

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
FACULDADE DE NUTRIÇÃO EMÍLIA DE JESUS FERREIRO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

RAFAEL MARQUES PEREIRA
POEYS DE CARVALHO

PERFIL DE RESISTÊNCIA A
ANTIMICROBIANOS EM *Enterobacteriaceae*
ISOLADAS DE SALADAS DE HORTALIÇAS
CRUAS PRONTAS PARA CONSUMO



Niterói,
2020

RAFAEL MARQUES PEREIRA POEYS DE CARVALHO

PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM *Enterobacteriaceae*
ISOLADAS DE SALADAS DE HORTALIÇAS CRUAS PRONTAS PARA CONSUMO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Nutrição da Faculdade de Nutrição Emília de Jesus Ferreiro, da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Nutrição.

Orientadora:

Profª Drª Alice Gonçalves Martins Gonzalez

Coorientadora:

Msc. Cíntia Borges Silva

Niterói,

2020

RAFAEL MARQUES PEREIRA POEYS DE CARVALHO

PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM *Enterobacteriaceae*
ISOLADAS DE SALADAS DE HORTALIÇAS CRUAS PRONTAS PARA CONSUMO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Graduação em
Nutrição da Faculdade de Nutrição Emília
de Jesus Ferreiro, da Universidade Federal
Fluminense, como requisito parcial à
obtenção do título de Bacharel em Nutrição.

Aprovada em de dezembro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof^aDr^a Alice Gonçalves Martins Gonzalez – MBO/UFF

Msc. Juliana Souza Alves

Prof^aDr^a Maria das Graças G. de A. Medeiros

Niterói,

2020

AGRADECIMENTOS

Agradecimento especial à minha mãe pelo amor, carinho, amizade, suporte, ensinamentos e pelo exemplo de mãe. As minhas irmãs, Fernanda e Gabriela, por ajudar na minha educação e me tornar a pessoa que sou hoje. E a toda a minha família pelo apoio.

A minha orientadora, Alice Gonçalves Martins Gonzalez um agradecimento carinhoso e especial, pela dedicação, paciência, compreensão, competência e orientação durante todo o tempo.

A todos os Professores que passaram pela minha vida, um agradecimento eterno.

Aos meus amigos do colégio pH, Arthur, Beatriz, Ian, Luis, Marcelo, Mariana, Thomaz, Yasmin, por acompanharem minha trajetória e estarem ao meu lado.

Aos meus amigos do Bosque de Itaipu, Lucas, Pedro e Rodrigo, por sempre me apoiarem e estarem junto em todos momentos.

Aos meus amigos do LHIMA por contribuírem na pesquisa e me alegrarem nos momentos intensos nas buscas dos meus resultados. Um agradecimento especial, à Bianca, Cíntia, Cris, Jhonathan e Dona Lucia.

À minha namorada Renata, pelo companheirismo, amor e que me ajudou na reta final de produção desse trabalho. Às amigadas que fiz durante o curso de Nutrição, em especial aos meus amigos Larissa, Douglas, Rafael, Isabelle, Ohanna, pela força, por tornar cada dia mais alegre e tranquilo durante todo o curso.

À FAPERJ e ao CNPQ pela bolsa de iniciação científica nos anos 2018-2019 e 2019-2020, respectivamente.

RESUMO

Um problema global que vem chamando atenção é a expansão de bactérias resistentes a antimicrobianos, incluindo, principalmente, espécies da família *Enterobacteriaceae*. Hortaliças consumidas de forma crua podem apresentar potencial risco à saúde do consumidor, devido a possível presença de cepas de *Enterobacteriaceae* patogênicas, como também de cepas com perfil de resistência a antimicrobianos. Além disso, a transferência de genes de resistência a antimicrobianos entre cepas de mesma espécie ou entre espécies diferentes, pode ocorrer no alimento ou no intestino, reduzindo, como consequência, as opções de tratamentos de infecções por *Enterobacteriaceae*. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de resistência a antimicrobianos em cepas de *Enterobacteriaceae* isoladas de saladas de hortaliças cruas prontas para o consumo. Foram avaliados 27 isolados de *Enterobacteriaceae* pertencentes a coleção de cultura do laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos (LHIMA), da Faculdade de Farmácia da UFF, previamente isolados de 20 amostras de saladas de hortaliças cruas prontas para o consumo (tomate (n=5), alface (n=3), rúcula (n=1), pepino (n=1), beterraba (n=2) e múltiplas hortaliças (n=8)). Após avaliação da pureza dos isolados foram identificadas 38 cepas de *Enterobacteriaceae*, distribuídas em 10 gêneros e 14 espécies, com maior prevalência de *Enterobacter cloacae* (24,24%). O perfil de resistência foi avaliado a partir de 19 antibióticos de 12 diferentes classes. Apenas quatro (10,53%) cepas foram sensíveis a todos os antimicrobianos. Treze (34,21%) cepas apresentaram resistência a três ou mais classes de antimicrobianos, sendo classificadas como multidrogas resistente (MDR) e três (7,28%) cepas apresentaram fenótipo de produção de β -lactamase de espectro estendido (ESBL). As cepas com resistência antimicrobiana, apresentaram resistência a pelo menos um β -lactâmico, sendo 19 (50%) resistente a penicilina. Nenhum isolado apresentou resistência a carbapenêmicos. Onze (28,95%) isolados apresentaram resistência a nitrofurantoína, quatro (10,53%) ao ácido nalidíxico, um (2,63%) a tetraciclina e um (2,63%) ao cloranfenicol. Nenhum isolado apresentou resistência aos aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina), a levofloxacina, ao trimetoprim, a minociclina e a fosfomicina. As saladas de hortaliças cruas prontas para o consumo são um importante veículo de *Enterobacteriaceae* resistentes a antimicrobianos, incluindo cepas MDR e ESBL.

Palavras-chave: Hortaliças, *Enterobacteriaceae*, resistência antimicrobianos, multidroga resistente, ESBL.

ABSTRACT

A global problem that has attracted attention is the expansion of the bacteria resistant to antimicrobials, including, mainly, *Enterobacteriaceae* strains. Vegetables eaten raw can present a potential risk to the health of the consumer, due to the possible presence of pathogenic *Enterobacteriaceae* strains, as well as strains resistant to antimicrobials. Also, the transfer of antimicrobial resistance genes between strains of the same species or different species may occur in the food or the intestine, reducing, as a consequence, the treatment options for *Enterobacteriaceae* infections. This study aimed to evaluate the antimicrobial resistance profile in *Enterobacteriaceae* strains isolated from ready-to-eat raw vegetable salads. A total of 27 *Enterobacteriaceae*, of the Hygiene and Food Microbiology Laboratory (LHIMA) culture collection, at Faculty of Pharmacy, UFF, previously isolated from 20 samples of ready-to-eat raw vegetable salads (tomato (n=5), lettuce (n=3), rocket (n=1), cucumber (n=1), sugar-beet (n=2), multiple vegetables (n=8)), were evaluated. After evaluating the purity of the isolates, 38 strains of *Enterobacteriaceae* were identified, distributed in 10 genera and 14 species, with a higher prevalence of *Enterobacter cloacae* (24.24%). The resistance profile had assessed using 19 antibiotics from 12 different classes. As a result, only four (10.53%) strains were sensitive to all antimicrobials. Thirteen (34.21%) strains shown resistance to three or more classes of antimicrobials, having classified as multidrug-resistant (MDR), and three (7.28%) strains showed extended-spectrum β -lactamase (ESBL) phenotype. Antimicrobial resistance strains showed resistance to at least one β -lactam, with 19 (50%) resistant to penicillin. No isolate showed resistance to carbapenem. Eleven (28.95%) isolates showed resistance to nitrofurantoin, four (10.53%) to nalidixic acid, one (2.63%) to tetracycline, and one (2.63%) to chloramphenicol. No isolate showed resistance to aminoglycosides (amikacin and gentamicin), levofloxacin, trimethoprim, minocycline and fosfomycin. Ready-to-eat raw vegetable salads are a relevant vehicle for antimicrobial-resistant *Enterobacteriaceae*, including MDR and ESBL strains.

Keywords: Vegetables, *Enterobacteriaceae*, antimicrobial resistance, multidrug-resistant, ESBL.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 Estrutura dos antibióticos β -lactâmicos, p.10.
- FIGURA 2 Hidrolise do anel β -lactâmicos pela β -lactamase, p.10.
- FIGURA 3 Porcentagem de isolados de *Enterobacteriaceae* por restaurante, p. 19.
- FIGURA 4 Gêneros bacterianos pertencentes a família *Enterobacteriaceae* isolados de saladas de hortaliças cruas prontas para o consumo, p. 20.
- FIGURA 5 Espécies bacterianas pertencentes a família *Enterobacteriaceae* isoladas de saladas de hortaliças cruas prontas para o consumo, p. 21.
- FIGURA 6 Número de espécies diferentes de *Enterobacteriaceae* para cada restaurante selecionado, p. 22.
- FIGURA 7 Espécies que mais apresentaram resistência a três ou mais classes de antimicrobianos (MDR), p. 23.
- FIGURA 8 Número de isolados de *Enterobacteriaceae* resistente a cada antimicrobiano, p. 25.
- QUADRO 1 Origem (restaurante e salada crua) e número de *Enterobacteriaceae* da coleção de cultura do laboratório, p. 13.
- QUADRO 2 Antimicrobianos usados e sua concentração, p.15.
- TABELA 1 Perfil de resistência a antimicrobianos dos isolados de *Enterobacteriaceae* por restaurante e tipo de salada, p. 17.
- TABELA 2 Número de *Enterobacteriaceae* isoladas de saladas de hortaliças cruas prontas para o consumo quanto ao fenótipo de sensibilidade (S), resistência (R) e multidroga resistência (MDR) a antimicrobianos e produção de β -lactamase de espectro estendido (ESBL), p.24.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMC	Amoxicilina + Clavulonato
AMI	Amicacina
AMH	Ágar Muller-Hinton
AMP	Ampicilina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APPCC	Análise De Perigos e Pontos Críticos de Controle
ABP	<i>Agar Baird-Parker</i>
ATM	Aztreonam
BP	Boas Práticas
BPA	Boas Práticas Agropecuárias
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CAZ	Ceftazidima
CFZ	Cefazolina
CFO	Cefoxitina
CXM	Cefuroxima
CLO	Cloranfenicol
CLSI	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
CNNPA	Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos
DOA	Doença de origem alimentar
EMB	Ágar Eosina Azul de Metileno
FAO	<i>Food Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOS	Fosfomicina
ESBL	β -lactamases de espectro estendido
GEN	Gentamicina
ICMSF	<i>International Commission on Microbiological Specification for Foods</i>
IPM	Imipenem
ITU	Infecção do Trato Urinário
LVX	Levofloxacina

MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight
MDR	Multidroga Resistente
MER	Meropenem
MIN	Minociclina
MRS	<i>Methicilin-Resistant Staphylococcus</i>
MRSA	<i>Methicilin-Resistant Staphylococcus aureus</i>
NAL	Ácido Nalidixico
NIT	Nitrofurantoína
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBP	<i>Penicillin-binding protein</i>
PCCb	Ponto Crítico de Controle Biológico
R	Resistência
S	Sensibilidade
TET	Tetraciclina
TRI	Trimetoprim
TSA	<i>Tripticase Soy Agar</i>
TZP	Piperaciclina + Tazobactam
UFC	Unidades formadoras de colônia
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO, p.1

2 OBJETIVO, p.3

2.1 OBJETIVO GERAL, p.3

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS, p.3

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA, p.3

3.1 HORTALIÇAS, p.3

3.2 FERRAMENTAS DE CONTROLES DE PERIGOS, p.4

3.3 *Enterobacteriaceae*, p.6

3.4 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS, p.7

3.5 MALDI-TOF-MS, p. 11

4 METODOLOGIA, p.12

4.1 AMOSTRAGEM, p.12

4.2 VERIFICAÇÃO DA PUREZA DOS ISOLADOS, p.13

4.3 IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS, p.14

4.4 PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS, p.14

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO, p.16

5.1 VERIFICAÇÃO DA PUREZA E IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DOS ISOLADOS DE *Enterobacteriaceae* p.16

5.2 PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS, p.22

6 CONCLUSÃO, p.27

7. BIBLIOGRAFIA, p.28

1. INTRODUÇÃO

A alimentação tem ganhado cada vez mais importância no mundo atual, com destaque para o consumo de hortaliças (BRASIL, 2004; CALLEJÓN *et al.*, 2015). A Organização Mundial da Saúde (OMS) e a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) incentivam o consumo de quatro a cinco porções de hortaliças e frutas por dia (FAO, WHO, 2015).

