



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS – REGIONAL JATAÍ
UNIDADE ACADÊMICA ESPECIAL DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCiência ANIMAL

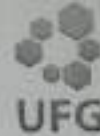


ANGÉLICA FRANCO DE OLIVEIRA

**ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE ESBL DO TIPO
CTX-M PRESENTES EM AMBIENTE HOSPITALAR
VETERINÁRIO**

Jataí – GO

2019



**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ Dissertação ☐ Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo do autor: Angélica Franco de Oliveira

Título do trabalho: Enterobactérias produtoras de ESBL do tipo CTX-M presentes em ambiente hospitalar veterinário

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☐ SIM ☒ NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:

Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 22 / 05 / 2019

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto a coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro

² A assinatura deve ser escaneada.

ANGÉLICA FRANCO DE OLIVEIRA

Dr. ARIEL EURIDES STELLA

**ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE ESBL DO TIPO CTX-M PRESENTES
EM AMBIENTE HOSPITALAR VETERINÁRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Biociência Animal da Universidade Federal de Goiás, Regional Jataí, como pré-requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Biociência Animal.

Jataí – Go

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Oliveira, Angélica Franco de
Enterobactérias produtoras de ESBL do tipo CTX-M presentes
em ambiente hospitalar veterinário [manuscrito] / Angélica Franco
de Oliveira. - 2019.
II, f.

Orientador: Prof. Dr. Dr Ariel Eurides Stella.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Unidade
Acadêmica Especial de Ciências Agrárias, Programa de Pós
Graduação em Biociência Animal, Jataí, 2019.
Bibliografia. Anexos.
Inclui gráfico, tabelas.

1. betalactamase. 2. resistência. 3. infecção hospitalar. 4.
enterobactérias. I. Stella, Dr Ariel Eurides, orient. II. Título.

CDU 579



Universidade Federal de Goiás
Regional Jataí
Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal

Ata de Defesa Pública de Dissertação de Mestrado

1. **Linha de Pesquisa:** Biotecnologia, Diagnóstico, Epidemiologia e Controle de Doenças nos Animais

Ano de Ingresso: 2017

Ao trigésimo dia do mês de abril de 2019, às 14:00 horas, no Auditório do prédio da Pós-graduação da Regional Jataí da Universidade Federal de Goiás, iniciaram-se os trabalhos referentes à Defesa Pública de Dissertação de Mestrado da candidata **ANGÉLICA FRANCO**

DE OLIVEIRA com o trabalho intitulado **"ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE ESBL DO TIPO CTX-M PRESENTES EM AMBIENTE HOSPITALAR VETERINÁRIO"**. A Banca Examinadora, constituída pelos membros: Prof. Dr. Ariel Eurides Stella (Presidente/Orientador), Profa. Dra. Cecília Nunes Moreira (Membro Interno) e Profa. Dra. Carla Afonso da Silva (Membro Externo), considerou a candidata, Angélica Franco de Oliveira: **APROVADA (X) REPROVADA ()**.

Foi concedido um prazo de 30 dias, para a candidata efetuar as correções sugeridas pela Banca Examinadora e entregar o trabalho em sua redação definitiva. E, para constar, foi lavrada a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca.

Prof. Dr. Ariel Eurides Stella
Orientador/Presidente

Profa. Dra. Cecília Nunes Moreira
Membro Interno
UFG – Regional Jataí/GO

Profa. Dra. Carla Afonso da Silva
Membro Externo
UFG – Goiânia/GO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram com minha caminhada até aqui. Mas em especial quero agradecer aos meus pais, Sirivone e Disnéia, que sempre me incentivaram a estudar e não mediram esforços para possibilitar esses estudos. E também ao meu irmão, Antônio Ricardo, que sempre esteve do meu lado colaborando com o que fosse possível.

Agradeço também ao meu orientador e também grande amigo que admiro como pessoa e como profissional, Dr Ariel Eurides Stella, pela dedicação comigo.

Agradeço também à equipe do Laboratório de Microbiologia Veterinária Paloma Fiorini Bannwart e Gisele Fonseca Ventura, que colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao colega de trabalho Jefferson Fernando Naves Pinto, técnico do laboratório de genética, por sua paciência e colaboração.

E também agradeço aos vizinhos de laboratório Darlan e Márcia que muitas vezes ao ver minha correria davam palavras de incentivo, ou faziam uma piada da situação, mas deixando a caminhada mais leve e trazendo mais alegrias aos dias de trabalho.

Agradeço também as colegas de mestrado Bruna R. Arrais e Milene Lopes, por várias vezes nos ajudamos e trocamos conhecimentos adquiridos ao longo dessa caminhada. A colaboração entre colegas ajuda tanto no desenvolvimento intelectual como humano, obrigada meninas por ter colaborado comigo nesta etapa.

E por fim, não por ser menos importante, mas por ser o mais importante, agradeço a Deus, que a tudo criou e nos capacita para seguirmos sempre progredindo e aprendendo. Obrigada Deus por ter colocado em minha caminhada essas pessoas maravilhosas citadas anteriormente e tantas outras. Obrigada Deus por ter me dado o discernimento para até aqui ter trilhado minha caminhada no caminho certo e assim pretendo continuar.

“Ninguém ignora tudo. Ninguém sabe tudo. Todos nós sabemos alguma coisa.
Todos nós ignoramos alguma coisa. Por isso aprendemos sempre.”

Paulo Freire

RESUMO

O processo de evolução bacteriana que leva à resistência aos antibióticos é natural, mas devido a grande pressão seletiva decorrente do uso indevido de antibióticos esse processo tem sido acelerado. O elevado número de bactérias multirresistentes que tem sido isoladas é um problema de saúde pública. As enterobactérias são bactérias geralmente comensais, entretanto podem causar infecções, e a característica de resistência mais importante entre elas é a produção de β -lactamases. Buscando caracterizar melhor os microrganismos circulantes e potencialmente causadores de infecções em ambiente hospitalar veterinário, este estudo objetivou identificar as enterobactérias produtoras de ESBL do tipo CTX-M presentes em hospital veterinário. Foi realizada coleta de suabes de arrasto de objetos que entram em contato com os pacientes e com os profissionais que ali trabalham, para a identificação das enterobactérias. Foram realizadas 10 coletas, obtendo-se 306 amostras, dessas, 118 enterobactérias foram identificadas como segue: *Escherichia coli* 56, *Enterobacter spp* 25, *Klebsiella spp* 19, *Proteus mirabilis* 13, *Serratia spp* 03, *Citrobacter spp* 02. Dentre as enterobactérias identificadas 17 produziram β -lactamase e 15 dessas foram do tipo CTX-M. É de grande importância conhecer a população bacteriana circulante no ambiente hospitalar veterinário, e a sua resistência aos antimicrobianos, para que os profissionais possam tomar medidas apropriadas para minimizar os riscos de Infecção.

Palavras chave β -lactamase, ESBL, infecção hospitalar, resistência

ABSTRACT

Due to the high selective pressure due to the misuse of antibiotics, it has accelerated the natural resistance process of the bacteria, leading to the appearance of more and more constant multiresistant strains. The high number of multiresistant bacteria that have been isolated is a public health problem because they can lead to loss of protection for diseases that are now treatable. Enterobacteria are usually commensal bacteria but can cause infections, and the most important resistance characteristic between them and the production of β -lactamases. In order to better characterize the circulating and potentially infectious microorganisms in veterinary hospitals, this study aimed to identify ESBL-producing enterobacteria of CTX-M type present in a veterinary hospital. Collection of swabs was carried out by objects that come in contact with the patients and with the professionals. A total of 10 samples were obtained, 306 samples of which 118 enterobacteria were identified as follows: *Escherichia coli* 56, *Enterobacter* spp 25, *Klebsiella* spp 19, *Proteus mirabilis* 13, *Serratia* spp 03, *Citrobacter* spp 2. Among the enterobacteria identified 17 produced β -lactamase and 15 of these are CTX-M type. It is great importance to know the bacterial population circulating in the veterinary hospital environment, and its antimicrobial resistance, so that professionals can take appropriate measures to minimize the risks of infection.

