

RICARDO ANTONIO PILEGI SFACIOTTE

**Caracterização de micro-organismos multirresistentes isolados do ambiente e
colonizando humanos, cães e gatos em um hospital veterinário de ensino**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

Orientadora: Sandra Maria Ferraz

Co-orientador: Fabiano Zanini Salbego

**LAGES
2019**

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Sfaciotte, Ricardo Antonio Pilegi

Caracterização de micro-organismos multirresistentes isolados do ambiente e colonizando humanos, cães e gatos em um hospital veterinário de ensino / Ricardo Antonio Pilegi Sfaciotte. -- 2019.

142 p.

Orientadora: Sandra Maria Ferraz

Coorientador: Fabiano Zanini Salbego

Tese (doutorado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Lages, 2019.

1. Carbapenemase. 2. ESBL. 3. MRS. 4. VRE. 5. infecção hospitalar. I. Ferraz, Sandra Maria. II. Salbego, Fabiano Zanini. III. Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

RICARDO ANTONIO PILEGI SFACIOTTE
Caracterização de micro-organismos multirresistentes isolados do ambiente e
colonizando humanos, cães e gatos em um hospital veterinário de ensino

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.

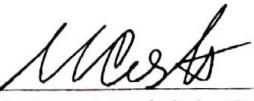
Banca examinadora:

Orientadora: 
Dra. Sandra Maira Ferraz
Universidade do Estado de Santa Cararina – UDESC

Membros:


Dra. Sheila Rezler Wosiacki
Universidade Estadual de Maringá – UEM


Dra. Ana Cristina Gales
Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP


Dr. Ubirajara Maciel da Costa
Universidade do Estado de Santa Cararina – UDESC


Dra. Amanda Leite Bastos Pereira
Universidade do Estado de Santa Cararina – UDESC

Lages, 30 de Julho de 2019

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por concluir mais uma grande etapa na minha vida e obrigado pelos seus planos para mim serem sempre maiores que os meus sonhos, pois somente com as suas bênçãos eu poderia chegar onde cheguei.

Agradeço a minha família, Cidinha Pilegi (mãe), Francielli Sfaciotte (irmã) e Carlos Alberto Sfaciotte (pai) por todo o apoio desde o início da minha jornada até a conclusão desse sonho. Vocês são meu alicerce e graças ao apoio de vocês e por acreditarem em mim que tive forças para chegar até aqui.

À minha orientadora, Sandra Ferraz, tenho profunda gratidão por ter acreditado em mim sempre, por ter me ajudado imensamente nessa conquista com seus conhecimentos, sua sabedoria, amizade e conselhos. Graças ao seu carinho e direcionamento me senti amparado mesmo estando longe de minha família.

Aos professores do CEDIMA, Ubirajara Maciel da Consta e Eliana Knackfuz pelo carinho e acolhimento junto a Prof. Sandra e pelos bons momentos de risadas e descontração durante esse período. A minha segunda orientadora, Sheila Wosiacki, por acreditar em mim desde a minha graduação até aqui e que mesmo longe ainda tenho um carinho e uma gratidão enorme.

A/aos minhas/meus eternas(os) amigas(os) e “irmãs/ãos” Fernanda Melo, Paula Wildemann e Leandro Parussolo por terem me recebido de braços abertos a partir do momento que cheguei a Lages e pela amizade sincera que com certeza carregarei pelo resto da vida.

Ao meu companheiro Rodrigo Silveira pelo apoio, carinho, paciência e por tudo que passamos nesses anos até a conclusão dessa nova etapa, muito obrigado por sempre estar ao meu lado.

Agradeço também a Rosane pela confiança todos esses anos, pelas risadas e conversas no laboratório. Aos estagiários, bolsistas e amigos que fiz durante esses 4 anos no CEDIMA aos quais não quero citar nomes para não cometer a injustiça de esquecer alguém. Aos amigos que fiz dentro do CAV-UDESC, muito obrigado.

Mesmo longe, aos meus amigos de longa data, Tody, Renata, Susana, Lais, Jéssica, Leandro e Diego, que sempre me apoiaram e acreditaram na minha capacidade.

E por último, mas não menos importante, aos meus “filhos” de quatro patas que sempre me deram momentos únicos, ao meu gato Grey e minhas “dogs” Kate e Ana.

“O mundo não se divide em pessoas boas e más. Todos temos luz e trevas dentro de nós. O que importa é o lado o qual decidimos agir. Isso é o que realmente somos!” (J.K Rowling)