Hortaliças são importantes fontes de fibras, vitaminas e sais minerais, sendo estes nutrientes melhores aproveitados quando as hortaliças são consumidas cruas (CALLEJÓN *et al.*, 2015; ZEKAR *et al.*, 2017). Entretanto, o consumo desses alimentos na sua forma crua, pode ocasionar Doenças de Origem Alimentar (DOA), devido, a possível presença de bactérias patogênicas (ZEKAR *et al.*, 2017).

O cuidado nas fases de cultivo, colheita, transporte e embalagens é importante para controlar a contaminação das hortaliças por microrganismos patogênicos (PAGADALA *et al.*, 2015). As Boas Práticas Agropecuárias (BPA), no campo, e as Boas Práticas de Fabricação (BPF), durante o processamento das saladas cruas de hortaliças, são fundamentais para garantia da inocuidade do produto.

A contaminação das saladas cruas pode ocorrer durante as diferentes etapas do processamento, principalmente por falha no processo de higienização e/ou por contaminação após higienização (DEVIDES *et al.*, 2014). Trabalhos nacionais (TRESSELER *et al.*, 2009; MACHADO *et al.*, 2018; BELTRÃO, 2019) e internacionais (TABAN *et al.*, 2013; AL-KHAROUSI *et al.*, 2016; TANGO *et al.*, 2018) têm descrito uma variedade de gêneros e espécies bacterianas isolada de saladas de hortaliças cruas prontas para o consumo.

A família *Enterobacteriaceae* se destaca entre as bactérias isoladas de saladas de hortaliças cruas prontas para o consumo (TANGO *et al.*, 2018; MACHADO *et al.*, 2018; BELTRÃO, 2019). A família *Enterobacteriaceae* está presente na microbiota intestinal do ser humano e animais de sangue quente, no solo, água e vegetais (SILVA *et al.*, 2013). *Enterobacteriaceae* podem estar associadas com doenças intestinais e extra intestinais, onde *Salmonella*, *Shigella dysenteriae* e *E. coli* diarreiogênica, são importantes patógenos intestinais, e outras espécies, como *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. e *Citrobacter* spp., se comportam como patógenos oportunistas de infecções extra intestinais (KANG *et al.*, 2018).

Entre as várias características da família *Enterobacteriaceae*, uma das mais importantes é a capacidade de desenvolver mecanismos de resistência a antimicrobianos (VERRAES *et al.*, 2013), apresentando, muitas vezes, o perfil de resistência a múltiplos antimicrobianos, o que torna o controle e tratamento da infecção um desafio (BASSETTI *et al.*, 2013).

A utilização de antimicrobianos no tratamento de infecções humanas e animais pode criar pressão evolutiva seletiva (WELLINGTON *et al.*, 2013). Além disso, genes de resistência a antimicrobianos podem ser transferidos entre bactérias, inclusive as com taxonomia diferentes, presentes no alimento ou no intestino (JUNG; MATTHEWS, 2016). Tanto a pressão seletiva, quanto a transferência de genes, levam a resistência a antimicrobianos, culminando em falhas no tratamento de infecções, elevando o índice de mortalidade (WELLINGTON *et al.*, 2013; JUNG; MATTHEWS, 2016).

Existem vários mecanismos que culminam na resistência bacteriana a antimicrobianos, como: degradação enzimática de antibióticos, bombas de efluxo, modificação do local alvo de ligação do antimicrobiano e mudanças da parede celular bacteriana (VERRAES *et al.*, 2013). As infecções por *Enterobacteriaceae* resistentes a antimicrobianos são frequentemente causadas por cepas produtoras de β -lactamases, principalmente β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e carbapenemase (BASSETTI *et al.*, 2013).

Os alimentos podem se comportar como um importante veículo de distribuição de bactérias resistentes a antimicrobianos (VERRAES *et al.*, 2013; GREIG *et al.*, 2014). A investigação do perfil de resistência aos antimicrobianos entre as *Enterobacteriaceae* isoladas de saladas de hortaliças cruas pronta para o consumo fornece informações que permitem avaliar o risco destes alimentos para a saúde pública.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo avaliar o perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Enterocacteriaceae* isoladas de saladas de hortaliças cruas prontas para o consumo.

2.2 Objetivos específicos

Verificar a pureza dos isolados de *Enterobacteriaceae* da coleção de cultura do laboratório.

Confirmar a identificação taxonômica (gênero/espécie) das *Enterobacteriaceae* da coleção de cultura do laboratório.

Avaliar o perfil de resistência a antimicrobianos das *Enterobacteriaceae* da coleção de cultura do laboratório.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Hortaliças

As hortaliças são, segundo a Resolução nº 12 de 1978 da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) da Gerência-Geral de Alimentos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), plantas “herbáceas” que têm uma ou mais partes utilizadas como alimento. São classificadas quanto a partes comestíveis como: verdura, legumes e raízes. A primeira quando se utiliza a parte verde, a segunda quando é utilizado o fruto e/ou semente e a terceira parte quando é utilizado suas raízes, ou seja, sua parte subterrânea desenvolvida (BRASIL, 1978).

Quanto as suas características, as hortaliças são classificadas como extra, de primeira e de segunda. As extras são de elevada qualidade, desenvolvimento adequado, compactas e firmes, com uniformidade na coloração, tamanho, não apresentando defeitos. As de primeira são de boa qualidade, desenvolvidas, compactadas e firmes, com coloração uniforme e sem danos que alterem sua conformação e aparência, porém, são permitidos pequenos defeitos ou manchas. As de segunda apresentam defeitos na conformação e descoloração que não afetam seriamente suas características e são permitidos pequenos danos de origem física ou mecânica (BRASIL, 1978).

O consumo de hortaliças traz benefícios ao corpo humano já que apresentam vitaminas, minerais, fibras e antioxidantes. Com macro e micro nutrientes em quantidades adequadas, o consumo de hortaliças é importante para prevenção de doenças crônicas. Zhang *et al.* (2015) demonstraram que antioxidantes fitoquímicos presentes em hortaliças, como polifenóis e carotenoides, evitam doenças cardiovasculares e certos tipos de câncer.

O consumo de hortaliças cruas é fundamental para o aproveitamento dos nutrientes, no entanto, pode ser um importante veículo de bactérias patogênicas quando elaboradas a partir de práticas higiênicas inadequadas. Sendo assim, a aplicação das Boas Práticas Agrícolas e as Boas Práticas de Fabricação são ferramentas extremamente necessárias para garantir a qualidade e segurança do produto final.

O calor é utilizado como alternativa para o controle microbiológico, no entanto, quando as hortaliças são submetidas ao cozimento, ocorre a redução da bioviabilidade dos nutrientes, como vitamina C e vitaminas do complexo B, que são hidrossolúveis e vulneráveis a degradação no calor (CHIAVARO *et al.* 2012).

Além disso, a atividade de antioxidantes presentes nas hortaliças é reduzida no cozimento (NICOLI *et al.*, 1999; ZHANG, HAMAUZU, 2004). Por outro lado, o calor elimina muitos microrganismos, sendo uma ferramenta importante para prevenção destes. Assim, hortaliças cruas podem ser um importante veículo de bactérias patogênicas (CERNA-CORTES *et al.*, 2015). As BPA e as BPF são ferramentas fundamentais para o controle de perigos nas hortaliças cruas, e assim garantir a qualidade e segurança do produto final (BEUCHAT, 2002; MATTICK *et al.*, 2003).

3.2. Ferramentas de controle de perigos

As ferramentas de controle de perigos são as boas práticas agrícolas (BPA), boas práticas de fabricação (BPF) e análise de perigos e pontos críticos de controle (APPCC).

As Boas Práticas (BP) têm como objetivo padronizar normas e procedimentos para o correto manuseio dos alimentos. Sua aplicação vai desde a produção da matéria-prima até o produto final, controlando possíveis perigos,

garantindo assim a produção de alimentos inócuos (seguro) (SILVA JÚNIOR, 2014).

As BPA adotam práticas simples para reduzir perdas e aumentar a qualidade dos produtos hortícolas na colheita e pós-colheita (ROSA *et al.*, 2018). As BPF englobam as etapas de manipulação, preparação e armazenamento de alimentos utilizadas pelas indústrias e serviços de alimentação (SILVA JÚNIOR, 2014).

APPCC têm como finalidade analisar a produção de alimentos nos quesitos de riscos físicos, químicos e biológicos para controle da mesma. Os pontos chaves da produção para ocorrer essas análises são a produção da matéria-prima, suprimento, manuseio e fabricação, além da distribuição (LOPES, 2007).

Um alimento inócuo tem como definição aquele que está livre de perigos físicos, biológicos e químicos. Perigos físicos são os objetos estranhos, como fragmentos de vidros, metais, madeiras e pedras, espinhas de peixe, cabelos, dentes, unhas, pedaços de pallets. Perigos biológicos são os microrganismos patogênicos presentes no alimento. Perigos químicos são substâncias como micotoxinas, toxinas bacterianas, pesticidas, aminas biogênicas, tintas, antibióticos, produtos de limpeza, lubrificantes e aditivos (HANNING, 2012).

Os perigos biológicos são os mais descritos em doenças de origem alimentar (DOA) (ZEKAR *et al.*, 2017). A dose infectante do microrganismo ou a quantidade de microrganismo capaz de produzir toxina suficiente para causar dano a saúde do consumidor, é menor do que a quantidade necessária de microrganismo capaz de causar alterações indesejáveis visíveis no alimento. Assim, as DOA são geralmente ocasionadas pelo consumo de alimentos de boa aparência, sem alterações sensoriais (FORSYTHE, 2010). O perigo biológico pode ocorrer no alimento através de práticas inadequadas de manipulação, matérias-primas contaminadas ou mal acondicionadas, falta de higiene pessoal durante a preparação, além de equipamentos e estrutura operacional deficiente (DEVIDES *et al.*, 2014; SULTANA *et al.*, 2013).

