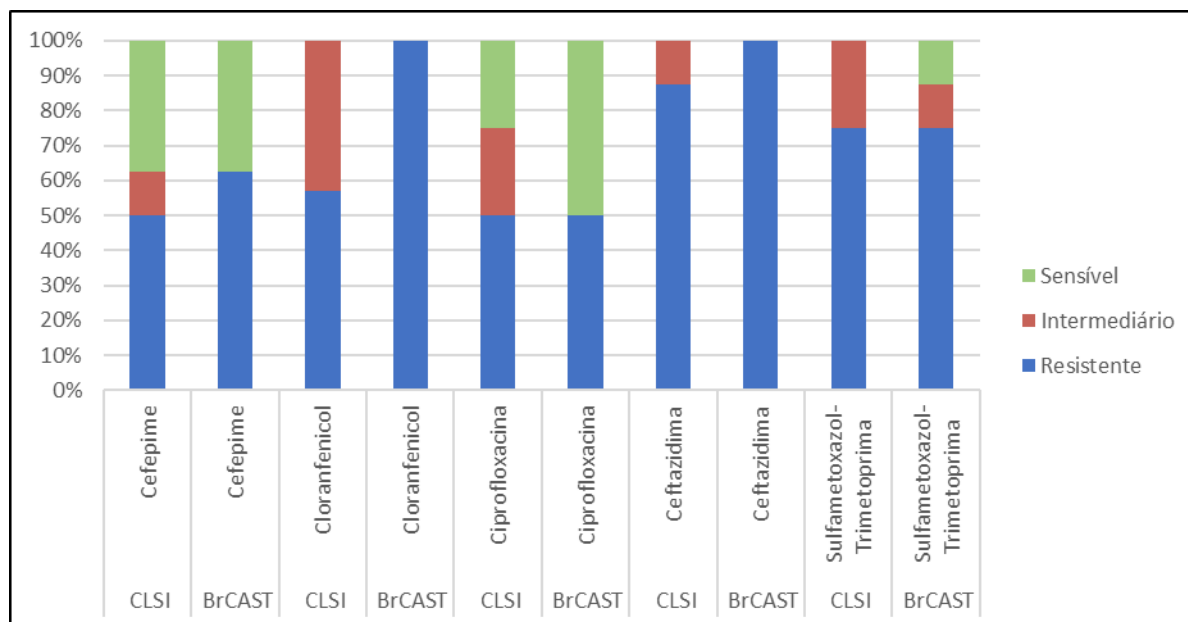
Os antimicrobianos, cefepima e aztreonam, ambos inibidores de β -lactamases, apresentaram resistência de 62,5%. O menor percentual foi de 37,5%, sendo observado na suscetibilidade do antimicrobiano ciprofloxacina. Diferentes classes de antimicrobianos apresentaram resultados intermediários, o agente bacteriostático cloranfenicol apresentou o maior percentual (37,5%). Ressalta-se que, com exceção do ciprofloxacina, foram encontrados percentuais de resistência aos antimicrobianos acima de 62% em todas as amostras, incluindo cefalosporina de quarta geração. Cepas de bactérias Gram-negativas resistentes a antimicrobianos foram isoladas de distintas amostras de queijos que expressaram resistência a diferentes classes de antimicrobianos, demonstrando múltiplas resistências à antimicrobianos entre os isolados (Quintieri et al., 2019).

Comparando critérios de interpretação dos pontos de corte

Foram comparados a interpretação dos pontos de interrupção para suscetibilidade estabelecidos pelas classificações do BrCAST (BrCAST/EUCAST, 2022) e CLSI (CLSI, 2022). Foram excluídos os resultados de suscetibilidade do pré-teste (n=5), assim como, os testes de resistência à tetraciclina (n=8), pois não há parâmetro para este antimicrobiano no BrCAST para família *Enterobacteriaceae*, sendo considerado o total de 75 MGN.