Keywords: β -lactamase, ESBL, hospital infection, multiresistance

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL -----	01
1.1	Referências -----	03
2.	CAPÍTULO: ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE ESBL DO TIPO CTX-M PRESENTES EM AMBIENTE HOSPITALAR VETERINÁRIO -----	04
2.1	Resumo -----	04
2.2	Introdução -----	05
2.3	Materiais e métodos -----	05
2.4	Resultados -----	06
2.5	Discussão -----	08
2.6	Conclusão -----	09
2.7	Referências -----	13
3.	Conclusão Geral -----	13
4.	Anexos -----	14

1. INTRODUÇÃO GERAL

Bactérias resistentes a vários antibióticos vêm sendo isoladas constantemente, tanto de amostras clínicas quanto ambientais. O aparecimento de resistência aos antibióticos em bactérias é um processo natural, mas esse vem sofrendo pressão seletiva devido ao uso indiscriminado de antibióticos na medicina humana, animal e na produção, causando uma demasiada aceleração do processo.

A multirresistência não é um fato isolado, ela vem ocorrendo mundialmente e para várias espécies, tanto comensais, oportunistas e patogênicas. E esse fato tornou-se um grande problema de saúde pública uma vez que a multirresistência bacteriana pode levar, ao aumento dos custos com tratamentos.

A resistência bacteriana pode ser intrínseca, devido a características estruturais e funcionais inerentes da célula, adaptada ou adquirida. As estratégias genéticas das células bacterianas para resistirem aos ataques dos antibióticos podem ser mutacionais (adaptadas) ou adquiridas pela transferência horizontal de genes, que pode ser pela transdução, conjugação e transformação (LOUREIRO et al. 2016).

Os mecanismos de resistência aos antibióticos incluem a diminuição da droga no interior da célula, que pode se dar pela mudança da permeabilidade da membrana celular ou pela bomba de efluxo; pela mudança do sítio alvo da molécula do antibiótico e pela produção de enzimas que hidrolisam ou mudam a molécula do antibiótico tornando - o inativo (BLAIR et al 2015).

As enterobactérias são bactérias comensais amplamente distribuídas na natureza sendo encontradas no intestino dos animais. Essa família de bactérias é de interesse médico, pois são oportunistas podendo causar vários tipos de infecções. O traço de resistência mais marcante entre os membros dessa família é a produção de enzimas que hidrolisam os antibióticos β -lactâmicos tornando-os inativos, são as chamadas β -lactâmases.

Os antibióticos β -lactâmicos, que incluem os penicilínicos, cefalosporinas, monobactam e cabarpenêmicos, são bactericidas e atuam inibindo a síntese da parede celular bacteriana. As β -lactâmases hidrolisam o anel β -lactâmico desse grupo de antibióticos tornando-os inativos. β -lactamases podem ser estritas, hidrolisando somente as primeiras gerações de cefalosporinas ou ter espectro

estendido, (ESBLs - Extended Spectrum Beta-Lactamases), sendo capazes de hidrolisar tanto os penicilínicos, quanto cefalosporinas de 1°, 2°, 3° e geralmente de 4° geração, poupando somente os cabarpenêmicos. Mas devido à pressão seletiva já existem bactérias capazes de produzir cabarpenemases (SANTOS et al. 2018).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) lista em seu ranking da resistência bacteriana (segundo a severidade das infecções e o número de antibióticos disponíveis), como prioridade crítica as Enterobactérias resistentes aos cabarpenêmicos e produtoras de ESBL. Enterobactérias produtoras de ESBLs são isoladas constantemente de amostras clínicas humanas, animais e de amostras ambientais. Essas bactérias podem ser transmitidas de animais para humanos ou vice e versa.

Devido à preocupação crescente com multirrestância bacteriana, esse trabalho tem por objetivo caracterizar as populações bacterianas pertencentes à família *Enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases circulantes em ambiente hospitalar veterinário.

1.1 REFERÊNCIAS

BLAIR, J. M. A.; WEBBER, M.A.; BAYLAY, J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature**, v.13, p. 42-51, 2015

LOUREIRO R. J.; ROQUE F.; RODRIGUES A. T.; HERDEIRO M. T.; RAMALHEIRA E. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução **Revista portuguesa saúde pública** V.34 n.1 p.77-84. 2016.

SANTOS, D. V. A.; OLIVEIRA, G. A.; PACHECO L. G.; FARIA L. M. O.; CUNHA J. C.; MELLO T. M. Antibióticos através da abordagem do mecanismo de resistência bacteriana. **Ciência atual**, Rio de Janeiro, V.11, n.01, 2018.

Enterobactérias produtoras de ESBL do tipo CTX-M presentes em ambiente hospitalar veterinário¹

Angélica Franco de Oliveira², Ariel Eurides Stella²

ABSTRACT: Oliveira A.F. & Stella A.E. 2019 [**Multiresistant enterobacteria present in a veterinary hospital environment**] Enterobactérias multirresistentes presentes em ambiente hospitalar veterinário. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Departamento de Pós Graduação em Biociência animal, Universidade Federal de Jataí, Campus Jatobá, Rodovia BR 364, Km 192, caixa postal 03, CEP 75801-615 Jataí – GO. E-mail: angelikinha.franco@gmail.com.

Due to the high selective pressure due to the misuse of antibiotics, it has accelerated the natural resistance process of the bacteria, leading to the appearance of more and more constant multiresistant strains. The high number of multiresistant bacteria that have been isolated is a public health problem because they can lead to loss of protection for diseases that are now treatable. Enterobacteria are usually commensal bacteria but can cause infections, and the most important resistance characteristic between them and the production of β -lactamases. In order to better characterize the circulating and potentially infectious microorganisms in veterinary hospitals, this study aimed to identify ESBL-producing enterobacteria of CTX-M type present in a veterinary hospital. Collection of swabs was carried out by objects that come in contact with the patients and with the professionals. A total of 10 samples were obtained, 306 samples of which 118 enterobacteria were identified as follows: *Escherichia coli* 56, *Enterobacter* spp 25, *Klebsiella* spp 19, *Proteus mirabilis* 13, *Serratia* spp 03, *Citrobacter* spp 2. Among the enterobacteria identified 17 produced β -lactamase and 15 of these are CTX-M type. It is great importance to know the bacterial population circulating in the veterinary hospital environment, and its antimicrobial resistance, so that professionals can take appropriate measures to minimize the risks of infection.

INDEX TERMS: β -Lactamase, enterobacterias, multiresistant, hospital infection

¹Recebido em -----

Aceito em -----

² Programa de pós graduação em Biociência animal , Universidade Federal de Goiás – Regional Jataí. BR 364 Setor industrial. CEP 75801-651 Jataí – Goiás *Autor para correspondência: angelikinha.franco@gmail.com

RESUMO: Devido à grande pressão seletiva decorrente do uso indevido de antibióticos, tem se acelerado o processo natural de resistência das bactérias, levando ao aparecimento cada vez mais constante de cepas multirresistentes. O elevado número de bactérias multirresistentes que tem sido isoladas é um problema de saúde pública. As enterobactérias são bactérias geralmente comensais, entretanto podem causar infecções, e a característica de resistência mais importante entre elas é a produção de β -lactamases. Buscando caracterizar melhor os microrganismos circulantes e potencialmente causadores de infecções em ambiente hospitalar veterinário, este estudo objetivou identificar as enterobactérias produtoras de ESBL do tipo CTX-M presentes em hospital veterinário. Foi realizada coleta de swabs de arrasto de objetos que entram em contato com os pacientes e com os profissionais que ali trabalham, para a identificação das enterobactérias. Foram realizadas 10 coletas, obtendo-se 306 amostras, dessas, 118 enterobactérias foram identificadas como segue: *Escherichia coli* 56, *Enterobacter* spp 25, *Klebsiella* spp 19, *Proteus mirabilis* 13, *Serratia* spp 03, *Citrobacter* spp 2. Dentre as enterobactérias identificadas 17 produziram β -lactamase e 15 dessas foram do tipo CTX-M. É de grande importância conhecer a população bacteriana circulante no ambiente hospitalar veterinário, e a sua resistência aos antimicrobianos, para que os profissionais possam tomar medidas apropriadas para minimizar os riscos de Infecção.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: β -Lactamase, enterobactérias, resistência, infecção hospitalar

Introdução

O número de bactérias multirresistente está aumentando de forma global tornando real a possibilidade de infecções não tratáveis (Blair et al. 2015). Esses microrganismos estão sendo identificados não somente em ambientes hospitalares como em comunitários (Munita & Arias 2015). O desenvolvimento de resistência aos antibióticos é um fenômeno natural que tem sido acelerado devido ao uso indevido desses fármacos levando bactérias anteriormente susceptíveis a esses medicamentos deixarem de responderem a eles (Loureiro et al. 2016). Os microrganismos podem ser intrinsecamente resistentes aos antibióticos ou adquirir essa resistência por mutação genética ou pela transferência horizontal de genes (Blair et al. 2015). A resistência aos antimicrobianos vem ocorrendo mundialmente, e para várias espécies de microrganismos, ameaçando a saúde humana e animal. As consequências diretas da infecção por microrganismos resistentes podem ser graves, incluindo doenças e internações mais prolongadas, aumento da mortalidade, perda de proteção para pacientes submetidos a operações, aumento dos procedimentos médicos e dos custos (World Health Organization, 2015).