A contaminação das saladas de hortaliças cruas pode ter como origem diferentes pontos da cadeia produtora. As hortaliças, utilizadas como matéria-prima das saladas, podem ser contaminadas por microrganismos patogênicos na etapa de cultivo e colheita, através do solo e/ou pela água de irrigação (KÖCK *et al.*, 2018; SILVA, LINCOPAN, 2012). Caixas mal higienizadas podem ser as responsáveis

pela contaminação durante o transporte, onde ainda a falta de controle de temperatura pode favorecer a multiplicação microbiana (DEVIDES *et al.*, 2014). Durante a produção, a contaminação das saladas de hortaliças cruas pode ocorrer através de falta de higiene pessoal dos manipuladores, falta de higiene do ambiente de processamento, higiene deficiente dos equipamentos e utensílios e, principalmente, falha durante a etapa de higienização das hortaliças.

A etapa de higienização das hortaliças é fundamental para o controle de perigos biológicos e garantia da inocuidade do produto, sendo esta etapa identificada como um ponto crítico de controle biológico (PCCb) no Plano APPCC do fluxograma de processo de saladas de hortaliças cruas (Beltrão *et al.*, 2017). O processo de higienização de hortaliças consumidas cruas acontece em duas etapas. Na limpeza, ocorre a retirada de substâncias minerais e ou orgânicas indesejáveis, terra, poeira, gordura e outras sujidades. Na desinfecção ocorre a redução do número de microrganismos totais e eliminação de bactérias patogênicas, incluindo muitas *Enterobacteriaceae* (BRASIL, 2004; BELTRÃO *et al.*, 2017).

3.3. *Enterobacteriaceae*

A família *Enterobacteriaceae* compreende um grande grupo de bactérias Gram-negativas, não formadoras de esporos, anaeróbias facultativas, catalase positivo, oxidase negativo, redutoras de nitrato a nitrito, fermentadoras de glicose com produção de ácido e gás (JAY, TONDO, 2005). Seu nome vem pelo fato de serem encontrados no trato intestinal do ser humano e animais de sangue quente (WINN *et al.*, 2008). *Enterobacteriaceae* também têm como habitat locais como solo e vegetação (WINN *et al.*, 2008), com exceção para a espécie *Escherichia coli*, que tem como habitat exclusivo o intestino (TCHAPTCHET, HANSEN, 2011).

Atualmente são descritos 29 gêneros e 187 espécies de *Enterobacteriaceae* (ADEOLU *et al.*, 2016; www.namesforlife.com). No entanto, apenas em torno de 20 espécies são relatadas como causadoras de infecções (MURRAY *et al.*, 2009, ANVISA, 2013). Mesmo apresentando espécies patogênicas, não é possível relacionar a presença de *Enterobacteriaceae* diretamente com a presença de patógenos no alimento (JOHNSON; RUSSO, 2002).

Salmonella spp., *E. coli* e *Shigella dysenteriae* são os principais patógenos da família *Enterobacteriaceae* envolvidos em surtos de DOA. Além disso, *Enterobacteriaceae* podem ocasionar infecções extra intestinais, como peritonite, pneumonia, bacteremia, meningite e infecção do trato urinário (ITU) (PELEG *et al.*, 2010). *Klebsiella*, *Citrobacter* e *Enterobacter* são incluídos como importantes patógenos oportunistas, envolvidos principalmente em infecções hospitalares (JAY, TONDO, 2005).

A ITU é a segunda infecção hospitalar mais comum, ocasionada, principalmente pela utilização de métodos invasivos, como cateteres urinários.

A ocorrência de infecção extra intestinal por *Enterobacteriaceae* resistentes a antimicrobianos é frequente, aumentando o tempo de tratamento, e com frequência, aumentando o tempo de permanência no hospital, elevando a taxa de mortalidade (SCHWABER, *et al.*, 2007; VARGAS *et al.*, 2018; AKBARI *et al.*, 2014).

3.4. Resistência a antimicrobianos

A utilização de antimicrobianos tem como finalidade combater a infecção, inibindo o crescimento do microrganismo (ACAR, 2002; VERRAES *et al.*, 2013). Os antimicrobianos compreendem os antibióticos, usados para tratar infecções bacterianas em humanos e animais, bem como os biocidas químicos, usados para desinfecção do ambiente de processamento de alimentos (VERRAES *et al.*, 2013). Neste estudo utilizaremos o termo antimicrobiano para se referir aos antibióticos.

Com o início do uso da penicilina no combate a infecção microbiana, a partir de 1940, houve um avanço na medicina em relação aos tratamentos. No entanto, a ampliação do uso da penicilina levou ao desenvolvimento de mecanismos de resistência pelos microrganismos, necessitando assim, que novos antimicrobianos fossem pesquisados (CDC, 2013). O desenvolvimento de antimicrobianos destinados ao controle de infecções por bactérias Gram-positiva é mais amplo e promissor do que para bactérias Gram-negativas (PASCUAL *et al.*, 2014).

A resistência a antimicrobianos pode ser definida como a capacidade de um microrganismo não ser afetado pela atividade inibidora de um antimicrobiano (VERRAES *et al.*, 2013). Existem vários mecanismos que culminam na resistência bacteriana a antimicrobianos, como: (1) degradação enzimática de antibióticos; (2) alteração da permeabilidade da parede celular bacteriana; (3) modificação do sítio

alvo de ligação do antibiótico; e (4) vias alternativas para escapar da atividade antimicrobiana (VERRAES *et al.*, 2013).

A degradação enzimática de antibióticos é causada por enzimas produzidas pelo microrganismo. As enzimas degradam parte importante do antibiótico que afeta a bactéria. Um exemplo é a enzima β -lactamase que hidrolisa o anel β -lactâmico do antibiótico (VERRAES *et al.*, 2013).

A alteração da permeabilidade da parede celular bacteriana é quando a bactéria altera sua parede e assim reduz entrada ou aumenta o efluxo de antibiótico, alterando a concentração do mesmo dentro da célula. Os poros podem ser alterados para inibir a entrada do antibiótico na célula. Este mecanismo de resistência geralmente está relacionado a um fenótipo de multirresistência (VERRAES *et al.*, 2013).

A modificação do sítio alvo de ligação do antibiótico na célula impede a ligação do antibiótico e, conseqüentemente a capacidade do mesmo de matar ou impedir a multiplicação da bactéria. Este mecanismo ocorre em *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA), que modificam a proteína PBP (*Penicillin-binding protein*) da parede celular, substituindo por uma variante, PBP2A, impedindo assim a ligação do antibiótico (VERRAES *et al.*, 2013).

As vias alternativas para escapar da atividade antimicrobiana inclui seguir caminho diferente da via fisiológica normal da bactéria, escapando assim da atividade do antibiótico. Isso acontece quando uma enzima, diferente da existente, auxilia na degradação enzimática do antibiótico (VERRAES *et al.*, 2013).

A resistência a antimicrobianos é decorrente da produção de proteínas codificadas por genes presentes no genoma bacteriano. Os genes de resistência a antimicrobianos podem ser transferidos de uma bactéria para outra, fazendo com que a bactéria receptora também produza os mecanismos de resistência. Essa transferência pode ocorrer mesmo quando as bactérias não são da mesma família, gênero ou espécie (GOLDENFELD, WOESE, 2007; ROSSI *et al.*, 2014).

A razão de um alimento cru ser um importante veículo de bactérias com mecanismos de resistência a antimicrobianos é o fato de conter altas populações de diferentes famílias, gêneros e espécie de bactérias. Dentre elas muitas são comensais e outras patogênicas. Assim, pode ocorrer a transferência de genes de resistência a antimicrobianos entre as bactérias comensais, que são importantes

reservatórios destes genes, e as patogênicas, agravando o problema de saúde pública (JUNG; MATTHEWS, 2016). A transferência horizontal de genes é um ponto importante para o aumento de microrganismos com resistência a antibióticos (ROSSI *et al.*, 2014). Isso pode ocorrer, como já citado anteriormente, mesmo quando não estão relacionados taxonomicamente. As transferências ocorrem por mediação dos plasmídeos, transposons, além da recombinação de DNA exógeno ao cromossoma da bactéria (HIRAMATSU; KURODA; ITO, 2001). Essas transferências podem ocorrer durante o caminho dos produtos frescos, da produção até o consumidor final. Desse modo, a população de bactérias resistentes a antibióticos pode ser alterada difundindo sua diversidade (JUNG; MATTHEWS, 2016).

Uma das causas do aumento de mecanismos de resistência a antimicrobianos é a falta de cuidado com o descarte de antimicrobianos. A consequência dessas ações leva a contaminação do solo e com isso de lençóis freáticos e isto é uma preocupação, pois permite a chegada de resíduos de antimicrobianos aos seres humanos por meio dos alimentos (ROSSI *et al.*, 2014). O aumento da disseminação desses antimicrobianos na natureza junto aos vários mecanismos de resistência a antimicrobianos diminui as formas de tratamentos a doenças por bactérias patogênicas (WHO, 2015).

As bactérias que possuem resistência a três ou mais classes de antimicrobiano são definidas como bactérias multidroga resistentes (MDR) (MAGIORAKOS *et al.*, 2012). O aumento do surgimento de MDR eleva a preocupação com o tratamento das infecções, levando a necessidade de produção de novas drogas (MAGIORAKOS *et al.*, 2012).

Os principais tipos de antimicrobianos são os β -lactâmicos, como as penicilinas, os monobactâmicos, as cefalosporinas e os carbapenêmicos que apresentam na sua estrutura um anel β -lactâmico (Figura 1). Essa classe tem como característica inibir a síntese da parede celular bacteriana. A resistência a este tipo de antimicrobiano é pela produção de enzimas β -lactamases, que atuam rompendo a ligação amida (Figura 2) no anel β -lactâmico, e com isso o antibiótico perde a capacidade de inibir a síntese da parede celular da bactéria (WILLIAMS, 1999).

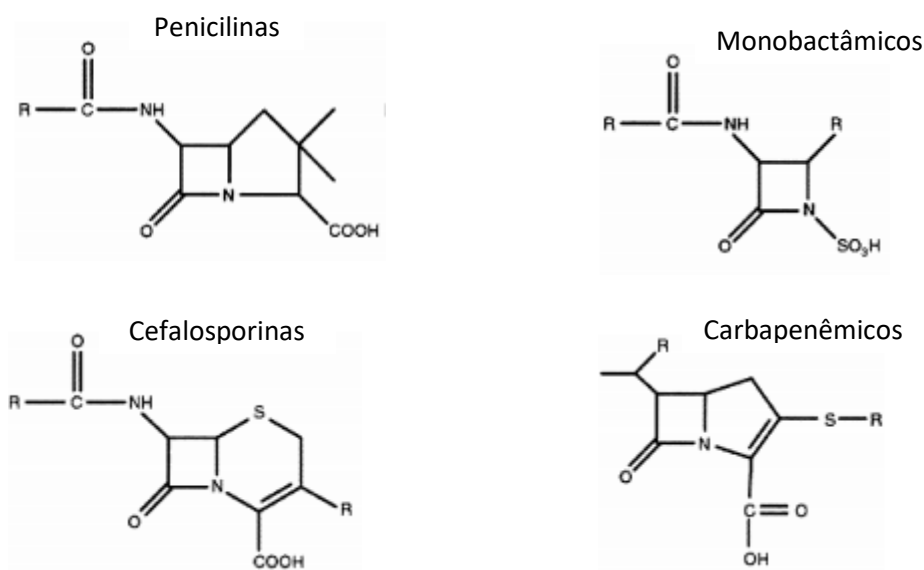


Figura 1. Estrutura dos antibióticos β -lactâmicos (Williams, 1999).