A utilização da padronização BrCAST é uma nova realidade e pode apresentar diferenças em relação ao CLSI, neste estudo as variações entre os critérios foram observadas entre os antimicrobianos (Figura 2). Apesar das taxas de resistência observadas serem elevadas para ambos os critérios, esse número seria ainda maior se fossem adotados os pontos de corte do BrCAST, representando resistência em 84% das MGN, enquanto o CLSI apresentou 77,3%. A maior discrepância entre os percentuais foi observada na classificação “intermediários”, onde baseando-se no BrCAST reduziria bastante, passando de 10,7% no CLSI, para apenas 1,3%. Essa discrepância, se dá principalmente, na diferença da classificação de resistentes entre os dois parâmetros. Os suscetíveis mantiveram-se semelhantes, representando 14,7% no BrCAST em comparação com os 12% microbiotas suscetíveis do CLSI. Resultados semelhantes foram observados no estudo de Silva et al. (2020).

Figura 2 - Variações na suscetibilidade de acordo com CLSI e BrCAST.



Onze antimicrobianos selecionados para este estudo. Fonte: Autores.

Analisando os antimicrobianos selecionados para este estudo, observou-se diferença de percentuais de classificações frente a cinco antimicrobianos. Os antimicrobianos cefepime, cloranfenicol, ciprofloxacina e ceftazidima apresentaram diferenças alterando a classificação de resistente, de acordo a BrCAST, para intermediário, de acordo com os parâmetros de CLSI. O antimicrobiano sulfametoxazol-trimetoprima foi o único que apresentou fenótipo sensível seguindo critérios da CLSI e intermediário, segundo o BrCAST. Uma outra diferença entre os comitês é conceitual, o BrCAST redefiniu o conceito da categoria intermediária, como "Sensível Aumentando Exposição", existindo elevada probabilidade de sucesso terapêutico. Diferente da interpretação do CLSI, já mencionado neste estudo, a categoria "não sensível" no BrCAST abrange apenas bactérias resistentes (BrCAST/EUCAST, 2021).

Em geral, foi possível avaliar que os pontos de corte dos halos dos critérios do BrCAST, demonstraram maior rigor na classificação como resistente, quando comparado aos resultados do CLSI.

Resistência Genotípica

A extração de DNA e PCR foram realizados com 73 microbiotas Gram-negativas, classificadas como resistentes ou intermediários nos testes anteriores. Para cada amostra de DNA extraída, foi testada a presença de 13 genes de resistência. A Tabela 1 mostra o percentual dos genes entre as amostras de queijos e as MGN.

Tabela 1- Percentual de genes por amostras de queijo e microbiotas Gram-negativas (MGN).

Gene	Amostras	MGN*
<i>int-1</i>	50,0% (4/8)	11% (8/73)
<i>int-2</i>	50,0% (4/8)	8,2% (6/73)
<i>ctx</i>	37,5% (3/8)	5,5% (6/73)
<i>shv</i>	37,5% (3/8)	6,8% (6/73)
<i>tem</i>	62,5% (5/8)	9,6% (6/73)
<i>tetA</i>	12,5% (1/8)	12,5% (1/8)
<i>tetB</i>	37,5% (3/8)	37,5% (3/8)

MGN- microbiotas Gram-negativas. Fonte: Autores.

Por meio das análises dos resultados da PCR, pode-se observar que todas as amostras de queijos continham pelo menos dois dos genes de resistência pesquisados. De forma preocupante, foram detectados até nove genes de resistência diferentes em 25% das amostras, o restante das amostras variou entre dois a três genes de resistência.

Foram encontrados sete genes de resistência diferentes, sendo eles: *int-1*, *int-2*, *ctx*, *shv*, *tem*, *tetA* e *tetB*, totalizando 34 microbiotas Gram negativas com presença de genes. Os genes *int-3*, *kpc*, *oxa*, *oxa-48*, *qacEΔ1* e *mcr-1* não foram encontrados nas amostras (Tabela 2).

Tabela 2- Distribuição dos genes por antimicrobiano presentes em microbiotas Gram-negativas extraídas das amostras de queijo.