RESUMO

Infecção hospitalar (IH) ou nosocomial é a infecção adquirida dentro do hospital e que não tenha relação com o motivo da internação do paciente, tendo como principais causadores as bactérias multirresistentes, sobretudo os *Staphylococcus* meticilina resistente (MRS), *Enterococcus* vancomicina resistente (VRE), bacilos Gram negativos (BGN) produtores de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) e os BGN produtores de carbapenemases (CP). Com isso, os objetivos do trabalho foram detectar os principais micro-organismos multirresistentes envolvidos em infecções hospitalares na medicina veterinária, além de apontar os principais pontos de contaminação do Hospital de Clínica Veterinária (HCV) do CAV-UDESC. As amostras do ambiente foram coletadas em um único dia em quadruplicata e das pessoas envolvidas na rotina do hospital foi realizado um swab nasal. Foram coletados swab nasal e retal dos animais que permanecerem internados no HCV por mais de dois dias no momento da admissão do paciente e no momento da alta do hospital. Após a coleta das amostras os micro-organismos multirresistentes que apresentaram crescimento e características fenotípicas de resistência foram identificados e submetidos ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos e, posteriormente, a detecção dos principais genes de resistência através da técnica de PCR. Foram coletadas 106 amostras de animais, sendo 44,34% (9 gatos e 38 cães) positivas para bactérias produtoras de ESBL. A *Escherichia coli* foi a principal bactéria produtora de ESBL isolada (53,42%). O gene TEM exibiu a maior frequência em isolados produtores de ESBL. *Enterococcus faecalis* foi o VRE mais isolado dos animais (35,8%). *Enterococcus* foi identificado com a presença do gene *vanA* (52,54% - n = 31), do gene *vanB* (23,73% - n = 14), do *vanC* (20,34% - n = 12) e do gene *vanE* (3, 39% - n = 2). Dos 81 cães e 25 gatos (n=106), 49,38% (n=40) e 44% (n=11) respectivamente estavam colonizados por MRS, totalizando 51 animais (48,11%), assim como 90% (18/20) dos swabs nasais coletados das pessoas. Todos os MRS fenotipicamente identificados apresentaram o gene *mecA*. Foi possível identificar micro-organismos CP em 13,21% (n=14, sendo 13 cães e um gato). Foram detectados os genes KPC (3), NDM (7), SPM (3), OXA-48 (3) e os genes FOX (3), ACC (4) e ACT (3). Dos 39 locais do HCV que foram realizados coleta do ambiente, todos (100%) apresentaram ao menos um dos micro-organismos pesquisados. Dos 94 pools coletados, foi possível isolar MRS em 81,91% (n=77), VRE em 12,77% (n=12), ESBL em 62,77% (n=59) e CP em 24,47% (n=23).

Palavras-chave: ESBL, VRE, MRS, carbapenemase, infecção hospitalar.

ABSTRACT

Hospital-acquired infection (IH) or nosocomial infection is the infection acquired within the hospital and is unrelated to the reason for the patient's hospitalization. The main causes are multiresistant bacteria, especially methicillin resistant *Staphylococcus* (MRS), vancomycin resistant *Enterococcus* (VRE), Gram-negative bacilli (BGN) extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and carbapenemase-producing (CP). The aim of the study was to detect the main multiresistant microorganisms involved in hospital-acquired infections in veterinary medicine, as well as to identify the main contamination points of the Hospital de Clínica Veterinária (HCV) of the CAV-UDESC. The samples of the environment were collected in a single day in quadruplicate and of the people involved in the routine of the hospital a nasal swab was performed. Nasal and rectal swabs were collected from animals that remained hospitalized for more than two days at the time of admission and at hospital discharge. After the collection of the samples, the multiresistant microorganisms that presented growth and phenotypic characteristics of resistance were identified and submitted to antimicrobial susceptibility test and, later, the detection of the main resistance genes by PCR technique. A total of 106 animal samples were collected, 44.34% (9 cats and 38 dogs) positive for ESBL-producing bacteria. *Escherichia coli* was the major ESBL-producing bacterium isolated (53.42%). The TEM gene exhibited the highest frequency in ESBL-producing isolates. *Enterococcus faecalis* was the most isolated VRE of the animals (35.8%). Enterococcus was identified with the presence of the vanA gene (52.54% - n = 31), the vanB gene (23.73% - n = 14), the vanC gene (20.34% - n = 12) and the vanE gene (3.39% - n = 2). Of the 81 dogs and 25 cats (n = 106), 49.38% (n = 40) and 44% (n = 11) respectively were colonized by MRS, totaling 51 animals (48.11%) as well as 90% (18/20) of nasal swabs collected from people. All phenotypically identified MRSs had the mecA gene. It was possible to identify CP microorganisms in 13.21% (n = 14, 13 dogs and one cat). The KPC (3), NDM (7), SPM (3), OXA-48 (3) and FOX (3), ACC (4) and ACT (3) genes were detected. Of the 39 HCV sites that were collected from the environment, all (100%) presented at least one of the microorganisms researched. Of the 94 pools collected, it was possible to isolate MRS in 81.91% (n = 77), VRE in 12.77% (n = 12), ESBL in 62.77% (n = 59) and CP in 24.47% (n = 23).

Keywords: ESBL, VRE, MRS, carbapenemase, hospital infection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1: Perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos micro-organismos produtores de carbapenemase e/ou ampC isolados dos animais hospitalizados no HCV no período entre setembro e dezembro de 2016	112
Figura 2: Espectro de ação das carbapenemases em Enterobacteriaceae.....	33
Figura 3: Multiplex-PCR para detecção de beta-lactamase do tipo ampC em bactérias Gram negativas.....	136
Figura 4: Multiplex-PCR para detecção de beta-lactamase do tipo ampC em bactérias Gram negativas.....	136
Figura 5: Multiplex-PCR para detecção de carbapenemase do tipo OXA-48 em bactérias Gram negativas.....	137
Figura 6: Multiplex-PCR para detecção de carbapenemase do tipo KPC em bactérias Gram negativas.....	137
Figura 7: Detecção de carbapenemase do tipo NDM em bactérias Gram negativas	137
Figura 8: PCR para detecção do gene SPM.....	137
Figura 9: Multiplex-PCR para detecção de gene de beta-lactamase de espectro estendido em bactérias Gram negativas.....	137
Figura 10: Detecção de genes de resistência aos beta-lactâmicos em <i>Staphylococcus</i>	137
Figura 11: Identificação das espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva.....	137
Figura 12: Multiplex PCR para identificação das principais espécies de <i>Enterococcus</i>	137
Figura 13: Concentração inibitória mínima para vancomicina através da fita de Etest em um isolado de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	137
Figura 14: Teste de sensibilidade antimicrobiana em isolado de <i>Enterococcus</i> . A flecha em azul sinaliza a resistência a altas doses de Gentamicina (120 ug), sugerindo a identificação de <i>Enterococcus</i> HLAR.....	137
Figura 15: Detecção fenotípica de ESBL com a presença do halo fantasma entre o disco de amoxicilina com clavulanato e os discos de cefalosporinas de 3 ^a e 4 ^a geração.....	137
Figura 16: Teste fenotípico para identificação de bactérias produtoras de carbapenemase do tipo metalo-beta-lactamase utilizando discos de meropenem e imipenem puros e com adição de EDTA (discos dentro do círculo vermelho)	137