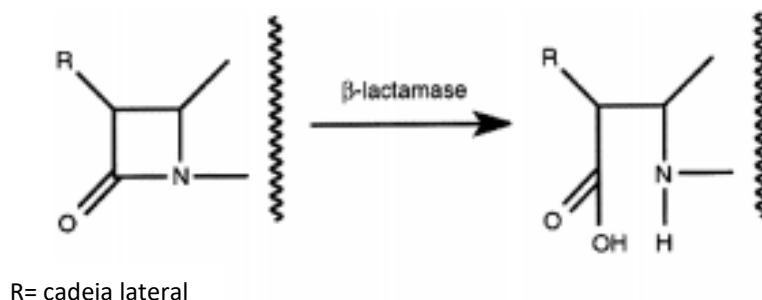


Figura 2. Hidrólise do anel β -lactâmicos pela β -lactamase(Williams, 1999).

As β -lactamases podem ser classificadas em quatro grupos. O Grupo 1 inclui as β -lactamases de espectro estendido (ESBL) codificadas no cromossoma bacteriano; o Grupo 2 inclui as ESBL codificadas em plasmídeos bacterianos; o Grupo 3 inclui as carbapenemases; e o Grupo 4 inclui as penicilinas não inibidas pelo ácido clavulânico (BUSH et al., 1995).

As ESBLs têm ação principal contra os antimicrobianos monobactâmicos e cefalosporinas (GAZIN *et al.*, 2012). Os monobactâmicos são formados por uma estrutura monocíclica, onde o anel β -lactâmico não se encontra ligado a outro grupamento cíclico (Figura 1). O monobactâmico mais utilizado é o aztreonam. Este antibiótico age na síntese da parede celular e é altamente resistente à inativação por β -lactamases (www.anvisa.gov.br). As cefalosporinas são as mais prescritas

nos casos clínicos atuais. Entre os motivos para sua alta prescrição são as suas características como amplo espectro, baixa toxicidade e facilidade de administração. Sua formação com dois anéis, um β -lactâmico e outro di-hidrotiazina (Figura 1), faz com que anel β -lactâmico seja mais estável e assim mais resistente a β -lactamases (ACUÑA, 2017; BENNETT; DOLIN; BLASER, 2015).

A resistência a carbapenem é dada pela produção de carbapenemases. O carbapenem é o antibiótico utilizado como última escolha, já que serve para um amplo número de bactérias resistentes a outros antimicrobianos (SEKYERE; GOVINDEN; ESSACK, 2015). A resistência à carbapenem é preocupante já que ele é o último recurso para tratamento em bactérias produtoras de ESBL. As formas mais comuns de resistência a esse tipo de antimicrobiano são a produção de enzimas que hidrolisam o carbapenem, bombas de efluxo que retiram carbapenem da célula bacteriana ou mutações na parede celular da bactéria que impedem a entrada de carbapenem (MANGONI *et al.*, 2019). *Klebsiella variicola* e *K. pneumoniae* resistentes a carbapenem, foram isolados de hortaliças na Suíça (ZURFLUH *et al.*, 2015) e Argélia (TOUATI *et al.*, 2017). Isso demonstra que alimentos crus podem transmitir esse tipo de microrganismo de alta importância clínica.

As penicilinas não inibidas pelo ácido clavulânico é um grupo menor e mais novo. O ácido clavulânico induz a produção de β -lactamase e tem sido eficaz quando relacionado a amoxicilina para combater infecções causadas por bactérias tanto aeróbias quanto anaeróbias produtoras de β -lactamase (WRIGHT, 1999). Entretanto, aquelas que pertencem a esse grupo tem como principal característica inibir a ação deste composto, tornando ineficaz para o tratamento de infecções variadas.

3.5 MALDI-TOF

Espectrometria de massa de ionização e desorção a laser assistida por matriz (*matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight*; MALDI-TOF) consiste em analisar as proporções massa-carga (m/z) de íons moleculares a fim de identificar e quantificar moléculas utilizando espectrometria de massa. Esta tecnologia permite observar as características únicas dos microrganismos e dessa forma identificar gênero e/ou espécies (CROXATTO; PRODHOM, GREUB, 2012).

O espectrômetro de massa é composto por três unidades funcionais. A primeira é o gerador de íon que ioniza e transfere as moléculas para fase gasosa, a segunda tem como objetivo separar os íons de acordo com sua razão entre massa e carga (m/z) e a terceira é o dispositivo que detecta a separação dos íons (CROXATTO; PRODHOM, GREUB, 2012). O material é levado por um tubo de vácuo e chega ao TOF, detector de partícula que separa as partículas leves das pesadas. Proteínas com cargas positivas de peso molecular entre 2.000 e 20.000 m/z geram espectros que vão ser usados para identificação do microrganismo. O tamanho e sequência das proteínas ribossômicas são conservadas para diferentes espécies de microrganismos. Dessa forma, os resultados dessas etapas são comparados ao banco de dados do *software*, determinando o gênero e espécie do microrganismo (CROXATTO; PRODHOM, GREUB, 2012; HOU *et al*, 2019).

Sua utilização traz benefícios, pois é rápido e confiável. Assim, ele já está presente em vários laboratórios pelo mundo para identificação de diversos microrganismos isolados (SCHUBERT, KOSTRZEWA, 2016).

4. METODOLOGIA

4.1. Amostragem

Foram avaliados 27 isolados de *Enterobacteriaceae* pertencentes a coleção de cultura do laboratório de Higiene e Microbiologia de Alimentos (LHIMA), da Faculdade de Farmácia da UFF, previamente isolados de 20 amostras de saladas de hortaliça crua prontas para o consumo, tomate (n=5), alface (n=3), rúcula (n=1), pepino (n=1), beterraba (n=2), mista (n=8), adquiridas em 11 restaurantes do tipo *self-sevice* localizados em Niterói, RJ (Beltrão, 2019) (Quadro 1).

Quadro 1: Origem (restaurante e salada de hortaliça crua) e número de isolados de *Enterobacteriaceae* da coleção de cultura do laboratório.

Restaurante	Salada	Nº de <i>Enterobacteriaceae</i>
R5	Alface	1
	Tomate	1
R9	Rúcula, tomate cereja	1
R12	Rúcula, tomate seco, queijo minas frescal	1
	Pepino, rabanete	1
R13	Alface	1
R14	Rúcula	1
	Tomate	2
	Agrião, cenoura, cebola	2
R15	Alface	3
	Rúcula, morango	1
R16	Tomate	1
	Tomate cereja, queijo minas frescal	1
R17	Tomate	1
R18	Pepino	1
	Rúcula, manga, kani	2
	Beterraba	2
R19	Aipo, manga, kani	1
R20	Beterraba	2
	Tomate	1
n=11	n=20	n=27

4.2. Verificação da pureza dos isolados

As *Enterobacteriaceae* congeladas -20°C em caldo triptona soja (TSB; KASVI) suplementado com 20% de glicerol (v/v) (TSB-G) foram semeadas em 3 mL de TSB e incubados a 35°C por 20-24 h. As culturas em TSB foram semeadas, por esgotamento, em ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) e incubados a 35°C por 20-24 h. Posteriormente, foram verificadas as características das colônias. Duas a três colônias foram transferidas, por esgotamento, para placas de agar triptona de soja (TSA) e incubadas a 35°C por 20-24h. Após esse período, as colônias bacterianas em TSA foram encaminhadas ao Laboratório de Investigação em Microbiologia Médica- L IMM, do Instituto Paulo Góes da UFRJ, para identificação através de MALDI-TOF.

4.3. Identificação dos isolados

A identificação dos isolados purificados foi realizado em MALDI-TOF MS. Uma parte da cultura bacteriana em TSA foi transferida, com auxílio de um palito de madeira estéril, para uma placa de metal. Em seguida, foi adicionado uma solução de lise (ácido fórmico a 70%; Sigma-Aldrich®) sobre massa bacteriana, com secagem ao ar ambiente. Dessa forma foram obtidas as proteínas celulares. Após o tempo de secagem, 1 µL da solução matriz (ácido alfa-ciano-4-hidroxi-cinâmico diluído em acetonitrila 50% e ácido trifluoroacético 2,5%, Sigma-Aldrich®) foi adiciona aos poços da placa e também deixado para secagem ao ar ambiente. Após esse procedimento, a placa foi levada ao MALDI-TOFLT Microflex, Bruker®, onde foram gerados os espectros de massa de cada amostra, em uma faixa entre 2.000 e 20.000 m/z e analisado pelo MALDI Biotyper 3.1 Bruker®, um programa especial para essa análise. Esse programa tem um banco de dado que compara os resultados com os dados armazenados. A escala dos resultados varia de 0 a 3 pontos. Quanto mais perto do valor 3, mais precisa e confiável é a identificação. Pontuação entre 2,3 e 3 indicam identificação confiável da espécie. Entre 2 e 2,299, indicam identificação confiável do gênero, e provável identificação da espécie. Pontuação entre 1,7 e 1,999, indicam provável identificação do gênero. De 0 a 1,699 significa que a identificação não apresenta confiança necessária para determinar o gênero e conseqüentemente a espécie do isolado. Os isolados purificados e confirmados quanto ao gênero e/ou espécie através do MATDI TOF MS, com pontuação igual ou maior que 1,7, foram congelados a -20 °C em TSB-G.

4.4. Perfil de resistência a antimicrobianos

As *Enterobacteriaceae* identificadas com pontuação igual ou maior que 1,7, gerada a partir do MALDI TOF MS, foram avaliadas quanto ao perfil de resistência a antimicrobianos através do teste de disco difusão como recomendado pelo Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI, 2018). Os isolados congelados a -20°C foram semeados em TSA, incubado a 35 °C por 20-24 h. Duas colônias de cada isolado foram transferidas para solução salina a 0,85% (m/v), a fim de obter turvação de acordo com a solução padrão 0,5 da escala de Mac Farland, aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Para obtenção de um crescimento denso, o inóculo padronizado de cada isolado foi semeado com um swab, em Ágar Muller-

Hinton (AMH). Em seguida, com uma pinça, os discos de antimicrobiano (CEFAR, Brasil) (Quadro 2) foram pressionados levemente sobre o AMH, conforme o mapa previamente desenhado. As placas de AMH foram incubadas a 35°C por 18h. Terminado esse tempo, com uma régua, foi medido os halos de inibição e comparados com os valores determinado pelo CLSI (2018). *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle do teste.

Quadro 2. Antimicrobianos usados e sua concentração.