Os mecanismos de resistência aos antibióticos são divididos em três categorias: diminuição da concentração intracelular do fármaco; modificação do sítio alvo do antibiótico e inativação por hidrólise ou modificação (Blair et al. 2015, Loureiro et al. 2016).

A família Enterobacteriaceae é constituída por bactérias Gram negativas, amplamente distribuídas na natureza sendo encontrada no solo, água, vegetais e no trato intestinal dos animais. Elas podem ser isoladas de qualquer amostra recebida em laboratório, pois podem causar praticamente qualquer tipo de infecção principalmente em pacientes imunocomprometidos (Winn et al. 2008). Entre os membros dessa família, a resistência adquirida às cefalosporinas de amplo espectro juntamente com os produtores de carbapenemases representam o traço de resistência mais importante. A resistência às cefalosporinas de amplo espectro (ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona) deve-se principalmente à produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs - Extended Spectrum Beta-Lactamases), que foram disseminadas mundialmente (Poirel et al. 2016). Elas são enzimas capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico de penicilinas e cefalosporinas de terceira e quarta geração, inativando-as (Rocha 2015a). A resistência às cefalosporinas é preocupante, pois esses fármacos são considerados de grande importância para a saúde humana e animal. Frequentemente as ESBLs são mediadas por plasmídeos, sendo assim esses genes podem ser transferidos mediante transferência horizontal (Johard et al. 2015).

As β -lactamase recebem duas classificações, a de Ambler, as classifica de acordo com a sua estrutura da cadeia peptídica (classes A, B, C e D) (Ambler 1980). Já a classificação funcional de Bush e Jacoby leva em consideração a preferência das enzimas pelo substrato e a inativação por inibidores de β -lactamases, nessa classificação as β -lactamases são agrupadas em grupo 1, 2 e 3 os quais também apresentam subgrupos (Bush & Jacoby 2010). As ESBL são inibidas pelos inibidores de β -lactamases: o ácido clavulâmico e o Tazobactam, estão inseridas na Classe A de Ambler e no grupo 2b de Bush (Poirel et al. 2012), e as três variantes principais são TEM, SHV e CTX-M (Rubin & Pitout 2014), sendo a última a predominante atualmente. A variante CTX-M, possui 05 classes de acordo com a estrutura proteica da enzima que são CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25 (Bonnet 2004, Livermore 2012).

Enterobactérias produtoras de β -lactamases já foram encontradas em animais de companhia e de produção, em amostras clínicas e em animais saudáveis (Johard et al. 2015). Essas bactérias podem ser transmitidas de animais para pessoas, tanto dentro do ambiente hospitalar veterinário quanto fora (Silva et al. 2015). Os antibióticos β -lactâmicos, principalmente as cefalosporinas, são os mais usados também para o tratamento de animais, portanto o aumento dessa resistência também representa um problema para a medicina veterinária (Wieler et al. 2015).

Sendo a resistência bacteriana de grande preocupação a Organização Mundial de Saúde (OMS) criou o Plano de Ação Global Contra a Resistência Bacteriana. O seu objetivo é assegurar, durante o maior tempo possível, a continuidade de tratamentos bem sucedidos e a prevenção de doenças infecciosas com medicamentos efetivos e seguros, utilizando - os de forma responsável e acessível a todos (World Health Organization 2015). Dentro desse cenário a Anvisa propõe o Plano Nacional de Prevenção e Controle de Resistência Microbiana em Serviços de Saúde, que tem como objetivo melhorar a conscientização e a compreensão a respeito da resistência bacteriana, nos serviços de saúde, por meio de comunicação, educação e formação efetiva, vigilância e investigação, medidas de prevenção e controle e o uso racional dos medicamentos antimicrobianos (Anvisa 2017a). Buscando caracterizar melhor os microrganismos circulantes e potencialmente causadores de infecção comunitária e hospitalar em hospitais veterinários, este estudo objetivou identificar as enterobactérias produtoras de ESBL do tipo CTX-M presentes no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Goiás Regional Jataí.

Materiais e Métodos

Coleta. Foram realizadas 10 coletas em intervalos não inferiores há 10 dias no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Goiás Regional Jataí entre os meses de janeiro a julho de 2018. Foram coletados: Suabes de arrasto em mesas de atendimento, mesas cirúrgicas, maçanetas das portas, gaiolas de internação, estetoscópios, termômetros, flocinheiras, transdutor do aparelho de ultrassom, calha (onde fica o animal para a realização do exame de ultrassom) e 50 mL de água das pias dos consultórios. Os suabes foram introduzidos em tubos de ensaio contendo caldo nutriente, os quais foram levados ao Laboratório de Microbiologia Veterinária da Universidade Federal de Goiás Regional Jataí, e incubados em estufa bacteriológica a 37° C por 24 horas. A água foi filtrada utilizando filtro com membrana milipore, após a filtração as membranas foram colocadas em placas de ágar MacConkey e incubada juntamente com os tubos de ensaio.

Identificação. Os tubos que apresentaram crescimento bacteriano tiveram uma alíquota, semeada por esgotamento em placas com ágar MacConkey, as quais foram incubadas à 37°C por 24 horas, após o crescimento foram utilizadas 05 colônias isoladas para a identificação posterior.

Os meios usados para a identificação bioquímica foram: TSI (Triple Sugar Iron), MIO (motilidade, indol e ornitina), MRVP (para o teste de Vermelho de Metila e Vorges -Proskauer), citrato, ureia, fenilalanina e lisina. As leituras dos testes bioquímicos foram realizadas dentro do período de 40 a 48 horas, respeitando a orientação do fabricante e de (Winn et al. 2008).

Estoque. As cepas isoladas e identificadas foram estocadas em microtubos contendo 750 μ L de cultura

pura líquida e 750 µl de glicerol a 40% e armazenadas em freezer a -30°C.

Teste de sensibilidade aos antimicrobianos. Foi realizado antibiograma dos isolados, pelo método de disco difusão em placa com ágar Mueller Hinton. Foram testados antibióticos das várias gerações de β-lactâmicos sendo eles: amoxicilina 30mcg + ácido clavulânico, piperacilina + tazobactam 110, ampicilina 10 mcg (penicilínico), cefalotina 10 mcg (cefalosporina de 1º geração), cefoxitina 30 mcg (cefalosporina de 2º geração), cefotaxima 30 mcg (cefalosporina de 3º geração), cefepime 30 mcg (cefalosporina de 4º geração) e ertapenem 10 mcg (carbapenêmico) (CLSI 2018).

Teste fenotípico para ESBL. Todos os isolados foram submetidos ao teste fenótipo confirmatório para a produção de ESBL pelo método de duplo disco difusão, também chamado de aproximação de disco. As cepas foram testadas com discos de antibióticos contendo cefalosporinas de 3º geração e um inibidor de β-lactamase. Os discos usados foram: ceftriaxona, aztreonam, ceftazidima, cefotaxima e amoxicilina + ácido clavulânico. O inibidor de β-lactamase, amoxicilina + ácido clavulânico, foi colocado no centro da placa de agar Mueller Hinton e os demais discos ao redor respeitando-se uma distância de 20mm do disco central. A produção de ESBL foi positiva quando ocorreu a deformação do halo de inibição da β - lactamase ou o aparecimento de uma zona irregular de inibição chamada zona fantasma.

Extração de DNA. Foi realizada a extração do DNA dos isolados por meio de lise-térmica, onde 02 ml de cultura pura de cada isolado foram centrifugados a 5000 rpm por 04 minutos, desprezado o sobrenadante, lavados com 1 ml de água destilada autoclavada. O processo de lavagem foi realizado por três vezes. Após a lavagem, as células foram submetidas a temperatura de 100°C por 10 minutos, centrifugadas a 5000 rpm por 30 segundos e coletado 500 µl do sobrenadante e armazenados em freezer a -30°C.