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das principais beta-lactamases em bactérias Gram negativas.....	33
Tabela 2: List of primers used in PCR for detection of ESBL-producing bacteria	66
Tabela 3: List of healthy animals admitted to CAV/UDESC that revealed positive for ESBL in faecal samples, associated with antimicrobial susceptibility profile and, detection of resistance genes.....	67
Tabela 4: List of sick animals admitted to CAV/UDESC that revealed positive for ESBL in faecal samples, associated with antimicrobial susceptibility profile and, detection of resistance genes.....	68
Tabela 5: Espécie de <i>Enterococcus</i> vancomicina resistente isolados de cães e gatos	83
Tabela 6: Principais genes de resistência a vancomicina identificados nas espécies de <i>Enterococcus</i>	83
Tabela 7: Caracterização das cepas de <i>Enterococcus</i> isoladas de animais hospitalizados no HCV.	83
Tabela 8: Primers utilizados para as reações de PCR e multiplex-PCR na detecção de carbapenemases e beta-lactamase do tipo ampC.	110
Tabela 9: Caracterização dos 18 micro-organismos produtores de carbapenemase e/ou ampC isolados dos animais hospitalizados no HCV.....	111
Tabela 10: Ambientes do HCV que foram realizados coleta de amostras e os micro-organismos isolados em cada um deles.	125
Tabela 11: Identificação dos micro-organismos isolados dos ambientes do HCV.	126
Tabela 12: Identificação de micro-organismos produtores de carbapenemase no ambiente hospitalar veterinário associado com perfil de susceptibilidade antimicrobiana e detecção de genes de resistência frente aos carbapenêmicos.	127
Tabela 13: Primers para identificação de genes de resistência aos beta-lactâmicos em <i>Staphylococcus</i>	133
Tabela 14: Primers para identificação das espécies de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva. .	133
Tabela 15: Primers para identificação de genes de resistência à vancomicina em <i>Enterococcus</i>	133
Tabela 16: Primers para identificação das principais espécies de <i>Enterococcus</i>	134
Tabela 17: Primers para identificação de genes produtores de ESBL em bactérias Gram negativas.....	134
Tabela 18: Primers para identificação de genes de resistência aos carbapenêmicos em bactérias Gram negativas.	134
Tabela 19: Primers para identificação de beta-lactamases do tipo ampC em bactérias Gram negativas.....	135

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 INFECÇÃO HOSPITALAR	23
2.2 <i>ENTEROCOCCUS VANCOMICINA RESISTENTE (VRE)</i>	25
2.3 <i>STAPHYLOCOCCUS METICILINA RESISTENTE (MRS)</i>	27
2.4 BETA LACTAMASE DE ESPECTRO ESTENDIDO.....	29
2.5 CARBAPENEMASES	31
REFERÊNCIAS.....	35
3 OBJETIVO.....	51
3.1 OBJETIVO GERAL	51
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	51
4 ARTIGO 1.....	53
4.1 ABSTRACT	53
4.2 INTRODUCTION	54
4.3 MATERIAL AND METHODS	55
4.3.1 Samples.....	55
4.3.2 Phenotypic screening for ESBL-producing isolates	55
4.3.3 Biochemical identification of ESBL-producing isolates and antimicrobial susceptibility testing profile	56
4.3.4 Bacterial DNA extraction	56
4.3.5 Genotypic characterization of ESBL-producing isolates	57
4.4 RESULTS.....	57
4.5 DISCUSSION.....	58
4.6 REFERENCES	61
5 ARTIGO 2.....	73
5.1 ABSTRACT	73
5.2 INTRODUCTION	74
5.3 MATERIAL AND METHODS	74
5.3.1. Samples.....	74
5.3.2 Phenotypic Detection of vancomycin resistant Enterococcus (VRE).....	75
5.3.3 Antimicrobial susceptibility test of Enterococcus and detection of high level of aminoglycoside resistance (HLAR)	75
5.3.4 Bacterial DNA extraction	76
5.3.5 Molecular confirmation of <i>Enterococcus faecium</i> and <i>Enterococcus faecalis</i> and detection of genes conferring resistance to vancomycin	76
5.4 RESULTS.....	77

5.5 DISCUSSION	78
5.6 REFERENCES.....	80
6 ARTIGO 3.....	85
6.1 RESUMO.....	85
6.2 INTRODUÇÃO	86
6.3 MATERIAIS E MÉTODOS	87
6.3.1 Amostras dos animais	87
6.3.2 Amostras do ambiente	87
6.3.3 Amostra das pessoas	88
6.3.4 Identificação fenotípica de MRS	88
6.3.5 Teste de susceptibilidade antimicrobiana.....	88
6.3.6 Extração do DNA bacteriano	89
6.3.7 Confirmação molecular de <i>Staphylococcus coagulase</i> positiva e detecção dos genes de resistência aos beta-lactâmicos	89
6.4 RESULTADO E DISCUSSÃO	89
6.4.1 Amostras dos animais	89
6.4.2 Amostras do ambiente	92
6.4.3 Amostras das pessoas	93
6.5 CONCLUSÃO	94
6.6 REFERENCIAS.....	94
7 ARTIGO 4.....	99
7.1 RESUMO.....	99
7.2 INTRODUÇÃO	100
7.3 MATERIAIS E METODOS	101
7.3.1 Amostras	101
7.3.2 Detecção fenotípica de micro-organismos produtores de carbapenemase e/ou ampC	101
7.3.3 Teste de susceptibilidade antimicrobiana.....	102
7.3.4 Extração do DNA bacteriano	102
7.3.5 Detecção dos genes de resistência ampC e carbapenemases.....	102
7.4 RESULTADOS.....	103
7.5 DISCUSSÃO	103
7.6 CONCLUSÃO	106
7.7 REFERÊNCIAS.....	106
8 ARTIGO 5.....	113
8.1 RESUMO.....	113
8.2 INTRODUÇÃO	114
8.3 MATERIAIS E MÉTODOS	115
8.3.1 Caracterização das amostras.....	115