Sigla	Antimicrobiano
PENICILINA	
AMP	ampicilina (10 µg)
β-LACTÂMICOS COMBINADOS	
AMC	amoxicilina + clavulonato (20µg/10 µg)
TZP	piperaciclina + tazobactam (100/10 µg)
CEFALOSPORINA	
CFZ	cefazolina (30 µg)
CXM	cefuroxima(30 µg)
CAZ	ceftazidima (30 µg)
MONOBACTÂMICOS	
ATM	aztreonam (30 µg)
CARBAPENEMAS	
IPM	imipenem (10 µg)
MER	meropenem (10 µg)
AMINOGLICOSÍDEOS	
GEN	gentamicina (10 µg)
AMI	amicacina (30 µg)
TETRACICLINAS	
TET	tetraciclina (30 µg)
MIN	minociclina (30 µg)
FLUOROQUINOLONAS	
LVX	levofloxacina (5 µg)
NAL	ácido nalidixico (30 µg)
VIA ANTAGONISTA DO FOLATO	
TRI	trimetoprim (5 µg)
FENICOLS	
CLO	cloranfenicol (30 µg)
FOSFOMICINA	
FOS	Fosfomicina (200 µg)
NITROFURANTOINAS	
NIT	nitrofurantoína (300 µg)

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Verificação da pureza e identificação taxonômica dos isolados de *Enterobacteriaceae*

Foram selecionados e purificados 27 *Enterobacteriaceae* isoladas de 20 amostras de saladas de hortaliça crua prontas para o consumo, adquiridas em 11 restaurantes do tipo *self-service* localizados em Niterói, RJ (Beltrão, 2019). Alguns destes isolados estavam contaminados com mais de uma espécie de *Enterobacteriaceae*, resultando assim em 38 isolados finais (Tabela 1). A contaminação dos isolados da coleção de cultura pode ser decorrente de falhas no momento da seleção e “pescagem” da colônia isolada, levando a captura de indivíduos de diferentes colônias. A verificação da pureza dos isolados de uma coleção de cultura laboratorial é uma etapa importante que deve preceder qualquer estudo. Culturas contaminadas levam a resultados errados, já que mais de um tipo de microrganismo estará atuando interferindo no resultado final.

Tabela 1. Perfil de resistência a antimicrobianos das *Enterobacteriaceae*, por restaurante e tipo de salada.

Restaurante	Salada	Isolado	Gênero/espécie	Perfil de Resistência
R5	alface	F1R5/1	<i>Cronobacter sakazakii</i>	NIT
	tomate	F2R5/2.2	<i>Enterobacter cloacae</i>	AMP
		F2R5/2.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AMP, CXM, NIT (MDR)
R9	rúcula, tomate cereja	F3R9/7	<i>Klebsiella variicola</i>	-
R12	rúcula, tomate seco, e queijo minas frescal	F1R12/1.1	<i>Enterobacter asburiae</i>	AMP, CFZ, CXM
		F1R12/1.2	<i>Enterobacter</i> spp.	AMP, ATM, CFZ, CXM, CAZ, TRI (MDR; ESBL)
	pepino, rabanete	F4R12/2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AMP, AMC, CFZ, CXM (MDR)
R13	alface	F1R13/3	<i>Enterobacter cloacae</i>	AMC, CFZ, TET, NIT (MDR)
R14	rúcula	F1R14/2	<i>Enterobacter asburiae</i>	AMC, CFZ, CXM
	agrião, cenoura, cebola	F3R14/4.2	<i>Enterobacter asburiae</i>	AMP, AMC, CFZ, CXM, CLO (MDR)
		F3R14/1	<i>Enterobacter cloacae</i>	CFZ, NIT
		F3R14/4.1	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	-
	tomate	F2R14/2	<i>Enterobacter</i> spp.	AMP
		F2R14/3	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AMP, AMC, CFZ, NAL (MDR)
R15	rúcula, morango	F3R15/1.1	<i>Enterobacter cloacae</i>	CFZ, NIT
		F3R15/1.2	<i>Enterobacter</i> spp.	CFZ, CXM
	alface	F2R15/1.2	<i>Escherichia coli</i>	-
		F2R15/2.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
		F2R15/3	<i>Kluyvera ascorbata</i>	CFZ, CXM
		F2R15/2.2	<i>Kluyvera cryocrescens</i>	AMP, CFZ, CXM
	F2R15/1.1	<i>Pluralibacter gergoviae</i>	AMP, ATM, CXM, CAZ (MDR, ESBL)	

R16	tomate cereja, queijo minas frescal	F4R16/2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AMP, CXM, NIT (MDR)
	tomate	F2R16/6	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	AMP
R17	tomate	F3R17/8	<i>Serratia marcescens</i>	CFZ, CXM, NIT
R18	rúcula, manga, kani	F4R18/8.2	<i>Citrobacter freundii</i>	NIT, CFZ
		F4R18/1	<i>Enterobacter spp.</i>	CFZ, CXM
		F4R18/8.1	<i>Kluyvera ascorbata</i>	CFZ, CXM
	pepino	F3R18/1.2	<i>Enterobacter cloacae</i>	CFZ, CXM
		F3R18/1.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AMP
	beterraba	F2R18/2.2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	AMP, CFZ
		F2R18/2.1	<i>Serratia marcescens</i>	AMP, AMC, CFZ, CXM (MDR)
		F2R18/7	<i>Serratia marcescens</i>	AMP, AMC, CFZ, CXM, NIT (MDR)
R19	aipo, manga, kani	F5R19/7	<i>Enterobacter spp.</i>	AMP, AMC, CFZ (MDR)
R20	beterraba	F3R20/1	<i>Enterobacter cloacae</i>	AMC, CFZ, CXM
		F3R20/4.1	<i>Enterobacter cloacae</i>	AMP, CXM, NAL, NIT (MDR)
		F3R20/4.2	<i>Enterobacter kobei</i>	AMP, AMC, CFZ (MDR)
		F3R20/4.3	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	CFZ, CXM, NIT
	tomate	F5R20/3	<i>Enterobacter cloacae</i>	AMC, CFZ, CXM, CAZ (ESBL)
n=11	n=20	n=38		

AMP= ampicilina, AMC=amoxicilina/ ácido clavulânico, ATM=azetreonam, CFZ=cefazolina, CXM=cefuroxima, CAZ=ceftazidima, NAL=Ácido nalidixico, TRI=trimetoprim, NIT=Nitrofurantoina, CLO=Cloranfenicol, FOS=Fosfomicina. MDR: multidroga resistente (resistente a 3 ou mais classes de antimicrobianos). ESBL: fenótipo de produção da enzima β -lactamase de espectro estendido.

O restaurante com maior número de isolados de *Enterobacteriaceae* foi R18 (8/38; 21%), seguido de R15 (7/38; 18,40%), R14 (6/38;15,70%), R20 (5/38; 13,20%), R5, R12 (3/38; 7,90% cada), R16 (2/38; 5,30%) e R9, R13, R17 e R19 (1/38; 2,60% cada) (Figura 3).

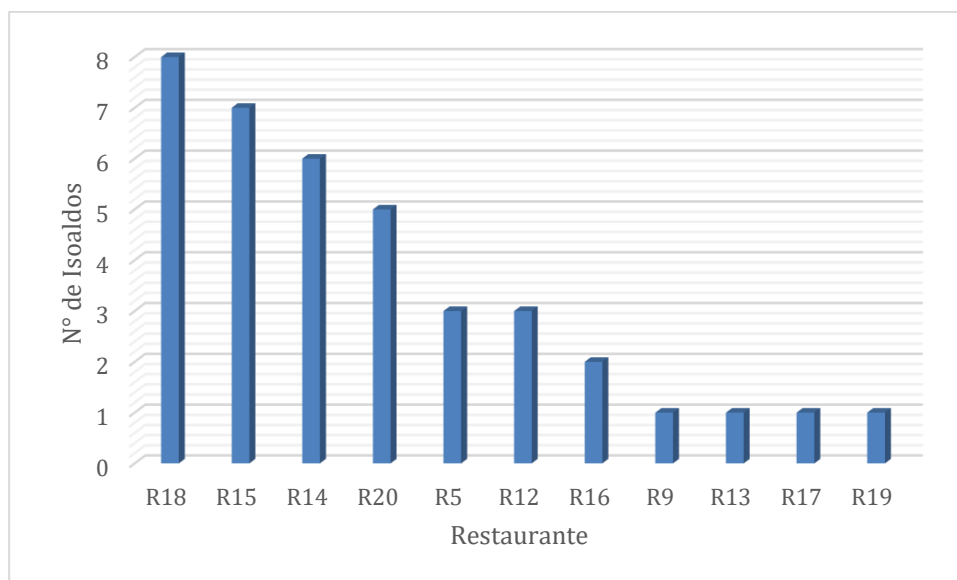


Figura 3. Número de isolados de *Enterobacteriaceae* por restaurante.

A partir dos 38 isolados foi possível identificar 10 diferentes gêneros (Tabela 1), com maior prevalência de *Enterobacter* (17/38; 44,74%), seguido de *Klebsiella* (8/38; 21,05%), *Kluyvera* (3/38; 7,90%), *Serratia* (3/38; 7,90%), *Leclercia* (2/38; 5,26%), *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Escherichia*, *Pluralibactere* *Raoultella* (1/38; 2,63% cada) (Figura 4). *Enterobacter* spp. e *Klebsiella* spp. foram isolados de oito (72,7%) dos 11 restaurantes.

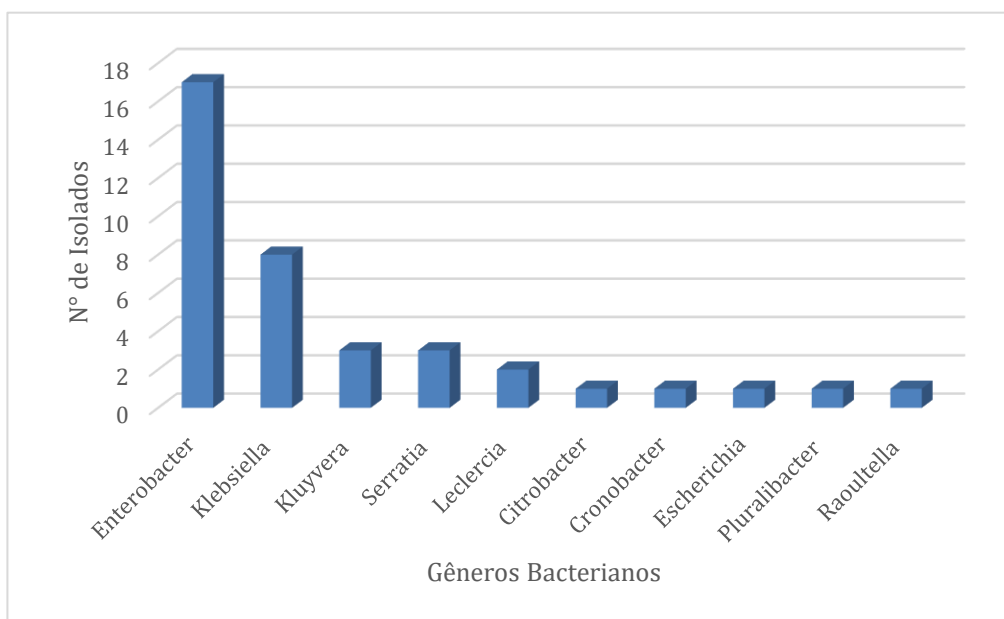


Figura 4. Gêneros bacterianos pertencentes a família *Enterobacteriaceae* isolados de saladas de hortaliças cruas prontas para o consumo.

Em 33 (86,40%), dos 38 isolados, foi possível identificar 14 espécies diferentes (Tabela 1). *Enterobacter cloacae* foi a espécie de maior prevalência (8/33; 24,24%), seguido de *Klebsiella pneumoniae* (7/33; 21,21%), *Enterobacter asburiae* e *Serratia marcescens* (3/33; 9,09%), *Kluyvera ascorbata* e *Leclercia adecarboxylata* (2/33; 6,06%), *Citrobacter freundii*, *Cronobacter sakazakii*, *Enterobacter kobei*, *Escherichia coli*, *Klebsiella variicola*, *Kluyvera cryocrescens*, *Pluralibacter gergoviae* e *Raoultella ornithinolytica* (1/33; 3,03% cada) (Figura 5).