PCR convencional. Também foi realizada PCR convencional para os isolados positivos no teste fenotípico de ESBL buscando a detecção dos cinco grupos de CTX- M, sendo os pares de primers utilizados os seguintes: grupo1, 5' AAA AAT CAC TGC GCC AGT TC e 5' AGC TTA TTC ATC GCC ACG TT (415pb); grupo 2, 5'CGA CGC TAC CCC TGC TAT T e 5' CCA GCG TCA GAT TTT TCA GG (552 pb) ; grupo 9, 5' CAA AGA GAG TGC AAC GGA TG e 5' ATT GGA AAG CGT TCA TCA CC (205 pb); grupo 08 TCG CGT TAA GCG GAT GAT GC e 5' AAC CCA CGA TGT GGG TAG C (666 pb), e grupo 25, 5' GCA CGA TGA CAT TCG GG e 5' AAC CCA CGA TGT GGG TAG C (327 pb) (Woodford et al. 2005)

As reações para PCR foram montadas com um volume final de 25 µl sendo esses 12,5 µl de Promega Mix (Promega Corporation, USA); 0,5 µl de cada primer; 5 µl de água ultrapura e 2,5 µl de DNA. As condições para a amplificação foram de acordo com metodologia de Woodford (2005), desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de 94°C durante 25 segundos, 52 ° C durante 40 segundos e 72° C durante 50 segundos e alongamento final a 72°C durante 6 minutos. Para a eletroforese foi utilizado gel de agarose a 3% a 65V por 3 horas.

Resultados

Das 306 amostras coletadas foram obtidos 600 isolados dos quais 118 foram identificados como Enterobactéria, que representa uma porcentagem de 19,6%. Sendo essas enterobactérias coletadas dos seguintes objetos: termômetro (44), mesa (34), gaiola (14), água (10), maçaneta (10), calha (03) e foinheira (03). Dos estetoscópios e transdutor do aparelho de ultrassom não foram isolados enterobactérias.

Das 118 enterobactérias isoladas as espécies identificadas, foram as seguintes: *Escherichia coli* 56, *Enterobacter spp* 25, *Klebsiella spp* 19, *Proteus mirabilis* 13, *Serratia spp* 03 e *Citrobacter spp* 02. A distribuição das espécies e os locais de coleta estão descritas no quadro 01.

Quadro 01. Enterobactérias identificadas e seus respectivos locais de coleta e a porcentagem correspondente das espécies.

	Ág	Ca	Fo	Ga	Ma	Me	Ter	Total (%)
<i>Citrobacter spp</i>	02	—	—	—	—	—	—	02 (1,69)
<i>Enterobacter spp</i>	04		03	04	03	11	—	25 (21,19)
<i>Escherichia coli</i>	—	02	—	10	03	13	28	56 (47,46)
<i>Klebsiella spp</i>	07	01	—	—	04	07	—	19 (16,1)
<i>Proteus mirabilis</i>	—	—	—	—	—	—	13	13 (11,02)
<i>Serratia spp</i>	—	—	—	—	—	—	03	03 (2,54)
Total (%)	13 (11)	03 (2,5)	03 (2,54)	14 (11,8)	10 (8,47)	31 (26,2)	44 (37,28)	118

Legenda: Ág: água, Ca: calha, Fo: focinheira, Ga: gaiola, Ma: maçaneta, Me: mesa, Ter: termômetro.

No teste de sensibilidade aos antibióticos foram apresentados 07 fenótipos sendo eles, nenhuma resistência aos β - lactâmicos testados (43), resistência a um dos grupos de β - lactâmicos testados (29), resistência a dois dos grupos (12), resistência a três dos grupos (4), resistência a quatro dos grupos (23), resistência a cinco dos grupos (1) e resistência a seis dos grupos de β - lactâmicos testados (6). O maior índice de resistência foi para o antibiótico cefalotina (53,4%), seguida pela ampicilina (44,9%), amoxicilina+ácido clavulânico (20,9%) cefoxitina (19,4%), cefepime (16,1%) e cefotaxima (14,4%). Os isolados não apresentaram resistência ao ertapenem e à associação da piperacilina com tazobactam. A figura 01 demonstra a quantidade de isolados resistentes, intermediários e sensíveis aos antibióticos testados.

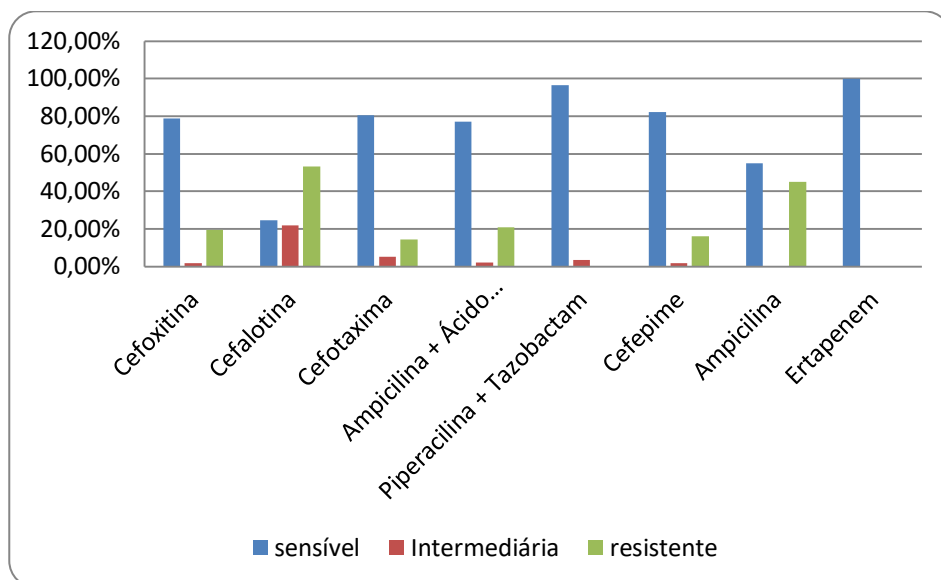


Figura01. Percentual de isolados resistentes, intermediários e sensíveis aos antibióticos testados.

No teste de aproximação de disco para determinação de ESBL das 118 enterobactérias 17 foram positivas (14,4%). Destas, 06 *Enterobacter spp*, 06 *Escherichia coli* e 05 *Klebsiella spp*. Das 17 ESBLs positivas 10 (58,8%) foram oriundas da área de internação, 04 (23,5%) foram da área de isolamento, 02 (11,7%) da sala de ultrassom e uma do consultório 02. O quadro 02 traz as espécies identificadas como ESBL e seus respectivos locais de coleta

Entre os 17 isolados positivos no teste fenotípico para ESBL, 15 (88,23%) foram positivos para o gene CTX-M sendo: 12 isolados carregando genes do grupo 01 (05 *Enterobacter sp* 04 *Escherichia coli*, e 03 *Klebsiella sp*) e 03 do grupo 09 (02 *Escherichia coli* e 01 *Klebsiella sp*). O grupo CTX-M predominante em nosso estudo foi o grupo 01 correspondendo a 80% das CTX-M encontradas. O quadro 02 demonstra as quais grupo CTX-M cada isolado ESBL⁺ pertence.

Quadro 02. Espécies identificadas como ESBL⁺, seus respectivos locais de coleta e o grupo CTX-M a qual pertencem.

Isolado	Local	Objeto	Espécie	CTM-X
01	Área de internação	Gaiola	<i>Enterobacter sp</i>	Grupo 01
02	Área de internação	Gaiola	<i>Enterobacter sp</i>	Grupo 01
03	Área de internação	Gaiola	<i>Enterobacter sp</i>	Grupo 01
04	Área de isolamento	Gaiola	<i>Escherichia coli</i>	Grupo 01
05	Área de isolamento	Gaiola	<i>Escherichia coli</i>	Grupo 01
06	Área de isolamento	Gaiola	<i>Escherichia coli</i>	Grupo 01
07	Área de isolamento	Mesa	<i>Escherichia coli</i>	Grupo 01
08	Sala de ultrassom	Calha	<i>Escherichia coli</i>	Grupo 09
09	Sala de ultrassom	Calha	<i>Escherichia coli</i>	Grupo 09

10	Área de internação	Mesa	<i>Enterobacter sp</i>	Grupo 01
11	Área de internação	Mesa	<i>Enterobacter sp</i>	Negativo
12	Área de internação	Mesa	<i>Enterobacter sp</i>	Grupo 01
13	Consultório 02	Mesa	<i>Klebsiella sp</i>	Negativo
14	Área de internação	Água	<i>Klebsiella sp</i>	Grupo 01
15	Área de internação	Água	<i>Klebsiella sp</i>	Grupo 01
16	Área de internação	Água	<i>Klebsiella sp</i>	Grupo 09
17	Área de internação	Água	<i>Klebsiella sp</i>	Grupo 01

Discussão

Entre os objetos utilizados para a coleta dos isolados os mais contaminados foram os termômetros, 37,3% das enterobactérias identificadas são oriundas deles, em seguida as mesas de atendimento com 28,8%. Equipamentos e fômites podem servir como reservatório de agentes infecciosos (Milton et al. 2014), termômetros descontaminados inadequadamente podem servir como veículo de agentes patogênicos, podendo vir causar infecções hospitalares (Van den Berg et al. 2000, Kanamori et al. 2017). A transmissão de microrganismos por meio de superfícies contaminadas pode ocorrer de forma direta ou indireta, nesse último caso por meio das mãos dos profissionais da saúde, pela água e alimentos (López-Cerero 2014, Kanamori et al. 2017).