8.3.2 Staphylococcus meticilina resistente	116
8.3.3 Enterococcus Vancomicina Resistente	116
8.3.4 Bactérias Gram negativas produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) ...	117
8.3.5 Bactérias Gram negativas produtoras de Carbapenemases	117
8.3.6 Perfil de resistência.....	117
8.4 RESULTADOS	118
8.5 DISCUSSÃO	119
8.6 CONCLUSÃO	122
8.7 REFERÊNCIAS.....	122
APÊNDICE A – Soluções e Tampões	131
APÊNDICE B – Lista de <i>Primers</i>	133
APÊNDICE C – Fotos.....	136

1 INTRODUÇÃO

A identificação de micro-organismos multirresistentes tem crescido significativamente nos últimos anos no mundo todo, onde já foram isoladas bactérias resistentes a todas as classes de antimicrobianos existentes no mercado. Esses micro-organismos, em sua maioria, são considerados oportunistas, pois eles estão em constante contato com humanos e animais e apenas quando ocorre uma alteração na microbiota ou uma queda na imunidade é que eles causam algum tipo de infecção.

Os micro-organismos multirresistentes não possuem fatores de virulência a mais ou uma maior capacidade de infectar humanos e/ou animais, porém quando eles são responsáveis por algum tipo de infecção, a escolha do antimicrobiano se torna mais escassa, prolongando e dificultando o tratamento desse paciente.

O surgimento de cepas multirresistentes pode causar falhas no tratamento de várias infecções, levando ao uso inadequado de antimicrobianos. Isso contribui para o desenvolvimento de bactérias resistentes a antimicrobianos presentes em animais e humanos. As mesmas classes de antimicrobianos utilizados para o tratamento em humano também é utilizada em animais, portanto, o uso incorreto dessas drogas para tratar infecções em animais de estimação pode contribuir para o surgimento de cepas multirresistentes tanto na medicina humana quanto na veterinária.

Os *Staphylococcus* meticilina resistente (MRS), *Enterococcus* vancomicina resistente (VRE), bacilos Gram negativos (BGN) produtores de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) e BGN produtores de carbapenemases são os principais micro-organismos multirresistentes e são frequentemente encontrados em casos de infecções hospitalares em humanos. Porém, na medicina veterinária são poucos os estudos relacionados com a identificação desses patógenos (com exceção dos MRS), e ainda mais escassos estudos relacionando eles a casos e surtos de infecções hospitalares.

Os patógenos responsáveis pelas infecções hospitalares em animais podem ser provenientes de outros pacientes, médicos veterinários, funcionários e/ou do ambiente hospitalar (BREATHNACH, 2013), tendo esses patógenos uma grande capacidade zoonótica, o que torna cada vez mais clara a necessidade de medidas de controle (PRESCOTT, 2014; SCHEFTEL et al., 2010).

Apesar da dificuldade em correlacionar o ambiente com casos de infecções hospitalares, ele pode ser uma fonte de risco para casos de infecção hospitalar na medicina humana, porém, na medicina veterinária, apesar de haver alguns estudos que descrevem a contaminação

ambiental associada a infecções hospitalares, ainda não se tem muita informação em relação a essa ligação, uma vez que não se tem dados efetivos sobre essas infecções (DALLAP et al., 2010; EKIRI et al., 2010).

Outro ponto chave na identificação e caracterização desses micro-organismos na medicina veterinária é o fato do potencial zoonótico que eles possuem pois, com o contato cada vez mais próximo dos cães e gatos com seus donos, há uma maior probabilidade da transferência desses genes de resistência entre os animais e os humanos ou vice versa, tornando o assunto de grande relevância para saúde pública.

Dessa forma, é de extrema importância a identificação desses patógenos bem como o mapeamento do seu perfil de resistência, com o intuito de evitar que eles causem danos a saúde dos animais, mas também que se evite a propagação dos genes de resistências no ambiente, uma vez que esses micro-organismos são responsáveis por inúmeras mortes no mundo todo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INFECÇÃO HOSPITALAR

Em humanos, as infecções hospitalares (IH), também conhecidas como infecções nosocomiais ou infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), são aquelas adquiridas dentro do hospital e que não tem relação com o motivo pelo qual o paciente foi hospitalizado, podendo se manifestar durante ou após a internação, sendo de origem bacteriana em sua maioria (MAGILL, et al., 2014; BREATHNACH, 2013; SANTOS et al., 2012).

Na medicina veterinária ainda são poucos os estudos relacionados com infecções hospitalares, por isso, não há valores reais relacionados à sua incidência (RUPLE-CZERNIAK, 2013). Porém, alguns estudos importantes buscam auxiliar no levantamento desses dados, tal como o estudo de Ruple-Czerniak et al, (2013) que avaliou cinco hospitais veterinários de ensino e, dos 1535 cães e 416 gatos atendidos em um período de 12 semanas, 28,3% (16,3% cães e 12% gatos) apresentaram pelo menos um caso de infecção hospitalar; e o estudo de Benedict et al, (2008), que em um questionário realizado em 38 hospitais veterinários (europeus e norte americanos), 82% (31) reportaram a ocorrência de pelo menos um surto de infecção hospitalar nos cinco últimos anos que antecederam a entrevista.