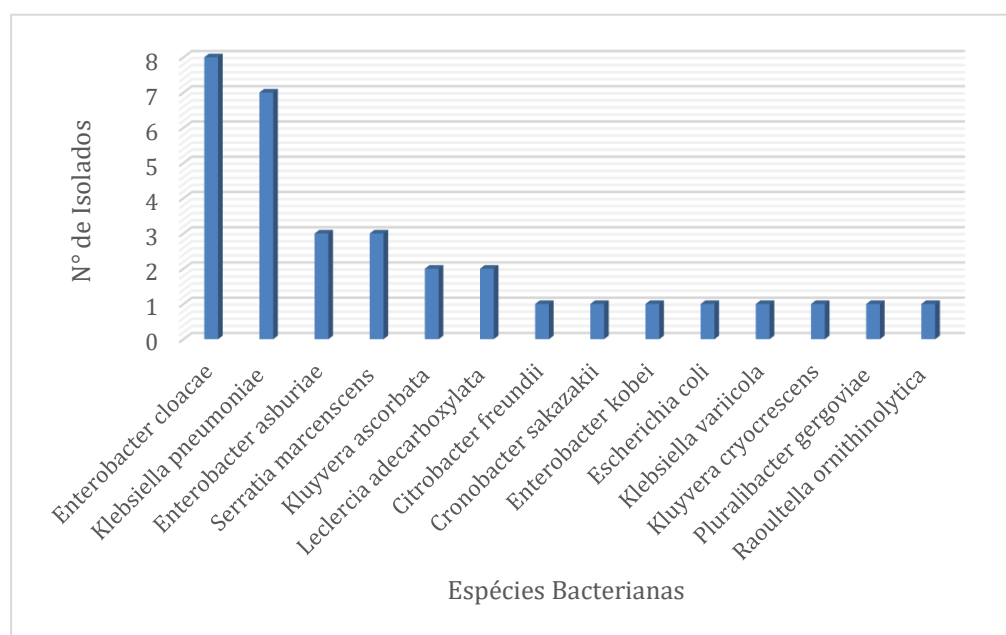


Figura 5. Espécies bacterianas pertencentes a família *Enterobacteriaceae* isoladas de saladas de hortaliças cruas prontas para o consumo.

O restaurante R15 apresentou a maior diversidade de espécies, seis (42,85%) seguido por R18, cinco (35,70%), R14, com quatro (28,57%), R5 e R20, com três (21,40%) e R12 e R16, com duas diferentes espécies isoladas (14,30%) (Tabela 1 e Figura 6). *Enterobacteriaceae* oportunistas e potencialmente patogênicas foram identificadas entre os isolados, com destaque para *Cronobacter sakazakii* isolado de uma amostra de alface do restaurante R5 e *E. coli*, também isolado de alface, no restaurante R15 (Tabela 1).

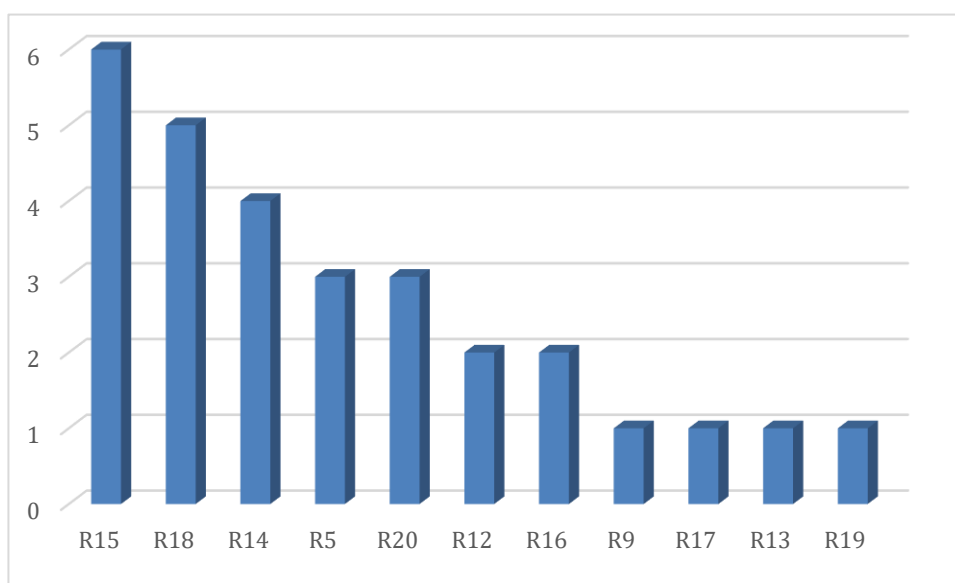


Figura 6. Número de espécies diferentes de *Enterobacteriaceae* para cada restaurante selecionado.

5.2. Perfil de resistência a antimicrobianos

A resistência bacteriana a antimicrobianos tem se mostrado um problema que vem se agravando acentuadamente, devido a expansão do número de cepas bacterianas expressando este perfil, seja por aquisição de genes de resistência ou por seleção (BHUTANI et al., 2015).

O perfil de resistência a antimicrobianos dos 38 isolados da família *Enterobacteriaceae* foi avaliado de acordo com as recomendações do CLSI (2018), utilizando 19 antimicrobianos pertencentes a 12 diferentes classes. Apenas 4 cepas (10,53%), foram sensíveis a todos os antimicrobianos, uma *K. variicola*, isolada de salada de rúcula, tomate e cereja, no restaurante R9, uma

Leclerciaadecarboxylata, isolada de salada de agrião, cenoura e cebola, no restaurante R14, e *E. coli* e *K. pneumoniae*, isoladas de uma amostra de salada de alface, no restaurante R15 (Tabela 1, Tabela 2). Trinta e quatro cepas (89,47%) apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano, (Tabela 2).

Treze (34,21%), dos 38 isolados, apresentaram resistência a três ou mais classes de antimicrobianos, sendo classificados como MDR (Tabela 1, Tabela 2). A maioria das cepas (6/13; 46%) pertencia ao gênero *Enterobacter*, seguido de *K. pneumoniae* (4/13; 31%), *Serratia marcescens* (2/13; 15%) e *Pluralibacter gergoviae* (1/13; 8%) (Figura 7). Essas amostras foram isoladas de 11 (55%) das 20 amostras avaliadas (6; 54,55% amostras de salada de hortaliça crua individual e 5; 45,45% de saladas mista), coletadas em nove (81,82%) dos 11 restaurantes selecionados (Tabela 1).

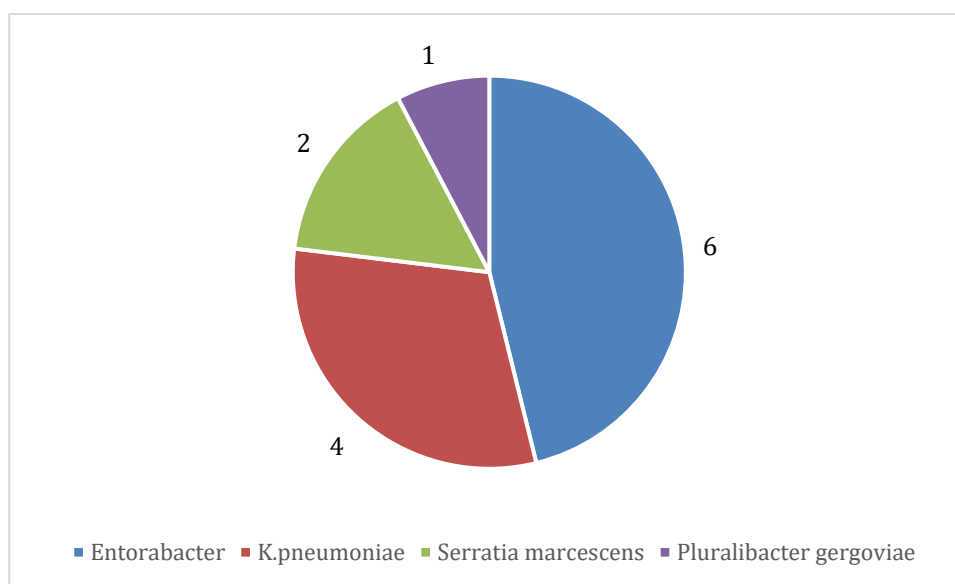


Figura 7. Espécies com perfil de resistência a três ou mais classes de antimicrobianos (multidroga resistentes; MDR).

K. pneumoniae é um patógeno oportunista relacionado a infecções do trato urinário (ITU), septicemia e outras doenças extra intestinais (GUO et al., 2016). *K. pneumoniae* pode ser encontrada em equipamento médicos, superfície da pele da equipe médica dos hospitais e trato gastrointestinal de pacientes. Além desses locais, *K. pneumoniae* causa doenças invasivas em animais, dessa forma, animais e alimentos podem ser reservatórios para esta bactéria. Recentes estudos

mostram que esta espécie apresenta inúmeros genes que a possibilita se adaptar aos habitats de estresse que os tratamentos por antibióticos criam. Tratamento para essa bactéria está mais difícil por ela apresentar fenótipo MDR. Este fenótipo leva um vasto alcance de resistência a múltiplas drogas restringindo as opções viáveis para tratamento (MORADIGARAVAND *et al.*, 2017).

Tabela 2: Número de *Enterobacteriaceae* isoladas de saladas de hortaliças cruas prontas para o consumo quanto aos fenótipos.

Gênero/espécie	N° de isolados	Fenótipo (%)			
		S	R	MDR	ESBL
<i>Enterobacter</i>	17	0	17 (100)	6 (35,29)	2 (11,76)
<i>E. asburiae</i>	3	0	3 (100)	1 (33,33)	0
<i>E. cloacae</i>	8	0	8 (100)	3 (37,5)	1 (12,5)
<i>E. kobei</i>	1	0	1 (100)	1 (100)	0
<i>Enterobacter</i> spp.	5	0	5 (100)	1 (20)	1 (20)
<i>Klebsiella</i>	8	2 (25)	6 (75)	4 (50)	0
<i>K. pneumoniae</i>	7	1(14,28)	6 (85,70)	4 (57,14)	0
<i>K. variicola</i>	1	1	0	0	0
<i>Kluyvera</i>	3	0	3 (100)	0	0
<i>K. ascorbata</i>	2	0	2 (100)	0	0
<i>K. cryocrescens</i>	1	0	1 (100)	0	0
Outras <i>Enterobacteriaceae</i>	10	2 (20)	8 (80)	3 (30)	1 (10)
<i>Serratia marcescens</i>	3	0	3 (100)	2 (66,60)	0
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1	0	1 (100)	0	0
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	2	1 (50)	1 (50)	0	0
<i>Escherichia coli</i>	1	1 (100)	0	0	0
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0	1 (100)	0	0
<i>Pluralibacter gergoviae</i>	1	0	1 (100)	1 (100)	1 (100)
<i>Cronobacter sakazakii</i>	1	0	1 (100)	0	0
Total	38	4 (10,53)	34 (89,47)	13 (34,21)	3 (7,80)

S: sensível a todos os antimicrobianos. R: resistência a um ou mais antimicrobianos. MDR: multidroga resistente (resistente a 3 ou mais classes de antimicrobianos). ESBL: produção de β -lactamase de espectro estendido.