As enterobactérias identificadas no ambiente hospitalar veterinário em várias superfícies e fômites, como em mesas de atendimento e termômetros, são as mesmas de importância médica humana já relatadas como agente etiológico de infecções hospitalares (Anvisa 2017b). São também de importância veterinária, como causadoras de infecções urinárias (Carvalho et al. 2014, Wong et al. 2015, Moyaert et al. 2016) e de corrente sanguínea (Stull & Weese 2015). É fundamental a adequada realização da descontaminação dessas superfícies e fômites antes e após o atendimento, buscando evitar que ocorra a transmissão de microrganismos para os pacientes.

Dos isolados, 43 (36,44%) não apresentaram resistência a nenhum dos antibióticos testados, já 34 (28,8%) foram resistentes a três ou mais categorias dos β -lactâmicos testados sendo classificados como multirresistentes (Magiorakos et al. 2012). Os β -lactâmicos são os antibióticos mais usados e a sua utilização de forma incorreta acelerou a evolução natural das bactérias (Ibrahim & Hameed 2015, Sserwadda et al. 2018). Cefalotina e ampicilina, respectivamente cefalosporina de 1º geração e penicilínico, foram os antibióticos menos eficazes. Já a associação da piperacilina com tazobactam foi mais eficiente que a amoxicilina com ácido clavulânico, ambas são uma associação de um β -lactâmico com um inibidor de β -lactamase, isso se dá pelo fato do tazobactam ter uma atividade inibitória maior sobre as β - lactamases que o ácido clavulânico (Paterson & Bonono 2005, Bush & Jacoby 2010).

As enterobactérias podem carrear genes de resistência aos antibióticos o que pode tornar ineficaz a terapia empregada em casos de infecções, prolongar o tempo de internação do paciente e em alguns casos até mesmo levá-lo a óbito. Entre os isolados identificados, 17 foram positivos para a produção de beta-lactamases no teste fenotípico para ESBL. Destes, 5 eram *Klebsiella spp*, o que corresponde a 26,3% do total das *Klebsiella spp* identificadas no estudo. A segunda maior frequência de cepas produtoras de ESBL foram encontradas entre os *Enterobacter spp* (24%). Assim como o estudo de Guzman – Blanco et al (2014), foi encontrado o gênero *Klebsiella* como sendo o que mais produziu ESBL, mas por outro lado encontramos o gênero *Enterobacter* como o segundo produtor de ESBL, diferentemente do estudo citado onde foi encontrada *Escherichia coli* como a segunda maior produtora.

A maioria das cepas produtoras de β -lactamases foram isoladas da área de internação (58,8%), seguida pela área de isolamento (23,5%). O ambiente hospitalar sugere adaptações às células (Walther 2016), pois é um grande nicho ecológico para bactérias resistentes devido ao grande uso de antibióticos neste local (Oliveira et al. 2017). A internação é o local de maior fluxo e permanência de animais, já a área de isolamento é o local onde ficam os animais mais debilitados, esses dois locais, são onde mais circulam microrganismos e estes estão sujeitos aos mecanismos horizontais de transferência de genes.

As β -lactamases de amplo espectro hidrolisam penicilinas e cefalosporinas de 1º, 2º, 3º geração e geralmente as de 4º geração, poupando os carbapenêmicos (Bush & Jacoby 2010), os isolados identificados como ESBL apresentaram esse fenótipo com excessão das cefalosporinas de 2º geração, 11 isolados foram sensíveis a ela. Cefoxitina, a cefalosporina de 2º geração testada, pertence ao grupo das Cefamicinas, que geralmente são estáveis a uma variedade de β - lactamases (Shaikh et al. 2014, Rubin & Pitout 2014, Nordemann & Poirel 2017, Woerther et al. 2018). Alves et. al (2016) encontrou cepas ESBL com padrão de resistência semelhante aos

encontrados por nós. Já Bogaerts et al. 2015 encontrou 20% de cepas resistente para cefalosporina de 4^o geração, cefepime. Evidenciando que o fenomeno de resistência pode-se distribuir diferentemente entre as populações bacterianas estudadas.

O CTX- M compreende o maior grupo de β lactamases e atualmente é o mais relatado mundialmente (Dropa et al. 2016, Bevan et al. 2017). Pouco se sabe sobre a disseminação de cepas produtoras dessas enzimas no Brasil (Rocha et al. 2015b). Das 17 ESBL identificadas 15 possuíam o gene *CTX-M* e as classes indetificadas foram a 01 e 09, sendo a primeira a predominante. Uma avaliação sobre a distribuição dos grupos de CTX-M entre microorganismos causadores de infecções hospitalares e comunitárias humanas em diferentes regiões do país, relatam que a classe CTX- M-1 e CTX-M-2 foram prodominantes (Rocha et al. 2015b). Este trabalho também encontrou o grupo CTX-M1 (80%) como predominante entre as cepas que carregavam o gene *CTX-M*, o que vem confirmar a importância desse perfil também em hospitais veterinários.

Pesquisadores em Zurique – Suíça identificaram enterobactérias de amostras clínicas de cães e gatos doentes, 20,8% delas eram produtoras de ESBL e todas albergavam o gene *CTX-M* e a classe CTX-M 1 foi a mais encontrada (Zogg et al. 2018). A variante CTX-M também apareceu na maioria dos produtores de β -lactamase e a classe 01 foi dominante em isolados de animais de companhia na Europa (Bogaerts et al. 2015). Também encontramos a variante CTX-M na maioria dos isolados identificados como ESBL e a classe 01 foi a principal confirmando que essa classe tem grande ocorrência também no ambiente veterinário.

Somente dois isolados positivos no teste fenotípico para produção de ESBL não foram encontrados genes para a CTX-M, podendo esses isolados serem pertencentes a Variante TEM ou SHV. Nas últimas décadas o perfil de cepas produtoras de ESBL mudou, sendo que os perfis TEM e SHV estão sendo menos relatados que o perfil CTX-M, sendo essa também o tipo de ESBL mais isolada em animais de companhia, e a classe CTX-M-1 a mais prevalente (Wieler et al. 2015). O nosso trabalho demonstrou que as cepas CTX-M positivas circulam também nos ambientes veterinários, pois ela foi identificada em 88,23% dos produtores de ESBL isolados por nós, sendo a classe CTX-M1 a mais prevalente.

Conclusão

A resistência bacteriana é um grande problema de saúde pública tanto em ambiente hospitalar humano tanto em veterinário. Cepas produtoras de β -lactamases de espectro estendido foram identificadas no ambiente hospitalar veterinário, a maioria delas do tipo CTX-M e o classe predominante foi CTX-M 1. Evidenciando que boas práticas de desinfecção devem ser instituídas a fim de minimizar a possibilidade de infecções por esses microorganismos, buscando sempre o uso corretos de antibióticos e a adequada descontaminação de superfícies e fômites.

Referências Bibliográficas.