Nos hospitais humanos, estima-se que dezenas de milhares de pessoas morrem a cada ano decorrente de infecções hospitalares (OLIVEIRA et al., 2010), e que o custo anual relacionado a essas infecções gira em torno de 28 a 45 bilhões de dólares, sem incluir os custos indiretos, tais como: cuidados com a comunidade, perda de produtividade e salários perdidos (SCOTT, 2009). Na veterinária, os custos com tratamento, indenizações devido a insatisfação do proprietário, perda de negócios e os próprios surtos de infecções hospitalares, vem cada vez mais chamando a atenção de médicos veterinários em todo mundo (WEESE, 2012; DALLAP et al., 2010; EKIRI et al., 2010).

Várias medidas devem ser tomadas para combater os micro-organismos multirresistentes e evitar o impacto em saúde pública, sendo principalmente o uso consciente dos antimicrobianos, escolha da via de administração correta e o monitoramento do perfil de resistência através da técnica de antibiograma (EFSA e ECDC, 2015; WU et al., 2013).

Os principais fatores que contribuem para infecções hospitalares, tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária são: aumento dos cuidados intensivos, maior tempo de hospitalização, procedimentos cirúrgicos, uso de dispositivos intravasculares e sondas, uso de antimicrobianos e uso de drogas imunossupressoras (WEESE, 2012; PELLIGAND et al., 2007;

GYLES et al., 2006). No entanto, um agravante na veterinária é quanto a higiene do paciente, o ato de lamber as feridas e a baixa preocupação com o controle de infecções hospitalares (STULL e WEESE, 2015).

Os patógenos responsáveis pelas infecções hospitalares em animais podem ser provenientes de outros pacientes, médicos veterinários, funcionários e/ou do ambiente hospitalar (BREATHNACH, 2013), tendo esses patógenos uma grande capacidade zoonótica, o que torna cada vez mais clara a necessidade de medidas de controle (PRESCOTT, 2014; SCHEFTEL et al., 2010).

O ambiente tem grande ligação com casos de infecção hospitalar na medicina humana, porém, na medicina veterinária, apesar de haver alguns estudos que descrevem a contaminação ambiental associada a infecções hospitalares, ainda não se tem muita informação em relação a essa ligação, uma vez que não se tem dados efetivos sobre essas infecções (DALLAP et al., 2010; EKIRI et al., 2010).

Alguns pontos críticos de contaminação são: maçanetas, interruptores de luz, computadores, celulares (GIRLING e FRASER, 2009; BENDER et al., 2012), portas de gaiola, estetoscópios, termômetros, mordaças (GHOSH et al., 2012) e, principalmente, as mãos de médicos e funcionários, que, quando ocorre falha na higienização e desinfecção, aumentam as chances de infecções hospitalares (WEESE, 2012).

Como dito anteriormente, as bactérias são os principais micro-organismos envolvidos em casos de infecções hospitalares, podendo ela ser do próprio paciente (contaminação endógena) após uma queda imunológica, ou ser proveniente do ambiente ou de uma contaminação cruzada (outros animais ou mãos de profissionais da saúde). Geralmente as bactérias envolvidas em infecções hospitalares apresentam multirresistência aos antimicrobianos, principalmente aqueles mais utilizados no hospital em questão, o que dificulta ainda mais o tratamento e a melhora do paciente (STULL e WEESE, 2015).

Como não se tem muito conhecimento a respeito dos principais micro-organismos causadores de infecções hospitalares em animais, a grande preocupação é com aqueles que acometem os humanos, já que eles possuem um grande potencial zoonótico. Outra grande preocupação é por eles serem comumente encontrados em animais/humanos saudáveis (*Staphylococcus*, *Enterococcus* e Enterobactérias), bem como no ambiente (*Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumanii*) (STULL e WEESE, 2015; SIEVERT et al., 2013).

Os principais micro-organismos multirresistentes envolvidos em infecções hospitalares em humanos são: *Staphylococcus* meticilina resistente (MRS), *Enterococcus* vancomicina resistente (VRE), bactérias Gram negativas (família *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*

aeruginosa e *Acinetobacter baumanii*) produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) e as produtoras de carbapenemases (CDC, 2013).

2.2 *ENTEROCOCCUS* VANCOMICINA RESISTENTE (VRE)

Os micro-organismos pertencentes ao gênero *Enterococcus* são cocos Gram positivos, catalase negativa, anaeróbicos facultativos, sendo considerados parte da microbiota intestinal normal de homens e animais (SHEPARD e GILMORE, 2002). Já foram descritas mais de 40 espécies diferentes, sendo o *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. cecorum*, *E. hirae* e o *E. gallinarum* os mais prevalentes encontrados em animais (KLEIN, 2003). São capazes de sobreviver por meses em diferentes tipos de ambiente, incluindo em altas concentrações de sais (6,5%), em temperaturas entre 10 e 45°C e em variações de pH entre 4,5 e 10 (KRAMER et al., 2006; BEACHES ACT, 2000).

Os *Enterococcus* são considerados micro-organismos comensais com propagação mundial (ESPINOSA-GONGORA et al., 2015), sendo que por muito tempo eles foram considerados micro-organismos inofensivo, porém, nos últimos tempos, foram considerados uma bactéria emergente e de grande importância na área da saúde, principalmente com o aumento de sua incidência em infecções hospitalares (KHAN, AHMA e MEHBOOB, 2015; GILMORE et al., 2014; MARCADE et al., 2014; ARIAS e MURRAY, 2012).