	Cefepima	Ertapenem	Gentamicina	Ampicilina	Ampicilina-sulbactam	Cloranfenicol	Tetraciclina	Ciprofloxacina	Ceftazidima	Trimetoprima-Sulfametoxazo	Aztreonama
Q1	-	-	-	<i>int-2</i> <i>shv</i> <i>tem</i>	<i>shv</i> <i>tem</i>	-	<i>tetB</i>	-	-	<i>int-2</i> <i>shv</i> <i>tem</i>	-
Q2	<i>int-2</i>	-	-	-	-	*	<i>ctx</i> <i>tetB</i>	*	-	-	*
Q3	-	-	-	<i>shv</i> <i>tem</i>	-	-	<i>tetB</i>	-	-	-	-
Q4	-	<i>int-1</i>	-	-	-	-	-	*	-	<i>int-1</i>	-
Q5	-	-	-	<i>int-2</i>	-	<i>int-1</i>	-	*	-	<i>tem</i>	*
Q6	*	*	-	-	<i>shv</i> <i>tem</i>	-	*	*	-	-	*
Q7	*	*	<i>int-1</i>	<i>int-1</i> <i>int-2</i>	<i>int-2</i>	-	<i>ctx</i> <i>tetA</i>	*	<i>int-1</i>	<i>int-1</i> <i>tem</i>	-
Q8	*	<i>int-1</i>	-	<i>ctx</i>	<i>ctx</i>	-	-	-	-	-	-

(Q) queijo; (*) Microbiotas Gram-negativas classificadas como sensíveis na etapa de caracterização fenotípica; (-) Ausência dos genes investigados. Fonte: Autores.

Os integrons são definidos como elementos genéticos móveis que abrigam cassetes de genes que podem codificar genes para a resistência antimicrobiana, tendo um papel importante na contribuição para a ampla distribuição e disseminação

da resistência antimicrobiana, encontrados principalmente em bactérias Gram-negativas (Ghaly et al., 2017; Nielsen et al., 2015; Xiong et al., 2019). Em nosso estudo, a prevalência de integrons entre as amostras foi preocupante, *int-1* e *int-2* foram detectados em 50% das amostras de queijos. Silva et al. (2020) encontraram resultados ainda maiores em análise de amostras de queijo minas frescal, em que mostrou a presença do *int-1* em 93,3% das amostras, enquanto o *int-2* foi detectado em 73% das amostras. De Paula et al. (2018) também observaram valores preocupantes, de *int-1* em 77%, e *int-2* em 97% das amostras. Neste estudo não foi detectado o *int-3*, bem como nos dois estudos citados anteriormente em comparação. No entanto, um estudo realizado com amostras de leites crus na Turquia revelou a presença do *int-3* em 51,6% isolados de *P. aeruginosa* (Kürekci et al., 2016).

Apesar da mesma frequência entre o *int-1* e *int-2* em nossas amostras, dentre as classes de integrons descritas em literatura, a classe 1 é a mais prevalente, principalmente em estudos clínicos com foco em microrganismos Gram-negativos (Deng et al., 2015).

Um destaque importante foi que, dentre os genes detectados, *int-1* e *int-2* foram os que apresentaram maior número de resistência entre as classes de antimicrobianos estudadas. Adicionalmente, a única microbiota da amostra de queijo que apresentou resistência fenotípica a uma cefalosporina de quarta geração (cefepima), abrigava um *int-2*. Os achados neste estudo corroboram com a hipótese de que alimentos como o queijo possam atuar como reservatório para elementos genéticos móveis, de forma a transportar genes de resistência a diversos antimicrobianos.

Em meio aos mecanismos de resistência aos antimicrobianos de bactérias Gram-negativas, as β -lactamase de espectro estendido (ESBL) se destacam por possuir potencial para degradar cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, sendo caracterizadas como endêmicas em *Enterobacteriaceae* isoladas associadas a hospitais e adquiridas na comunidade (Castanheira et al., 2021). Em especial, no ambiente hospitalar, onde a pressão seletiva sobre as bactérias é maior, são consideradas uma grande preocupação (Hayashi et al., 2021).

A maioria das ESBLs são codificadas por *tem*, *shv* e *ctx-M* (El Salabi et al., 2013). Entre as amostras analisadas neste estudo, 87,5% das amostras apresentaram pelo menos a presença de um gene codificador de ESBL investigado. Ocorreu a predominância de *tem* (63%), seguido por *ctx* e *shv*, ambos apresentaram o mesmo percentual (38%). Nossos resultados estão de acordo com o estudo de Paula et al. (2018) no qual o gene *tem* foi o mais comum, em 91,4% das amostras. Silva et al. (2020) observaram o gene *shv* como o mais frequente, presente em 73,3% das amostras. Também foi encontrado maior número de gene *shv*, em análise de sucos de frutas coletados em ambiente hospitalar. Neste estudo, os autores também utilizaram a adaptação do método de seleção de bactérias Gram-negativas (Trocado et al., 2021).