- Alves P.O., Moura R.A., Rodrigues G.V., Lopes K. F.C., Zaniolo M.M., Rubio K. A. J. Dias E.H., Oliveira L.A., Chiderol R.T. & Did D.G. 2016 Detection of extended spectrum beta-lactamases and resistance in members of the Enterobacteriaceae family isolated from healthy sheep and dogs in Umuarama, Paraná, Brazil. Semina: Ciências Agrárias, v. 37, n. 2, p. 829-840.
- Ambler R. P. 1980. The structure of β -lactamase. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 289: 321-331.
- Anvisa. 2017a. Plano nacional para a prevenção e o controle da resistência microbiana nos serviços de saúde.
- Anvisa. 2017b. Boletim de segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde nº16: Avaliaçãodos indicadores nacionais das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) e resistência microbiana do anos de 2016 (revisado).
- Bevan R.E., Jones A.M. & Hawkey P.M. 2017. Global epidemiology of CTX-M β lacamases: temporal and geographical shifts in genotype. J Antimicrob Chemother 2017; 72: 2145–2155.
- Blair J.M.A., Webber M.A., Baylay J., Ogbolu D.O. & Piddock L.J.V. 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nature. 13:42-51.
- Bogaerts P., Huang Te – Din, Bouchahrouf W., Bauraing C., Berhin C., El Garcia F., Glupczynski Y & Comparth Study Group. 2015. Characterization of ESBL- and AmpC-Producing *Enterobacteriaceae* from diseased companion animals in Europe. Microbial drug resistance. V.00 N.00.
- Bonnet R. 2004. Growing group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. p. 1–14.
- Bush K. & Jacoby G. A. 2010. Update functional classification of β -lactamases. Antimicrobial agents and chemotherapy. P. 969-976.
- Carvalho M.V., Spinola T., Tavorali F., Irino K., Oliveira R.M. & Ramos M.C.C. 2014. Infecções do trato urinário (ITU) de cães e gatos: Etiologia e resistência aos antimicrobianos. Pesq. Vet. Bras. 34(1):62-70.
- CLSI 2018. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing M100 Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, 28th ed.
- Dropa M., Lincopan N., Balsalobre L.C., Oliveira D. E., Moura R.A., Fernandes M.R., Silva Q.S., Matté G.R., Sato M.I.Z. & Matté M.H. 2016. Genetic background of sequence types of CTX-M-8 and a CTX-M-15- producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from public wastewater treatment plants in São Paulo, Brazil. Environ Sci Pollut Res.

- Guzmán-Blanco M., Labarca J.A., Vellegas M.V., Gutozzo E. & On behalf of the Latin America Working Group on Bacterial Resistance. 2014. Extended spectrum β -lactamase producers among nosocomial *Enterobacteriaceae* in Latin America. *Braz j. infect. Dis.* 18(4): 421-433.
- Ibrahim I.A.J. & Hameed T.A.K. 2015. Isolation, characterization and antimicrobial resistance patterns of lactose-fermenter enterobacteriaceae isolates from clinical and environmental samples. *Open Journal of Medical Microbiology*, 5
- Johard S., Borjesson S., Thowald-Wigh G., Fernstrom L., Nicol C. & Bergstrom A. 2015. extended spectrum Beta-Lactamase/AmpC-producing *E.coli* in dogs treated with antimicrobial in surgical wards. *Imtern. J. Appl. Res. Vet. Med.* 13 n. 01: 80-88
- Kanamori H., Rutala W.A. & Weber D.J. 2017. The role of patient care items as a fomite in healthcare-associated outbreaks and infection prevention. *Clinical Infectious Diseases.* 65 (8)
- Livermore D.M. 2012. Current Epidemiology and Growing Resistance of Gram-Negative Pathogens. *korean j intern med* (27):128-142.
- López-Cerero L. 2014. Papel del ambiente hospitalario y los equipamientos en la transmisión de las infecciones nosocomiales. *Enferm InfeccMicrobiolClin.* 32(7):459-464.
- Loureiro R.J., Roque F., Rodrigues A.T., Herdeiro M.T. & Ramalheira E. 2016. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. *Rev port saúde pública* 34 (1 77-84)
- Magiorakos A.P., Srinivasan A., Carey R.B., Carmeli Y., Falagas M.E., Giske C.G., Harbarth S., Hindler J.F., Kahlmeter G., Olsson-Liljequist B., Paterson D.L., Rice L.B., Stelling J., Struelens M.J., Vatopoulos A. Weber J.T. & Monnet D.L. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*; 18: 268-281.
- Milton A. A.P., Priya G.B., Aravind M., Parthasarathyl S., SAmínathan M., Jeevan K. & Agarwal R.K. 2014. Nosocomial Infections and their Surveillance in Veterinary. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 3(2s): 1-24.
- Moyaert H., Morrissey I., Jong A., Garch El Farid, Klein U., Ludwig C., Thiry J. & Youala U. 2016. Antimicrobial susceptibility monitoring of bacterial pathogens isolated from urinary tract infections in dogs and cats across europe: compath results. *Microbial drug resistance*, V. 00.N.00.
- Munita J.M. & Arias C.A., 2016. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol Spectr.*; 4(2).
- Oliveira D.V., Nunes L.S., Barth A.L. & Van Der Sandi S.T. 2017. Genetic background of β -lactamses in *Enterobacteriaceae* isolates from environmental samples. *Microb Ecol* 74:599-607.
- Nordmann P. & Poirel L. 2017. Rapid diagnostic tests for detecting emerging antibiotic resistance are mostly available and should be used now. *Infectious Diseases Hub*. <https://www.id-hub.com/2017/02/13/11199/>, 2017.
- Paterson D.L. & Bonono R.A. 2005. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clinical microbiology reviews*. Vol. 18 N. 04 p 657- 686.
- Poirel L., Bonnin A.R. & Nordmann P. 2012. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum b-lactamases in Gram-negative rods. *Infection, Genetics and Evolution* (12): 883-893.
- Poirel L., Bonnin R.A. & Nordemann P. 2012. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum b-lactamases in Gram-negative rods. *Infection, Genetics and Evolution* 12 883-893
- Poirel L., Fernandez J. & Nordemann P. 2016. Comparison of three biochemical test for rapid detection of Extenderd-Spectrum-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.* 54:423-427
- Rocha, F.R. 2015a. Análise molecular da prevalência dos genes Beta-lactamases blaCTX-M, blaSHV e blaTEM em *Klebsiella pneumoniae* isoladas de pacientes com diagnóstico de infecção hospitalar na Santa Casa de Misericórdia de Sobral, Ceará. Dissertação de mestrado, Universidade do Ceará, Sobral. 63p.
- Rocha F.R., Pinto V.P.T. & Barbosa F.C.B., 2015b The spread of CTX-M-type Extended-Spectrum β -Lactamases in Brazil: A systematic review. *Microbial drug restance* V.(00), Number 00.
- Rubin J.E. & Pitout J.D.D. 2014 Extended-spectrum b-lactamase, carbapenemase and AmpC producing *Enterobacteriaceae* in companion animals. *Veterinary Microbiology*, 170 p.10-18.
- Shaikh S., Fatima J., Shakil S., Mohd S., Rizvi D & Kamal M.A. 2014. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences.* (22), 90-101.
- Sserwadda I., Lukenge M., Mwambi B., Mboowa G., Walusimbi A. & Segujja F. 2018. Microbial contaminants isolated from items and work surfaces in the post- operative ward at Kawolo general hospital, Uganda *BMC Infectious Diseases* (2018) 18:68
- Stull J. W. & Weese J.S. 2015. Hospital-associated infections in small animal practice. *Vet Clin Small Anim.*
- Walther B., Tedin K. & Lubker-Becker A. 2016. Multidrug-resistant opportunistc pathogens challenging veterinary infection control. *Vet.microbiol.* 200: 71-78.
- Wieler L.H., Ewers C., Guenther S., Walther B. & Lubke-Becker A. 2011. Methicillin-resistant staphylococci (MRS) and extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in companion animals: Nosocomial infections as one reason for the rising prevalence of these potential zoonotic pathogens in clinical samples. *International Journal of Medical Microbiology* 301: 635- 641.
- Wieler L.H., Walther B., Vincze S., Guenther S. & Lubke-Becker A. 2015. Infections with multidrug-resistant bacteria—has the post-antibiotic era arrived in companion animals? *Zoonoses-Infections Affecting Humans and Animal*. P 433 - 452.