Atualmente, os *Enterococcus* são considerados importantes patógenos oportunistas capazes de causar infecções nos animais e nos humanos (ESPINOSA-GONGORA et al., 2015; LEAVIS, BONTEN e WILLEMS, 2006), sendo considerado o terceiro patógeno mais prevalente em infecções hospitalares (ECDC, 2018). As principais infecções causadas por eles são: infecções do trato urinário, de pele, endocardite e septicemia (FISHER e PHILLIPS, 2009; HIDRON et al., 2008).

A resistência aos antimicrobianos nos *Enterococcus* pode ser de forma intrínseca, como ocorre com a classe das polimixinas, lincosamidas, penicilinas semissintéticas, em baixo nível com os aminoglicosídeos e em algumas espécies (*E. gallinarum* e *E. casseliflavus*) com a vancomicina (KLARE et al., 2003); ou pode ser adquirida através de plasmídeos, integrons e/ou transposons (HOLLENBECK e RICE, 2012; BEM BELGACEM et al., 2010).

A vancomicina é um dos principais antimicrobianos utilizado no tratamento para infecções por *Enterococcus*, porém, no fim da década de 80, na Europa, o uso indiscriminado do glicopeptídeo avoparcina (análogo a vancomicina) como promotor de crescimento para animais de produção, levou ao surgimento de cepas resistentes, chamadas de *Enterococcus*

vancomicina resistente (VRE) (BATES, 1997; RICE, 2013). Desde então, o VRE já foi isolado no ambiente, em animais domésticos e de produção, alimentos de origem animal, peixes, animais de vida livre, água, hospitais, entre outros (TORRES et al., 2003; POETA et al., 2005; ROBERTS et al., 2009; ARAUJO et al., 2011; IVERSEN et al., 2012; GETACHEW et al., 2013; ORAVCOVA et al., 2013; LOZANO et al., 2015).

Os primeiros isolados VRE de amostras clínicas, foram identificados na Inglaterra e na França no ano de 1988, sendo um isolado de *E. faecium* (O'DRISCOLL e CRANK, 2015). Com o aparecimento de cepas VRE no ambiente hospitalar, limitou-se o tratamento desses micro-organismos, tornando-os uma das bactérias multirresistentes mais importantes no mundo (ECDC, 2018). Os únicos antimicrobianos utilizados para o tratamento de VRE são: quinupristina/dalfopristina, linezolida, tigeciclina e daptomicina, porém com ressalvas e somente em determinadas situações, mas mesmo assim já foram descritas resistência a esses antimicrobianos (WERNER et al., 2008; ARIAS et al., 2011).

Na medicina veterinária, principalmente em pequenos animais, não se tem muitos dados em relação aos VRE, porém *Enterococcus* multirresistentes são identificados regularmente (GHOSH, DOWD e ZUREK, 2011).

Até o momento, nove diferentes variações no gene de resistência a vancomicina dos *Enterococcus* foram encontradas, sendo os genes *vanA*, *vanB* e *vanC* os mais comumente encontrados (FISHER e PHILLIPS, 2009; LEBRETON et al., 2011).

Alguns estudos correlacionam à resistência a vancomicina com a eritromicina, uma vez que o gene *ermB* (eritromicina) e o gene *vanA* (vancomicina) são encontrados no mesmo plasmídeo (LOPEZ et al., 2009; YILMAZ et al., 2016). Além dos genes de resistência, os genes de virulência dos *Enterococcus* isolados de humanos e animais apresentam similaridades em suas sequencias, evidenciando ainda mais seu potencial zoonótico (OLSEN et al., 2012; BISWAS e tal., 2014).

Ainda não se tem a dimensão do impacto na saúde pública ocasionado pela transferência do gene *vanA* plasmidial entre cepas de *Enterococcus* isolados de humanos e aqueles isolados de animais (BORTOLOIA e GUARDABASSI, 2014; SLETVOLD et al., 2010). Entretanto, já se sabe que essa transferência acontece, além de ocorrer também à transferência desse gene para micro-organismos de gêneros diferentes, uma vez que já foi identificado o gene *vanA* em cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) (SFACIOTTE et al, 2015).

2.3 STAPHYLOCOCCUS METICILINA RESISTENTE (MRS)

Os *Staphylococcus* são bactérias Gram positivas, catalase positiva e compreendem mais de 40 espécies diferentes. São divididas em dois principais grupos: coagulase positivos (SCP), principalmente o *S. aureus* e o *S. pseudintermedius*; e coagulase negativos (SCN), *S. epidermidis* e *S. haemolyticus* (BOND e LOEFFLER, 2012). São considerados parte da microbiota normal da pele e mucosas de animais e humanos, sendo comumente associado a infecções oportunistas (MALACHOWA e DELEO, 2010).

O *Staphylococcus pseudintermedius* pertence ao “*Staphylococcus intermedius group*” (grupo SIG) e é um patógeno oportunista, sendo considerado o principal patógeno isolado de cães e gatos (DEVRIESE et al., 2005; GRONTHAL et al., 2017). O grupo SIG (*S. pseudintermedius*, *S. intermedius* e *S. delphini*) só pode ser diferenciado por técnicas moleculares, porém, quando não for possível utilizar essas técnicas, todos os isolados de cães e gatos podem ser classificados como *S. pseudintermedius* (BANNOEHR e GUARDABASSI, 2012; DEVRIESE et al., 2005).