Todos os isolados, com perfil de resistência a antimicrobianos, apresentaram resistência a pelo menos um β -lactâmico, com destaque para cefazolina (CFZ) (25/34; 73,53%), seguida de cefuroxima (CXM) (22/34; 64,71%), ampicilina (AMP) (19/34; 55,88%), amoxicilina/ácido clavulânico (AMC) (12/34; 35,29%), ceftazidima (CAZ) (3/34; 8,82%) e azetreonam (ATM) (2/34; 5,88%).

Este resultado corrobora com dados da literatura que descrevem alta prevalência de *Enterobacteriaceae* resistente a β -lactâmicos (REGLI, *et al.* 2019).

Dezenove (50%) isolados apresentaram resistência a classe Penicilina. Este fenótipo foi identificado a partir da resistência a ampicilina (AMP). Ampicilina é um antimicrobiano da classe dos β -lactâmicos usado em larga escala no passado. A excessiva utilização deste antimicrobiano levou ao desenvolvimento de mecanismos de resistência pelas bactérias (YOUNG *et al.* 1989).

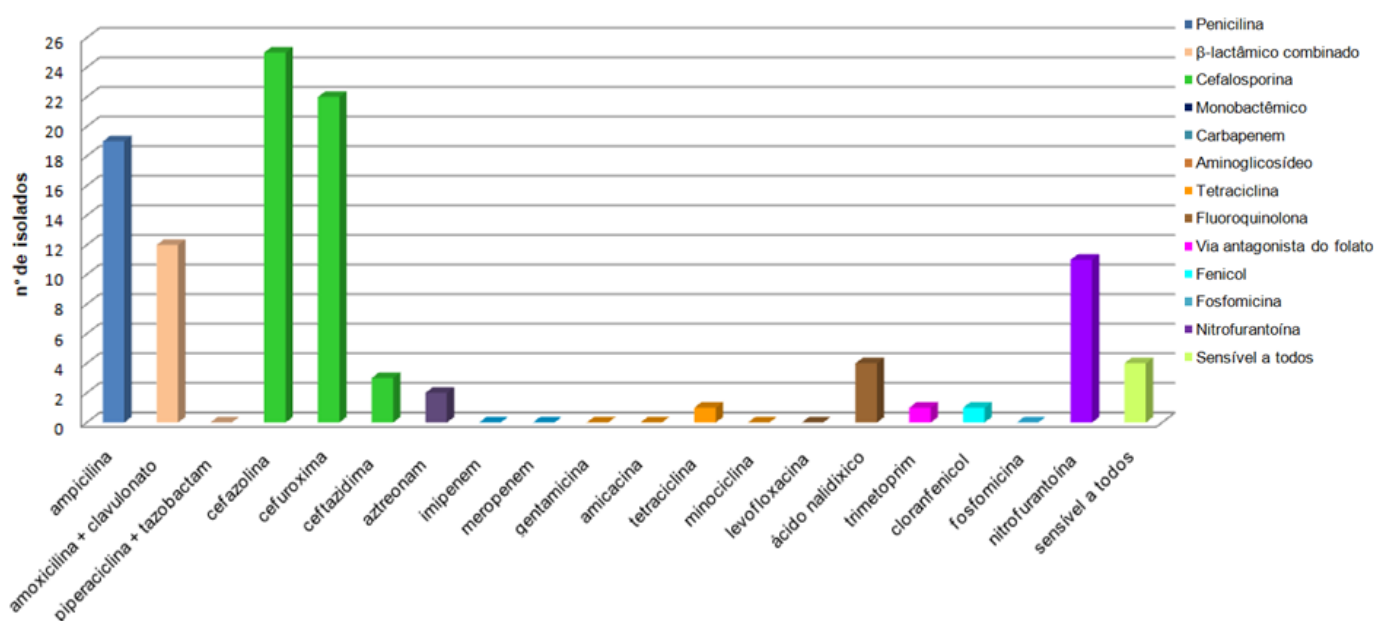


Figura 8. Número de isolados de *Enterobacteriaceae* resistente a cada antimicrobiano.

O CLSI (2018) indica a avaliação da resistência a ceftazidime (CAZ), uma cefalosporina de 3ª geração, e aztreonam (ATM), um monobactâmico, como teste de triagem para investigação de cepas ESBL. Com base neste critério, três (7,98%) cepas apresentaram fenótipo ESBL (Tabela 1, Tabela 2), destas, duas cepas (*Enterobacter* spp. e *Pluralibacter gergoviae*) também apresentaram fenótipo MDR, isoladas, respectivamente, do restaurante R12, a partir da salada de rúcula, tomate seco, queijo minas frescal e do restaurante R15, de salada de alface (Tabela 1). Mackenzie *et al.* (2002) e Ho *et al.* (2000) descrevem que a utilização ceftazidima já se mostra confiável para detectar a produção de ESBL

em *Klebsiella* spp.. No entanto, o CLSI (2018) recomenda que para confirmação do fenótipo ESBL deve ser realizado o teste de disco difusão com clavulanato, como inibidor de β -lactâmicos. Este teste será realizado futuramente com os isolados ESBL.

O isolamento de cepas ESBL em saladas de hortaliças cruas reforça a preocupação quanto o papel deste alimento como veículo de bactérias com perfil de resistência a cefalosporinas de terceira geração. Alguns autores (ZURFLUH et al., 2015; RANDALL et al., 2017) já discutiram a preocupação com alimentos como veículos de infecção e disseminação de resistência a antimicrobianos. O risco à saúde humana com o consumo de hortaliças deve continuar sendo estudado e discutido junto ao uso de agentes antimicrobianos e o seu descarte correto.

Nenhum isolado apresentou resistência a piperacilina/tazobactam (TZP), imipenem (IPM) e meropenem (MER) (Figura 8). Os carbapenêmicos (imipenem e meropenem) são antimicrobianos de escolha para o tratamento de infecções por cepas ESBL (SEKYERE; GOVINDEN; ESSACK, 2015). O isolamento de bactérias com fenótipo de resistência a carbapenem em frutos do mar e em gado bovino, já foi reportado na África, América, Ásia e alguns países da Europa (KÖCK et al., 2018).

Além dos β -lactâmicos, as *Enterobacteriaceae* também apresentaram resistência a outros antimicrobianos. Onze (28,95%) isolados apresentaram resistência a nitrofurantoína (NIT), quatro (10,53%) ao ácido nalidíxico (NAL), um (2,63%) a tetraciclina (TET) e um (2,63%) ao cloranfenicol (CLO) (Tabela 1, Figura 8). Nenhum isolado apresentou resistência aos aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina), a levofloxacina (LVX), ao trimetoprim (TRI), a minociclina (MIN) e a fosfomicina (FOS) (Figura 8).

Doze (32%) isolados manifestaram fenótipo de resistência a β -lactâmico combinado, amoxicilina/ ácido clavulânico (Figura 8). Zahra et al. (2019), observaram *Enterobacteriaceae* com perfil de resistência a ampicilina e amoxicilina/ácido clavulânico, assim como os fenótipos MDR e ESBL semelhante aos descritos neste estudo.

Vale a pena destacar o grande número de cepas resistentes a nitrofurantoína, 11 (29%) dos 38 isolados. Em 2010, devido ao aumento da taxa de incidência de bactérias produtoras de mecanismos de resistência aos

antimicrobianos já utilizados, os guias para tratamento de ITU foram modificados, adicionando nitrofurantoína como opção de escolha (HUTTNER *et al.* 2018).

A diversidade de bactérias resistente a antimicrobianos pode se dar pela transferência de genes entre *Enterobacteriaceae* de mesma espécie ou espécies diferentes, seja no alimento ou no intestino (HIRAMATSU; KURODA; ITO, 2001; ROSSI *et al.*, 2014).

O consumo de hortaliças cruas é um importante hábito para a manutenção da saúde e prevenção de doenças, como já discutido anteriormente. Entretanto, a falta de cuidado na produção primária e falhas de higiene na produção pode tornar as saladas de hortaliças cruas perigosas para o consumo, devido a possível presença de bactérias patogênicas e/ou bactérias com perfil de resistência a antimicrobianos. Assim, para a garantia da qualidade e segurança das saladas de hortaliças cruas prontas para o consumo, é importante a implementação de BPA e BPF, incluindo a aplicação do plano APPCC, além de fiscalização por órgãos responsáveis.

6. CONCLUSÃO

A verificação da pureza dos isolados bacterianos de uma coleção de cultura laboratorial é uma etapa crucial que deve anteceder as análises laboratoriais.

Enterobacter spp. e *Klebsiella pneumoniae* se destacam quanto a resistência a antimicrobianos em saladas de hortaliças cruas.

As saladas de hortaliças cruas prontas para o consumo são um importante veículo de *Enterobacteriaceae* resistentes a antimicrobianos, incluindo os fenótipos MDR e ESBL.

7. BIBLIOGRAFIA:

ACUÑA, L. G. Cefalosporinas. *Ars Medica Revista De Ciências Médicas*. v.16, p.42-45, 2017.

ACAR, J.F. Resistance mechanisms. *Semin Respir Infect*. v.17, p.184-8, 2002.

ADEOLU, M. *et al.* Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. v.16, p. 5575–5599, 2016.

AKBARI, M.; BAKHSHI, B.; PEERAYEH, S. N. Particular distribution of *Enterobacter cloacae* strains isolated from urinary tract infection within clonal complexes. *Iranian Biomedical Journal*, v. 20, p. 49–55, 2016.

AL-KHAROUSHI, Z. S. *et al.* Hiding in Fresh Fruits and Vegetables: Opportunistic Pathogens May Cross Geographical Barriers. *International Journal of Microbiology*, v. 2016, n. May 2008, 2016.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica /Agência Nacional de Vigilância Sanitária.*— Brasília: Anvisa, p.1-154, 2013.

ANVISA. Antimicrobianos base teórica e uso clínico. Resultado da pesquisa de Monobactâmico. Disponível em:
<http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo1/monobactans.htm>. Acesso em: 20/09/2020.

Bassetti, M., Merelli, M., Temperoni, C., e Astilean, A. New antibiotics for bad bugs: where are we? *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*. v.12, p.22, 2013.

BELTRÃO, Jhonathan Campos do Couto. Avaliação da Qualidade Microbiológica de Saladas de Hortaliças Cruas Prontas ao Consumo e Identificação do Perfil de Resistência a Antibióticos das Enterobactérias Isoladas. Niterói. f.106. Dissertação (Mestrado em Produtos para a saúde) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2019.

BEUCHAT, L. R. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection*. v.4, p. 413-423, 2002.

BHUTANI, Natasha *et al.* Occurrence of Multidrug Resistant Extended Spectrum Beta Lactamase-Producing Bacteria on Iceberg Lettuce Retailed for Human Consumption. *Biomed Research International*. v. 2015, p.1-10, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - CNNPA nº 12, de Julho de 1978. NORMAS TÉCNICAS ESPECIAIS, relativas a alimentos (e bebidas), para efeito em todo território brasileiro. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 Jul. 1978.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 216, de 14 de setembro de 2004. Dispõe sobre o Regulamento Técnico de Boas Práticas de Fabricação para os Serviços de Alimentação. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 set. 2004.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 39, p. 1211–1233, 1995.