Importante ressaltar que, em uma das MGN que abrigava o gene *tem*, segundo o CLSI, teve classificação fenotípica com resistência intermediária ao antimicrobiano sulfametoxazol-trimetoprima, no entanto na interpretação do ponto de corte do BrCAST, foi classificada como sensível.

Das sete diferentes MGN de resistência a antimicrobianos em que o gene *tem* foi detectado, três foram de uma única amostra de queijo e apresentavam coexistência com o gene *shv*. Outro ponto importante, foi que esse gene apresentou maior resistência ao sulfametoxazol-trimetoprima, antimicrobiano não beta-lactâmico, assim como o gene *ctx* foi principalmente detectada nas MGN resistentes à tetraciclina. Kürekci et al. (2016) detectou *E. coli* produtores de ESBL resistentes à tetraciclina e sulfametoxazol-trimetoprima. O estudo de da Silva Abreu et al. (2021) demonstrou a maior contagem genes beta-lactâmicos nas microbiotas resistentes à tetraciclina, seguidos pelas penicilinas.

Os genes de codificação de ESBL são frequentemente detectados em plasmídeos e elementos genéticos móveis, como sequências de inserção, integrons e transposons, conferindo múltiplas co-resistências a outras classes antimicrobianas (Paterson & Bonomo, 2005; Xu et al., 2015). As enzimas do tipo ESBL *ctx-M*, estão amplamente difundidas e desde o início dos anos 2000, foram reconhecidas como o grupo ESBL mais dominante, substituindo *tem* e *shv*. Ainda que existam opções terapêuticas

para isolados portadores dessas enzimas, a combinação dessas enzimas em isolados com outros mecanismos de resistência podem limitar a atividade de agentes mais novos (Castanheira et al., 2021).

Embora os marcadores de resistência à tetraciclina analisados em nosso estudo, não tenham aparecido como os mais prevalentes nas amostras analisadas, merecem atenção. Visto que, a tetraciclina é um fármaco frequentemente utilizado em animais criados para produção de alimentos e, no Brasil, a venda desse antimicrobiano para uso animal não é controlada (Barros, 2021). Um estudo que avaliou a presença genes de resistência em isolados de *E. coli* patogênicas provenientes de bovinos em dois países europeus, identificou os genes *tetA* e *tetB* como os mais prevalentes, em mais da metade das cepas analisadas, destacando potenciais riscos à saúde associados ao consumo de alimentos de origem animal (Tabaran et al., 2022).

Do total de amostras analisadas, 13% e 38%, abrigavam os genes *tetA* e *tetB*, respectivamente. Em consonância aos nossos resultados, estudos encontraram marcadores de resistência às tetraciclinas em diferentes amostras de queijo minas (De Paula et al., 2018; Elkenany et al., 2022; Hammad et al., 2022; Silva et al., 2020).

Nenhuma das MGN analisadas carregavam os genes *kpc*, *oxa*, *oxa-48*, *mcr-1* e *qacEΔ1*. Ainda que seja raro a investigação desses genes em produtos lácteos, a presença de marcadores de resistência para os β-lactâmicos, foi encontrado o gene *oxa-48* no estudo de Silva et. al (2020), e em estudo mais recente, realizado na Turquia, os genes *kpc* e *oxa-48*, foram identificados em isoladas de amostras de leite cru (Uyanik et al., 2022).

Uma outra grande preocupação de saúde pública é o gene de resistência à colistina (*mcr*), droga de último recurso contra infecções letais. Nagy et al. (2021) em um estudo de revisão, observaram que apesar da presença desse gene em leite e produtos lácteos ser subpesquisada e, quando pesquisado, indicar baixa incidência, foi detectado em análises de produtos lácteos, em quase todos os continentes.

4. Conclusão

O estudo detectou a presença alarmante de genes de resistência aos antimicrobianos em queijos servidos a pacientes hospitalizados, reforçando a importância de estratégias de vigilância sobre o contexto do alimento como uma fonte potencial para a disseminação de bactérias resistentes a antimicrobiano. Um outro destaque neste trabalho, foi a diversidade de genes detectados, a partir do método de seleção de microbiota Gram-negativa.

Como perspectivas de trabalhos futuros, para a garantia da segurança alimentar em ambiente hospitalar, sugere-se o desenvolvimento de estudos que investiguem a ocorrência de resistência aos antimicrobianos a partir de outros alimentos servidos aos pacientes internados, como também a utilização do método de seleção de microbiota Gram-negativa tentando ampliar a detecção da resistência antimicrobiana.