- Winn Jr W.C., Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C., Procop W. G. & Woods G.L. 2008. .Konemam, diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido. 5 ed. Rio de Janeiro, MEDSI 209 – 245 p
- Woerther P.L., Lepeule R. Decousser J.W., Ruppé E. & Barbier F. 2018 Carbapenems and alternative β -lactams for the treatment of infections due to extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: What impact on intestinal colonisation resistance? International Journal of Antimicrobial Agents (52) 762–770.
- World Health Organization. 2015. Global action plan on antimicrobial resistance. Geneva- Switzerland. 28p.
- Wong C., Epstein S.E. & Westropp J.L. 2015. Antimicrobial susceptibility patterns in urinary tract infections in dogs (2010–2013). J Vet Intern Med . 29:1045–1052
- Woodford N. Fagan E.J. & Ellington M.J. 2005. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. Journal of Antimicrobial Chemotherapy.
- Zogg A.L., Simmen S., Zurfluh K. Stephan R., Schmitt S.N. & Nuesch-Inderbinen M.2018. High prevalence of Extended-Spectrum β -Lactamase producing Enterobacteriaceae among clinical isolates from cats and dogs admitted to a veterinary hospital in Switzerland. Front. Vet.Sci.5,art.62.
- Van den Berg A.W.A., Claahsen H.L., Niessen M., Muytjens H.L., Liem K. & Voss A. 2000 *Enterobacter cloacae* outbreak in the NICU related to disinfected thermometers. Journal of Hospital Infection 45:29–34

3. CONCLUSÃO GERAL

Enterobactérias geralmente envolvidas em infecções importantes nos animais foram encontradas circulando no ambiente hospitalar veterinário, portanto métodos mais eficazes de higienização e desinfecção devem ser adotados. Também foi encontrado no ambiente estudado bactérias resistentes as cefalosporinas de amplo espectro. É de fundamental importância ter conhecimento sobre a população bacteriana circulante neste meio, conhecendo as espécies predominantes e sua resistência, pois através dessas informações poderemos estabelecer estratégias para o controle e a prevenção da disseminação desses microrganismos.

. 4. ANEXO

Normas de publicação da revista Pesquisa Veterinária Brasileira

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

A submissão de artigos à revista “Pesquisa Veterinária Brasileira” (PVB) deve ser feita em Word, através do Sistema ScholarOne, *link* <<https://mc04.manuscriptcentral.com/pvb-scielo>>

A tramitação somente pode ter início se o seu artigo estiver rigorosamente dentro das normas de apresentação da revista, de acordo com as Instruções aos Autores, o modelo no site da revista e os últimos fascículos publicados (www.pvb.com.br). Na verificação de falhas de apresentação, o artigo será devolvido aos autores para as devidas correções.

Os autores podem submeter seus artigos em **Inglês** ou em **Português**, mas sempre com um Resumo em português. No caso de artigos aceitos escritos em **Português**, estes serão traduzidos para o **Inglês** pela Editora Cubo; pois todos os artigos publicados na PVB serão em inglês. Para os artigos já submetidos em **Inglês**, os autores devem apresentar via ScholarOne um Certificado de Tradução de uma empresa habilitada ou de um Tradutor Nativo. **Essa regra vale para artigos submetidos a partir de 1 de janeiro de 2018.**

1. Os artigos devem ser organizados em **TÍTULO, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES** (de preferência os últimos três separadamente), **Agradecimentos, Declaração de conflito de interesse e REFERÊNCIAS:**

a) O **TÍTULO** deve ser conciso e indicar o conteúdo do artigo; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) **O(s) Autor(es) com numerosos primeiros nomes e sobrenomes, deve(m) padronizar o seu “nome para publicações científicas”,** como por exemplo: Cláudio Severo Lombardo de Barros, escreve Cláudio S.L. Barros ou Barros C.S.L.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F. **Os artigos devem ter no máximo 8 (oito) autores.** O autor para correspondência deve ser um autor que garanta o contato com o Conselho Editorial da PVB. Asteriscos de chamadas para o rodapé não devem ser sobrescritos.

- c) O **Cabeçalho do ABSTRACT** deve conter além dos nomes dos autores abreviados invertido, o ano, o TÍTULO, o endereço postal do laboratório (inclusive o CEP) ou instituição principal onde foi desenvolvida a pesquisa. Endereços postais brasileiros não devem ser traduzidos para o inglês, mesmo em artigos escritos na língua inglesa, a fim de evitar dificuldade na postagem. Deve-se conferir os nomes dos autores do artigo e do Cabeçalho do Abstract para evitar discrepâncias.
- d) O **Rodapé da primeira página** deve conter os endereços profissionais postais completos dos autores (evitando-se traços horizontais), na língua do país do respectivo autor (em português, espanhol, inglês) e seus e-mails; o e-mail do autor para correspondência deve ser sublinhado. Os sinais de chamada para os nomes dos autores devem ser números arábicos, colocados em sobrescrito, sem o uso automático de “Inserir nota de fim”, do Word (essas chamadas devem ser contínuas por todo artigo, isto é, em todas as notas de rodapé das outras páginas).
- e) O **ABSTRACT** deve ser uma versão do RESUMO, mas pode ser mais explicativo, seguido de “INDEX TERMS” que devem incluir termos do título, por não se tratar somente de “ADDITIONAL INDEX TERMS”.
- f) O **RESUMO** deve conter o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões, seguido dos “TERMOS DE INDEXAÇÃO” que incluem termos do título, por não se tratar somente de “TERMOS DE INDEXAÇÃO ADICIONAIS”.
- g) A **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal e deve finalizar com a indicação do objetivo do artigo.
- h) **MATERIAL E MÉTODOS** deve reunir a totalidade dos dados que permitam o desenvolvimento de trabalho semelhante por outros pesquisadores.
- i) Em **RESULTADOS** devem ser apresentados concisamente os dados obtidos.
- j) Na **DISCUSSÃO** devem ser confrontados os resultados diante da literatura. Não convém mencionar artigos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los.
- k) **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados obtidos e devem ser apresentados em diferentes parágrafos (uma Conclusão somente deve ser apresentada em parágrafo único).

l) Os **Agradecimentos** não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé; devem ser sucintos e colocados antes da Declaração de conflito de interesse e da Lista de Referências.

m) A **Declaração de conflito de interesse** é obrigatória e deve ser mencionada nos casos positivos ou negativos; deve ser sucinta e colocada imediatamente antes da Lista de Referências.

n) A Lista de **REFERÊNCIAS** deve incluir todas as citações apresentadas no texto e que tenham servido como fonte para consulta. A Lista deve ser ordenada alfabética e cronologicamente, pelo sobrenome do primeiro autor, seguido de todos os demais autores (em caixa alta e baixa), do ano, do título da publicação citada, e abreviado (por extenso em casos de dúvida) o nome do periódico. Sugerimos consultar exemplos dos últimos fascículos (www.pvb.com.br).

(Notem: (1) As Referências citadas no texto devem ser colocadas em ordem cronológica, mas alfabética tratando-se de referências do mesmo ano; (2) Quando utilizados programas de formatação (p.ex. Endnote X7), remover o fundo automático cinzento antes da submissão, para não dificultar eventuais correções.

2. Na elaboração do texto devem ser atendidas as seguintes normas:

a) Fonte **Cambria, corpo 10, entrelinha simples; página formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), texto corrido em uma coluna justificada, com as Legendas das Figuras no final (logo após a Lista de REFERÊNCIAS) sem repetir as legendas junto com as Figuras.

b) ABSTRACT e RESUMO serão escritos em um só parágrafo corrente e não devem conter citações bibliográficas.

c) A redação dos artigos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal.

d) Os nomes científicos usados no manuscrito devem ser apresentados por extenso (p.ex. *Palicourea marcgravii*), no início de cada capítulo (**TÍTULO, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, etc.**), quando aparecem pela primeira vez, seguido da abreviação do gênero (p.ex. *P. marcgravii*).

e) Nos títulos dos Quadros e nas Legendas das Figuras os nomes científicos devem ser apresentados por extenso, já que estes são independentes do texto.

f) No texto, os sinais de chamada para notas de rodapé devem ser números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o artigo; as notas deverão ser lançadas ao pé da

página em que estiver o respectivo número de chamada, sem o uso do “Inserir nota de fim”, do Word.