Os dois principais mecanismos de resistência aos antimicrobianos nos *Staphylococcus* são associados a resistência a classe dos beta-lactâmicos, sendo o primeiro mecanismo uma inativação enzimática codificada pelo gene *blaZ*, geralmente plasmidial, que confere resistência as penicilinas (LOWY, 2003); e o segundo pela produção de proteína ligadora de penicilina adicional (PBP2a ou PBP2'), uma proteína ligante de penicilina de baixa afinidade, codificada pelos genes *mecA* e *mecC* (CASTELLANO-GONZALEZ et al., 2009), conferindo resistência a todos os antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos (CLSI, 2014), com excessão das cefalosporinas de quinta geração (ceftaroline e ceftobiprole).

O gene *blaZ* já foi identificado em isolados de *Staphylococcus* de origem canina e felina (MALIK et al., 2007), incluindo cepas de *S. pseudintermedius* meticilina resistente (MRSP) e cepas meticilina sensível (MRSS) (PERRETEREN et al., 2010; GOMEZ-SANZ et al., 2011), levando a um aumento da resistência a penicilina e ampicilina principalmente (KADLEC e SCHWARZ, 2012).

O gene *mecC* foi identificado recentemente, e, até o momento, são poucos os isolados positivos para esse gene, no entanto, por já ter sido isolado em diferentes espécies animais e em humanos com contato com os animais, acredita-se que a *mecC* seja de origem animal (GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2011; PATERSON et al., 2012; PETERSEN et al., 2013). Fenotipicamente, o gene *mecC* é caracterizado por ser resistente a cefoxitina, porém sensível a

oxacilina, enquanto o gene *mecA* é resistente aos dois antimicrobianos (CARTWRIGHT et al., 2013; PATERSON et al., 2012).

A resistência a meticilina é o mecanismo de resistência antimicrobiana mais importante identificada em *Staphylococcus*, sendo ela caracterizada pela presença dos genes *mecA* e *mecC* carreados em uma “ilha genética” móvel chamada de “*Staphylococcal Cassette Chromosome mec*” (*SCCmec*) (KANIA et al., 2004). Os elementos *SCCmec* são capazes de abrigar sequencias de inserção, plasmídeos e transposons, conferindo resistência a outras classes de antimicrobianos (SHORE, COLEMAN, 2013).

Até o momento, 13 diferentes tipos de *SCCmec* e suas variações já foram identificados em *S. aureus* e *S. pseudintermedius* (IWG-SCC, 2009), sendo que vários estudos já identificaram gene *mecA* como parte dos elementos *SCCmec* de origem animal (WESE, 2010; FITZGERALD, 2012; PANTOSTI, 2012).

A primeira cepa fenotípica de MRSP foi isolada de cães saudáveis e cães com pioderma na França no final dos anos 80 (PELLERIN et al., 1998). Já a primeira identificação do gene *mecA* em cães, ocorreu nos Estados Unidos em 1999 (GORTEL et al., 1999) e, mais tarde, em 2005, na Europa (LOEFFLER et al., 2007). Desde então, isolados de MRSP vem sendo reportados em todo mundo em clínicas e hospitais veterinários, sendo reconhecidos como um patógeno de grande importância devido a multirresistência e a dificuldade no tratamento das infecções (SFACIOTTE et al., 2015; BANNOEHR e GUARDABASSI, 2012), em particular em casos de infecções hospitalares (KADLEC e SCHWARZ, 2012; PERRETTEN et al., 2010).

No início, os *Staphylococcus pseudintermedius* eram susceptíveis a maioria dos antimicrobianos, no entanto, a partir de 2006, MRSP surgiu como um patógeno resistente a quase todas as classes de antimicrobianos utilizadas em cães, dificultando a antibioticoterapia em pequenos animais (CAIN, 2013; VAN DUIJKEREN et al., 2011). Nos EUA, até o ano de 2008, a prevalência de MRSP era entre 15 – 17% (JONES et al., 2007), e depois aumentou para 30% (BEMIS et al., 2009). No Japão a prevalência de MRSP em cães com pioderma é de 66,7% (KAWAKAMI et al., 2010), enquanto que na Europa, por ter sido recentemente isolado, o numero de amostras clínicas ainda é baixo (RUSCHER et al., 2010; KJELLMAN et al., 2015).

Além de serem isolados em animais com algum tipo de infecção, os MRSP já foram isolados em cães e gatos sadios, principalmente em isolados de narina, mucosa oral e pele (GINGRICH et al., 2011; VANDERHAEGHEN et al., 2011), sendo encontrada uma prevalência de 1,5% a 10% (RUBIN e CHIRINO-TREJO, 2011; COUTO et al., 2011).

Esses dados são importantes, pois, apesar de raro, infecções humanas por MRSP já foram reportadas com suspeita de transmissão proveniente de cães (STEGMANN et al., 2010).

Já foram descritos também, colonizações nasais por MRSP em veterinários e proprietários de cães que já tiveram infecções por MRSP (LAARHOVEN et al., 2011; PAUL et al., 2011; SASAKI et al., 2007), além de contaminações ambientais (ISHIHARA et al., 2010).

O tratamento de isolados MRSP é um desafio na medicina veterinária, uma vez que os principais antimicrobianos utilizados para tratar esses micro-organismos multirresistentes são a vancomicina e a linezolida, porém seu uso é questionável devido ao uso desses antimicrobianos em humanos e o fato de poder levar a cepas resistentes a eles (PERRETTEN et al., 2010).

O *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA) é o principal problema de infecção hospitalar em humanos (WEESE, 2010), porém em cães sua prevalência é menor que o MRSP, enquanto que em gatos ainda há dúvidas qual dos dois é mais prevalente (FAZAKERLEY et al., 2009). Tanto cães como gatos saudáveis podem ser colonizados por MRSA (MORRIS et al., 2012; BENDER et al., 2012), porém ela é transitória e pode variar de 0% a 3% em cães e até 4% em gatos (BENDER et al., 2012; GINGRICH et al., 2011; COUTO et al., 2011).