Referências

- Al-Ashmawy, M. A., Sallam, K. I., Abd-Elghany, S. M., Elhadidy, M., & Tamura, T. (2016). Prevalence, molecular characterization, and antimicrobial susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products. *Foodborne Pathogens and Disease*, 13(3), 156–162.
- Ambler, R. P. (1980). The structure of β-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 289(1036), 321–331.
- Azimi, L., Rastegar-Lari, A., Talebi, M., Ebrahimzadeh-Namvar, A., & Soleymanzadeh-Moghadam, S. (2013). Evaluation of phenotypic methods for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* in Tehran. *Journal of Medical Bacteriology*, 2(3–4), 26–31.
- Bacanli, M., & Başaran, N. (2019). Importance of antibiotic residues in animal food. *Food and Chemical Toxicology*, 125, 462–466. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.01.033>
- Barros, R. R. (2021). Antimicrobial Resistance among Beta-Hemolytic *Streptococcus* in Brazil: An Overview. *Antibiotics*, 10(8), 973. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10080973>
- Secretaria de Vigilância em Saúde, Portaria nº 64 de 11 de dezembro de 2018, Diário Oficial da União (2018). <https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?data=14/12/2018&jornal=515&pagina=59>

Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2018). *Termo de ratificação do acordo de cooperação técnico-científico do BrCAST 23-out-2018*. <http://brcast.org.br/documentos/>

Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing/European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2022). *Tabela pontos de corte clínicos BrCAST 14-abr-2022*. <http://brcast.org.br/tabela-pontos-de-corte-clinicos-BrCAST-2017-final.pdf>

Castanheira, M., Simner, P. J., & Bradford, P. A. (2021). Extended-spectrum β -lactamases: An update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC-Antimicrobial Resistance*, 3(3), dlab092. <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab092>

Cavaco, L., Mordhorst, H., & Hendriksen, R. (2016). Laboratory protocol: PCR for plasmid-mediated colistin resistance genes. *Lyngby, Denmark: National Food Institute*.

Centers for Disease Control and Prevention. (2009). Laboratory protocol for detection of carbapenem-resistant or carbapenemase-producing, *Klebsiella* spp. And *E. coli* from rectal swabs. *Atlanta. GA: CDC*.

Centers for Disease Control and Prevention. (2019). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. *EFSA Journal*, 17(2), e05598. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5598>

Cerceo, E., Deitelzweig, S. B., Sherman, B. M., & Amin, A. N. (2016). Multidrug-resistant gram-negative bacterial infections in the hospital setting: Overview, implications for clinical practice, and emerging treatment options. *Microbial Drug Resistance*, 22(5), 412–431.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2018). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. *CLSI supplement M100*.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2022). *EM100 Connect—CLSI M100-ED32:2022*. <http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20ED32:2022&scope=user>

Collignon, P. (2013). The Importance of a One Health Approach to Preventing the Development and Spread of Antibiotic Resistance. Em J. S. Mackenzie, M. Jeggo, P. Daszak, & J. A. Richt (Orgs.), *One Health: The Human-Animal-Environment Interfaces in Emerging Infectious Diseases: Food Safety and Security, and International and National Plans for Implementation of One Health Activities* (p. 19–36). Springer. https://doi.org/10.1007/82_2012_224

da Silva Abreu, A. C., Matos, L. G., da Silva Cândido, T. J., Barboza, G. R., de Souza, V. V. M. A., Munive Nuñez, K. V., & Cirone Silva, N. C. (2021). Antimicrobial resistance of *Staphylococcus* spp. Isolated from organic and conventional Minas Frescal cheese producers in São Paulo, Brazil. *Journal of Dairy Science*, 104(4), 4012–4022. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19338>

Dallenne, C., Da Costa, A., Decré, D., Favier, C., & Arlet, G. (2010). Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(3), 490–495.