Notem: para evitar a separação em duas linhas, os numerais devem ser apresentados junto com suas unidades, ou seja, sem espaçamento, por exemplo: 100ppm, 10mm, 50cm, 18x10cm, ($P < 0,05$), 15h. A abreviação de número é “no” e não “nº”; grau Celsius é “oC” e não “ºC”.

g) Os Quadros (não usar o termo Tabela) e as Figuras devem ser citados no texto, pelos respectivos números, em ordem crescente e devem ser submetidos separadamente do texto!

h) Siglas e abreviações das instituições, ao aparecerem pela primeira vez, deverão ser colocadas entre parênteses, após o nome da instituição por extenso;

i) Citações bibliográficas serão feitas pelo sistema “autor e ano”, p.ex. (Caldas 2005); artigos de até dois autores serão citados pelos nomes dos dois (Pedroso & Pimentel 2013); e com mais de dois, pelo nome do primeiro, seguido de “et al.”, mais o ano (Brito et al. 2015); se dois artigos não se distinguirem, a diferenciação será feita através do acréscimo de letra minúscula ao ano (Barros 2017a, 2017b). A ordem de citação deve ser cronológica (Barbosa et al. 2003, Armien et al. 2004).

j) **Recomenda-se consultar na íntegra todos os artigos citados**; se isto não for possível, deve-se colocar no texto a referência original (não consultada na íntegra) seguida do ano, p.ex. (Bancroft 1921); na Lista de Referências deve ser incluída a referência original como: Bancroft 1921. título. ... periódico. (Apud Suvarna & Layton 2013). A referência consultada também deve ser incluída na Lista de Referências.

k) O uso de “comunicação pessoal” e de “dados não publicados” deve ser feito apenas em casos excepcionais; no texto com citação de Nome e Ano, e na Lista de Referências como: Barbosa 2016. Comunicação pessoal (Universidade Federal do Pará, campus Castanhal).

l) As **Legendas das Figuras** devem conter informações suficientes para sua compreensão (independente do texto); e devem ser precedidas de “Fig.” seguida do número sem espaço, p.ex. “Fig.8. ...”. Para elaboração das legendas sugerimos consultar exemplos nos últimos fascículos (www.pvb.com.br).

(Notem: Na legenda de Figuras compostas deve-se colocar a letra de cada “subfigura” em **negrito** com parênteses claros antes do texto correspondente e

devem ser mencionados letras ou sinais, que estão dentro de cada “subfigura”, em parênteses e claros após o respectivo texto da legenda.)

m) O Título dos **Quadros** devem ser em **negrito**, sem ponto, e a “garganta” (título das colunas) deve ser escrita em claro e separada por dois traços longos horizontais; o Título dos Quadros e da “garganta” devem ser escritas em caixa alta e baixa. Os Quadros (não usar o termo Tabela) devem conter os resultados mais relevantes. Não há traços verticais, nem fundos cinzentos; excepcionalmente pode conter traços horizontais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, com “a” em cada Quadro. As chamadas de rodapé deverão ser lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda; e devem evitar números arábicos. Os títulos não têm ponto no final, ao passo que as legendas terminam com um ponto. Os Quadros devem ser apresentados em Word e ser editáveis, a fim de inserirmos eventuais alterações de apresentação, dentro das normas da revista.

n) Dados complexos devem ser expressos por Gráficos (devem ser chamados de **Figuras**). Os gráficos devem ser produzidos em 2D, sem fundo e sem linhas horizontais. Em gráficos contendo texto a fonte deve ser Cambria tamanho 10.

3. Apresentação das Figuras:

a) As figuras devem ser salvas em 300dpi, arquivo TIF.

b) Enviar cada figura separadamente.

c) Identificar as figuras em ordem conforme a menção no texto.

d) As figuras solitárias devem ter seus arquivos identificados como (Fig.1, Fig.2 ...)

e) As figuras que serão destinadas a formar uma prancha devem ter seus arquivos identificados como (Fig.1A, Fig.1B ...). As pranchas devem ser compostas por múltiplas subfiguras. Imagens destinadas a uma prancha devem ser de mesmo tamanho.

f) Para micrografias usar, de preferência, barras de escala para indicar o aumento; apresentar na legenda sempre o método de coloração e a objetiva, p. ex.: HE, obj.40x.

g) As legendas de figuras devem conter inicialmente o que se observa na imagem, seguida das informações adicionais (Formato típico da legenda: Fig.1. (A) Descrição da imagem. Diagnóstico, órgão ou tecido, espécie animal, número do caso. Método de coloração e objetiva.).

h) As legendas de figuras devem ser apresentadas junto com o texto do artigo, após as Referências.

4. Todas as referências citadas no texto devem ser incluídas na Lista de Referências e vice-versa; na revisão final do artigo pelos autores, antes da submissão, isto deve ser conferido criteriosamente, para evitar discrepâncias (o sistema ScholarOne bloqueia automaticamente artigos com discrepâncias).

Exemplos de Referências

□ Artigos publicados em periódicos:

Martins K.P.F., Fonseca T.R.S., Silva E.S., Munhoz T.C.P., Dias G.H.S., Galiza G.J.N., Oliveira L.G.S. & Boabaid F.M. 2018. Bócio em bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 38(6):1030-1037.

Rondelli L.A.S., Silva G.S., Bezerra K.S., Rondelli A.L.H., Lima S.R., Furlan F.H., Pescador C.A. & Colodel E.M. 2017. Doenças de bovinos no Estado de Mato Grosso diagnosticadas no Laboratório de Patologia Veterinária da UFMT (2005-2014). *Pesq. Vet. Bras.* 37(5):432-440.

Hooiveld M., Smit L.A., Wouters I.M., Van Dijk C.E., Spreeuwenberg P., Heederik D.J. & Yzermans C.J. 2016. Doctor-diagnosed health problems in a region with a high density of concentrated animal feeding operations: a cross-sectional study. *Environ. Health* 17:15-24.

(Notem: Os iniciais dos autores devem ser colocados sem espaço. O sinal “&” é usado para separar o penúltimo do último autor. As primeiras letras das palavras do título de artigos publicados em periódicos científicos devem ser de preferência minúsculas. A palavra “Revista” deve ser abreviada como “Revta” em diferença a “Rev.”, do inglês “Review”. Deve-se indicar o número do respectivo volume do periódico e, se possível, também do fascículo. Somente abreviações tem um ponto, exceto as que terminam com a última letra da palavra em extenso. O traço entre as páginas é curto (-) e não comprido. Não devem ser usados “ponto-vírgulas” (;) em lugar de vírgulas.

□ Livros:

Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 2012. Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção. 2ª ed. Helianthus, Rio de Janeiro, p.305-348.

Marsh P. & Martin M. 1992. Oral Microbiology. 3rd ed. Chapman and Hall, London, p.167-196.

(Notem: A primeira letra de termos do título de livros deve ser maiúscula. Devem ser mencionadas as páginas que foram consultadas, em vez do total de páginas do livro.

□ Capítulos de livros:

Barros C.S.L. 2007. Doenças víricas: leucose bovina, p.159-169. In: Riet-Correa F., Schild A.L., Lemos R.A.A. & Borges J.R.J. (Eds), Doenças de Ruminantes e Equídeos. Vol.1. 3ª ed. Pallotti, Santa Maria.

Tokarnia C.H., Brito M.F., Barbosa J.D., Peixoto P.V. & Döbereiner J. 2012. Plantas que afetam o funcionamento do coração, p.27-94. In: Ibid. (Eds), Plantas Tóxicas do Brasil para Animais de Produção. 2ª ed. Helianthus, Rio de Janeiro.

(Notem: As primeiras letras das palavras do título de capítulos de livros são minúsculas, mas as de livros são maiúsculas.)

□ Dissertações e Teses:

Rech R.R. 2007. Alterações no encéfalo de bovinos submetidos à vigilância das encefalopatias espongiformes transmissíveis. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria. 228p.

(Notem: (1) Deve-se evitar citações de Dissertações ou Teses; deve-se preferir citar artigos baseados nas mesmas e publicados em periódicos científicos que são de mais fácil acesso. (2) Não deve-se tentar de publicar o texto de Dissertação ou Tese praticamente na íntegra sem escrever um artigo conciso de seus resultados.

□ Resumos publicados em eventos:

Mendonça F.S., Almeida V.M., Albuquerque R.F., Chaves H.A.S., Silva Filho G.B., Braga T.C., Lemos B.O. & Riet Correa F. 2016. Paralisia laríngea associada à deficiência de cobre em caprinos no semiárido de Pernambuco (IX Endivet, Salvador, BA). Pesq. Vet. Bras. 36(Supl.2):50-51. (Resumo)

Pierezan F., Lemos R.A.A., Rech R.R., Rissi D.R., Kommers G.D., Cortada V.C.L.M., Mori A.E. & Barros C.S.L. 2007. Raiva em equinos. Anais XIII Encontro Nacional de Patologia Veterinária, Campo Grande, MS, p.145-146. (Resumo)

(Note: Evitar na consulta o uso de Resumos ao invés de artigos na íntegra!)