CALLEJÓN, R. M. *et al.* Reported Foodborne Outbreaks Due to Fresh Produce in the United States and European Union: Trends and Causes. *Foodborne Pathogens and Disease*. v. 12, p.32-38, 2015.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Heat-related deaths after an extreme heat event — four states, 2012, and United States, 1999–2009. v. 62, p. 433-436, 2013.

CERNA-CORTES, J.F. *et al.* Microbiological Quality of Ready-to-Eat Vegetables Collected in Mexico City: Occurrence of Aerobic-Mesophilic Bacteria, Fecal Coliforms, and Potentially Pathogenic Nontuberculous Mycobacteria. *Biomed Research International*. v. 2015, p.1-9, 2015.

CHIAVARO, E. *et al.* Nutritional Quality of Sous Vide Cooked Carrots and Brussels Sprouts. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*. v. 60, p.6019-6025, 2012.

CROXATTO, A. PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *Fems Microbiology Reviews*, v. 36, p.380-407, 2012.

CONCEPTS, C.; PELEG, A. Y.; HOOPER, D. C. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. 2010. v.362, p.1804–1813, 2010.

DAVIN-REGLI, A.; LAVIGNE, J. *Enterobacter* spp .: Update on Taxonomy , Clinical Aspects , and. v. 32, p. 1–32, 2019.

DEVIDES, G. G. G.; MAFFEI, D. F.; CATANOZI, M. DA P. L. M. Perfil socioeconômico e profissional de manipuladores de alimentos e o impacto positivo de um curso de capacitação em Boas Práticas de Fabricação TT - Socioeconomic and professional profile of food handlers and the positive impact of a training course on. v.17, p.166-176, 2010.

Brazilian Journal of Food Technology, v. 17, n. 2, p. 166–176, 2014. FAO/WHO. Food and Agriculture Organization and World Health Organization, World Health Day 2015: From farm to plate, make food safe. Disponível em: <<https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2015/food-safety/en/>>.

Acesso em: 20/09/2020.

FORSYTHE, S.J. *Microbiology of Safe Food*. 2 ed. Oxford: Blackwell Publishing Ltda, 2010.

GAZIN, M. *et al.* Current trends in culture-based and molecular detection of extended-spectrum- β -lactamase-harboring and carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, p. 1140–1146, 2012.

GOLDENFELD, N.; WOESE, C. Biology's next revolution. *Nature*. v.445, p.369-369, 2007.

GREIG, J. et al. A scoping review of the role of wildlife in the transmission of bacterial pathogens and antimicrobial resistance to the food chain. *Zoonoses and Public Health*, v. 62, p. 269–284, 2015.

GUO, Y. *et al.* Frequency, Antimicrobial Resistance and Genetic Diversity of *Klebsiella pneumoniae* in Food Samples. *Plos One*. v. 11, p.1-13, 2016.

HANNING, I. B. *et al.* Food Safety and Food Security. *Nature Education Knowledge*. v.3, p.9. 2012.

HIRAMATSU, K.; KURODA, M.; ITO, T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiology*. v.9, p.486-93, 2001.

HO, P. L. *et al.* Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum β - lactamases and their prevalence among *Escherichia coli* and *Klebsiella* species in Hong Kong. *Apmis*. v.108, p. 237-240, 2000.

HOU, T. Y.; CHIANG-NI, C.; TENG, S. H. Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 27, p. 404–414, 2019.

HUTTNER, M. D. A. *et al.* Effect of 5-Day Nitrofurantoin vs Single-Dose Fosfomicin on Clinical Resolution of Uncomplicated Lower Urinary Tract Infection in Women a Randomized Clinical Trial. *JAMA*. v.319, p.1781-1789, 2018.

JAY, J. M.; TONDO, E. C. *Microbiologia de alimentos*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, p.711, 2005.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “the other bad *E coli*”. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. v.139, p.155-162, 2002.

JUNG, Y.; MATTHEWS, K. R. Potential transfer of extended spectrum β lactamase encoding gene, *blashv18* gene, between *Klebsiella pneumoniae* in raw foods. *Food Microbiology*. v. 60, p.39-48, 2016.

KÖCK R. *et al.* Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in wildlife, food-producing and companion animals – a systematic review, *Clinical Microbiology and Infection* (2018). *Clinical Microbiology and Infection*. v. 24, p.1241-1250, 2018.

LOPES, R.L.T. Dossiê Técnico: Os sete princípios do APPCC. Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais – CETEC, 2007. Disponível em <<http://www.respostatecnica.org.br>> Acesso em: 10/09/2020.

MACHADO, E.R. *et al.* Frequency of Enteroparasites and Bacteria in the Leafy Vegetables Sold in Brazilian Public Wholesale Markets *Journal of Food Protection*. v.81, p.542–548, 2018.

MACKENZIE, F. M.; MILLER, C. A.; GOULD, I. M. Comparison of screening methods for TEM- and SHV-derived extended-spectrum β -lactamase detection. v.8, p.715-724, 2002.

MAGIORAKOS, A. P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*. v. 18, p.268-281, 2012.

MANGONI, E. D. *et al.* Management of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. *Clinical Microbiology and Infection*. v.25, p.943-950, 2019.

MATTICK, K. *et al.* The microbiological quality of washing-up water and the environment in domestic and commercial kitchens. *Journal of Applied Microbiology*. v.1, p. 842-848, 2003.

MORADIGARAVAND, D. *et al.* Evolution and Epidemiology of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United Kingdom and Ireland. *American Society for Microbiology*. v.8, p.1-13, 2017

MURRAY, P. R. *et al.* *Microbiologia Médica*. 6 ed. Ed. Elsevier, 2009.

Names for life. Taxonomia das *Enterobacteriaceae*. Resultado da pesquisa de *Enterobacteriaceae*. Disponível em: <<https://www.namesforlife.com/10.1601/tx.3091>>. Acesso em:20/07/2020

NICOLI, M. *et al.* Influence of processing on the antioxidant properties of fruit and vegetables. *Trends Food Sci. Technol.* v.10, p.94–100, 1999.

PAGADALA, S. *et al.* Assessment of region, farming system, irrigation source and sampling time as food safety risk factors for tomatoes. *International Journal of Food Microbiology.* v. 196, p.98-108, 2015.

PASCUAL, A., *et al.* Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: the end of the antibiotic era? *Enferm. Infec. Microbiol. Clin.* v.32, p.1-3, 2014.

PELEG, A. Y. *et al.* Hospital-Acquired Infections Due to Gram Negative Bacteria. *N Engl J Med.* v.362, p.1804–1813, 2010.

RANDALL, L. P. *et al.* Evaluation of meat, fruit and vegetables from retail stores in five United Kingdom regions as sources of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)- 96 producing and carbapenem-resistant *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology.* v.241, p.283-290, 2017.

ROSSI, FRANCA. RIZZOTI, LUCIA. FELIS, GIOVANNA E. TORRIANI, SANDRA
Horizontal gene transfer among microorganisms in food: Current knowledge and future perspectives. *Food Microbiology.* v.42, p.232-243, 2014.

ROSA, C.I.L.F., *et al.* Hortaliças-fruto [online]. 1º Ed. Maringá: EDUEM, cap.15, p.489-526, 2018.

SULTANA, A. *et al.* Sanitation Practices Among Food Handlers Working in Street Restaurants in Rawalpindi, Pakistan. *Rawal Medical Journal.* v. 38, p. 425- 427, 2013.

SCHUBERT, S.; KOSTRZEWA, M. MALDI-TOF MS in the Microbiology Laboratory: Current Trends. *Curr. Issues Mol. Biol.* v. 23, p.17-20, 2017.

SCHWABER, M. J. *et al.* Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 52, p. 1028–1033, 2008.

SEKYERE, J. O.; GOVINDEN, U.; ESSACK, S. Y. Review of established and innovative detection methods for carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. *Journal of Applied Microbiology.* v.119, p. 1219-1233, 2015

SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. v.48, p. 91-99, 2012.

SILVA, N. *et al.* Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água. (1o ed). 2013.

SILVA JÚNIOR, E. A. Manual de Controle Higiênico-sanitário em Alimentos. 7. ed. São Paulo: Varela, 2014.

TABAN *et al.* Characterization of antibiotic resistance in *Salmonella enterica* isolates determined from ready-to-eat (RTE) salad vegetables. *Brazilian Journal of Microbiology*. v.44, p.385-391, 2013.

TANGO, C. N. *et al.* Microbiological Quality and Safety of Fresh Fruits and Vegetables at Retail Levels in Korea. *Journal of Food Science*. v.83, p. 386-392, 2018.

TCHAPTCHET, S.; HANSEN, J. The Yin and Yang of host-commensal mutualism. *Gut. Microbes*. v. 2, p. 347–352, 2011.

TOUATI, A. *et al.* First detection of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 in fresh vegetables from Béjaïa city, Algeria. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. p. 17-18, 2017.

TRESSELER, J. F. M. *et al.* Avaliação Da Qualidade Microbiológica De Hortaliças Minimamente Processadas. *Ciênc. agrotec.* v. 33, p. 1722 -1727, 2009.

VARGAS, C. A. Alzate. *et al.* Costos directos médicos de pacientes con infecciones de tractourinario por bacilos gram negativos resistentes a betalactámicos en un hospital de alta complejidad de Medellín, Colombia. *Rev. del int. nacional de salud*. v. 39, 2018.

VERRAES, C. *et al.* Antimicrobial resistance in the food chain: a review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. v.10, p.2643–2669, 2013.

WELLINGTON, E. M. H. *et al.* The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Lancet Infect. Dis.* v.13, p. 155–165, 2013.

WILLIAMS, J. D. β -Lactamases and β -lactamase inhibitors. *International Journal of Antimicrobial Agents.* v.1, p.3-7, 1999.

WINN, W.C., *et al.* Koneman, diagnóstico microbiológico : texto e atlas colorido. 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

WRIGHT, A. J. The penicillins. *MayoClin Proc.* v.74, n°3, p.290-307. Março,1999.

YOUNG, H. K.; NANDIVADA, L. S.; AMYES, S. G. B. Antibiotic resistance in the tropics 1. The genetics of bacterial ampicillin resistance in tropical areas. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,* v. 83, p. 38–41, 1989.

ZAHRA, S. A. K. *et al.* Antibiotic Resistance of Enterobacteriaceae Isolated from Fresh Fruits and Vegetables and Characterization of their AmpC β -Lactamases. *Journal of Food Protection.* v. 82, p. 1857–186, 2019.

ZEKAR, F. M. *et al.* From Farms to Markets: Gram-Negative Bacteria Resistant to Third-Generation Cephalosporins in Fruits and Vegetables in a Region of North Africa. *Frontiers In Microbiology.* v. 8, p.1569-1569, 2017.

ZHANG, D.; HAMAUZU, Y. Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. *Food Chem.* v.88, p.503–509, 2004.

ZHANG, Y. J. *et al.* (2015). Antioxidant Phytochemicals for the Prevention and Treatment of Chronic Diseases. *Molecules.* v.20, p. 21138–21156, 2015.

ZURFLUH, K. *et al.* First detection of *Klebsiella variicola* producing OXA-181 carbapenemase in fresh vegetable imported from Asia to Switzerland. *Antimicrobial Resistance and Infection Control.* v. 4, n. 1, p.38-39, 2015.