De Paula, A. C. L., Medeiros, J. D., De Azevedo, A. C., De Assis Chagas, J. M., Da Silva, V. L., & Diniz, C. G. (2018). Antibiotic Resistance Genetic Markers and Integrons in White Soft Cheese: Aspects of Clinical Resistome and Potentiality of Horizontal Gene Transfer. *Genes*, 9(2), 106. <https://doi.org/10.3390/genes9020106>

De Paula Gollino, G., Machado Escobar, B., Dias da Silveira, I., Robales Siqueira, R. H., Ferreira, J. C., Da Costa Darini, A. L., & Bley Ribeiro, V. (2021). Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* from Southern Brazil. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*, 11(1). <https://doi.org/10.17058/reci.v1i1.15017>

Deng, Y., Bao, X., Ji, L., Chen, L., Liu, J., Miao, J., Chen, D., Bian, H., Li, Y., & Yu, G. (2015). Resistance integrons: Class 1, 2 and 3 integrons. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 14(1), 45. <https://doi.org/10.1186/s12941-015-0100-6>

Didelot, X., Bowden, R., Wilson, D. J., Peto, T. E., & Crook, D. W. (2012). Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. *Nature Reviews Genetics*, 13(9), 601–612.

El Salabi, A., Walsh, T. R., & Chouchani, C. (2013). Extended spectrum β -lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 39(2), 113–122. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.691870>

Elkenany, R., Eltaysh, R., Elsayed, M., Abdel-Daim, M., & Shata, R. (2022). Characterization of multi-resistant *Shigella* species isolated from raw cow milk and milk products. *Journal of Veterinary Medical Science*, 84(7), 890–897. <https://doi.org/10.1292/jvms.22-0018>

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2022). *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0*. <http://www.eucast.org>.

Ghaly, T. M., Chow, L., Asher, A. J., Waldron, L. S., & Gillings, M. R. (2017). Evolution of class 1 integrons: Mobilization and dispersal via food-borne bacteria. *PLOS ONE*, 12(6), e0179169. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179169>

Guo, L., Long, M., Huang, Y., Wu, G., Deng, W., Yang, X., Li, B., Meng, Y., Cheng, L., & Fan, L. (2015). Antimicrobial and disinfectant resistance of *Escherichia coli* isolated from giant pandas. *Journal of Applied Microbiology*, 119(1), 55–64.

Hammad, A. M., Eltahan, A., Hassan, H. A., Abbas, N. H., Hussien, H., & Shimamoto, T. (2022). Loads of Coliforms and Fecal Coliforms and Characterization of Thermotolerant *Escherichia coli* in Fresh Raw Milk Cheese. *Foods*, 11(3), 332. <https://doi.org/10.3390/foods11030332>

Hayashi, W., Tanaka, H., Taniguchi, Y., & ... (2019). Acquisition of *mcr-1* and Cocarriage of Virulence Genes in Avian Pathogenic *Escherichia coli* Isolates from Municipal Wastewater Influent in Japan. *Applied and ...*, Query date: 2021-09-17 12:37:32. <https://doi.org/10.1128/AEM.01661-19>

HiMedia, S. (2011). *Agar (Salmonella Shigella Agar)*.

Hleba, L., Petrová, J., Kántor, A., Čuboň, J., & Kačániová, M. (2015). Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae strains isolated from chicken and milk samples. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2015, 19–22.

- Kaye, K. S., & Pogue, J. M. (2015). Infections Caused by Resistant Gram-Negative Bacteria: Epidemiology and Management. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 35(10), 949–962. <https://doi.org/10.1002/phar.1636>
- Koch, B. J., Hungate, B. A., & Price, L. B. (2017). Food-animal production and the spread of antibiotic resistance: The role of ecology. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 15(6), 309–318. <https://doi.org/10.1002/fee.1505>
- Kürekçi, C., Arkadaş, M., & Avşar, Y. K. (2016). Occurrence, genetic characterization and antimicrobial resistance of extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* isolated from Sürk samples, a traditional turkish cheese. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 10(3), 709–714. <https://doi.org/10.1007/s11694-016-9355-7>
- Lanz, R., Kuhnert, P., & Boerlin, P. (2003). Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Veterinary microbiology*, 91(1), 73–84.
- Leflon-Guibout, V., Jurand, C., Bonacorsi, S., Espinasse, F., Guelfi, M. C., Duportail, F., Heym, B., Bingen, E., & Nicolas-Chanoine, M.-H. (2004). Emergence and spread of three clonally related virulent isolates of CTX-M-15-producing *Escherichia coli* with variable resistance to aminoglycosides and tetracycline in a French geriatric hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(10), 3736–3742.
- Lund, B. M., & O'Brien, S. J. (2011). The Occurrence and Prevention of Foodborne Disease in Vulnerable People. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(9), 961–973. <https://doi.org/10.1089/fpd.2011.0860>
- Martins, A. F., & Rabinowitz, P. (2020). The impact of antimicrobial resistance in the environment on public health. *Future Microbiology*, 15(9), 699–702. <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0331>
- Nagy, Á., Székelyhidi, R., Hanczné Lakatos, E., & Kapcsándi, V. (2021). Review on the occurrence of the *mcr-1* gene causing colistin resistance in cow's milk and dairy products. *Heliyon*, 7(4), e06800. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06800>
- Nielsen, K. M., Domingues, S., & da Silva, G. J. (2015). Global dissemination patterns of common gene cassette arrays in class 1 integrons. *Microbiology*, 161(7), 1313–1337. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000099>
- Nilsson, V. (2021). *The occurrence of antibiotic resistant bacteria in Swedish dairy products—A pilot study*.
- Nisha, A. (2008). Antibiotic residues—a global health hazard. *Veterinary world*, 1(12), 375.
- O'Neill, J. (2014). Review on antimicrobial resistance. *Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations*, 2014(4).
- Organização Pan-Americana da Saúde. (2020). *Resistência antimicrobiana—OPAS/OMS*. <https://www.paho.org/pt/topicos/resistencia-antimicrobiana>.
- Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Extended-Spectrum β -Lactamases: A Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 657–686. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>
- Peirano, G., Agersø, Y., Aarestrup, F. M., dos Reis, E. M. F., & dos Prazeres Rodrigues, D. (2006). Occurrence of integrons and antimicrobial resistance genes among *Salmonella enterica* from Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 58(2), 305–309. <https://doi.org/10.1093/jac/dk1248>
- Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 70(1), 119–123.
- Quintieri, Fanelli, & Caputo. (2019). Antibiotic Resistant *Pseudomonas* Spp. Spoilers in Fresh Dairy Products: An Underestimated Risk and the Control Strategies. *Foods*, 8(9), 372. <https://doi.org/10.3390/foods8090372>
- Randall, C. P., Mariner, K. R., Chopra, I., & O'Neill, A. J. (2013). The target of daptomycin is absent from *Escherichia coli* and other gram-negative pathogens. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(1), 637–639.
- San Millan, A. (2018). Evolution of plasmid-mediated antibiotic resistance in the clinical context. *Trends in microbiology*, 26(12), 978–985.
- Silva, C. R., Okuno, N. T., Macedo, V. H. L. de M., Freire, I. D. R., Miller, R. M., & Marin, V. A. (2020). Resistome in gram-negative bacteria from soft cheese in Brazil. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 19(3), 430. <https://doi.org/10.9771/cmbio.v19i3.35460>
- Tabaran, A., Soulageon, V., Chirila, F., Reget, O. L., Mihaiu, M., Borzan, M., & Dan, S. D. (2022). Pathogenic *E. coli* from Cattle as a Reservoir of Resistance Genes to Various Groups of Antibiotics. *Antibiotics*, 11(3), 404. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11030404>
- Trocado, N. D., de Moraes, M. S., Aveleda, L., Silva, C. R., & Marin, V. A. (2021). Phenotypic and genotypic detection of antibiotic-resistant bacteria in fresh fruit juices from a public hospital in Rio de Janeiro. *Archives of Microbiology*, 203(4), 1471–1475. <https://doi.org/10.1007/s00203-020-02139-9>
- Uyanik, T., Çadirci, Ö., Gücükoğlu, A., & Can, C. (2022). Investigation of major carbapenemase genes in ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from raw milk in Black Sea region of Turkey. *International Dairy Journal*, 128, 105315. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105315>
- World Health Organization. (2017). *WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed*. <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- World Health Organization. (2020). *Antibiotic resistance*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
- Xiong, L., Sun, Y., Shi, L., & Yan, H. (2019). Characterization of antimicrobial resistance genes and class 1 integrase gene in raw meat and aquatic product, fresh vegetable and fruit, and swine manure in southern China. *Food Control*, 104, 240–246. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.05.004>
- Xu, G., An, W., Wang, H., & Zhang, X. (2015). Prevalence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from piglets with post-weaning diarrhea in Heilongjiang province, China. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01103>