O MRSA pode ser dividido em: comunitário (CA-MRSA), na sua grande maioria sensível a outras classes de antimicrobianos; e o hospitalar (HA-MRSA), resistente a maioria das classes de antimicrobianos, devido ao grande uso desse medicamento no ambiente hospitalar (KNIGHT et al., 2012; LEE et al., 2007; HIRAMATSU et al., 2001).

A incidência de HA-MRSA ao longo do mundo é variada, sendo maior que 70% na Ásia, próximo aos 50% nos EUA, América Latina e Portugal, próxima aos 20% na Europa, Austrália e África, e, menor que 5% na Dinamarca, Holanda, Suécia e Noruega (STEFANI et al., 2012).

Outras espécies de *Staphylococcus*, como *S. schleiferi* e SCN também já foram descritos com a presença do gene *mecA*, porém por serem menos comuns em causar algum tipo de infecção não se é dada tanta importância. Em um estudo realizado por Griffeth et al. (2008), foi encontrada uma prevalência de 2% de *S. schleiferi* meticilina resistente (MRSS) em cães sadios e com inflamação de pele, enquanto Abraham et al. (2007) não isolaram MRSS em gatos.

2.4 BETA LACTAMASE DE ESPECTRO ESTENDIDO

Um dos principais mecanismos de resistência encontrados nas bactérias da família das *Enterobacteriaceae* é a hidrólise do anel beta-lactâmico através de enzimas, conferindo resistência aos antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos, incluindo penicilinas,

cefalosporinas e monobactâmicos (ECDC, 2013; PFEIFER et al., 2010), porém não hidrolisam as cefamicinas e os carbapenêmicos, além de serem inativadas pelos inibidores de beta-lactamase (ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam) (LEE et al., 2012). Essas enzimas são chamadas de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), sendo dividida em três principais famílias, TEM, SHV e CTX-M (COQUE et al., 2008; BUSH e JACOBY, 2010).

Os genes que codificam ESBL estão localizados em plasmídeos conjugativos ou em integrons e podem ser transferidos para outras espécies de enterobactérias facilitando ainda mais sua propagação (CARATTOLI, 2013). Nas ultimas décadas, a resistência as cefalosporinas em grande parte do mundo é considerada uma grande ameaça em saúde pública (EFSA e ECDC, 2015; LEVERSTEIN-VAN HALL et al., 2011; WOODFORD et al., 2011), sendo frequentemente responsáveis por casos de infecções hospitalares e, até mesmo infecções comunitárias (BERGLUND 2015).

A primeira enzima conferindo resistência aos beta-lactâmicos foi do tipo TEM, isolada em 1965 na Grécia em uma paciente humana chamada Temoneira, cujo nome deu origem a enzima TEM. Essa primeira enzima, TEM-1, conferia resistência as penicilinas e a primeira geração de cefalosporinas, até que nos anos 80, variantes da TEM-1 com espectro estendido foram identificadas (PATERSON e BONOMO, 2005).

A segunda enzima identificada foi a SHV (sulfidrila variável), em 1979 (MATTHEW et al., 1979), que assim como a TEM, outras variantes já haviam sido descobertas em meados dos anos 80, ganhando ambas grandes destaque em *Enterobacteriaceae* resistentes a terceira geração de cefalosporinas (PITOUT, 2012), sendo que ate 2014, 216 variantes de TEM e 182 de SGV já foram identificadas (JACOBY e BUSH, 2014).

Atualmente, a ESBL mais comum é a enzima CTX-M encontrada principalmente em cepas de *E. coli* (BEVAN et al, 2017), sendo identificada pela primeira vez por Matsumoto e colaboradores (1988), no Japão, nas fezes de um cão de laboratório. As CTX-M são divididas em cinco grupos (1, 2, 8, 9 e 25) e até 2013 já foram descritas 150 variantes dessas famílias (JACOBY e BUSH, 2013; CANTON et al., 2012). A CTX-M-15 é uma das mais encontradas em humanos e animais (EWERS et al., 2012), sendo associada também a resistência a classe das fluorquinolonas e aminoglicosídeos (COQUE et al., 2008).

Animais de companhia, principalmente cães e gatos, são importantes fontes de transmissão de genes de resistência antimicrobiana devido ao seu contato direto com os humanos, sendo um grande risco para saúde pública (DE BRIYNE et al., 2014; HORDIJK et al., 2013), ainda mais depois de identificados diversos tipos de micro-organismos produtores de ESBL (EWERS et al., 2011; WOODFORD et al., 2011)

Na medicina veterinária, a primeira amostra clínica produtora de ESBL em animais de companhia foi uma *E. coli*, do tipo SHV-12, isolada de um cão com infecção do trato urinário na Espanha, em 1998 (TESHAGER et al., 2000), seguidas por amostras de cães na Itália e Portugal (FERIA et al., 2002; CARATTOLI et al., 2005). Diferentes variantes de CTX-M já foram isoladas em amostras clínicas de cães assim como as enzimas TEM (DIERIKX et al., 2012) e SHV (MARTINS et al., 2013).

Um dos principais estudos na detecção de ESBL em pequenos animais foi realizado na Alemanha, onde 2700 amostras foram analisadas, sendo detectados CTX-M (1, 2, 14 e 15), TEM-52 em isolados de *E. coli*, *Salmonella entérica*, *Proteus mirabilis* e *Enterobacte cloaceae* provenientes de feridas, infecções urinárias, respiratórias, abdominais e óssea (DIERIKX et al., 2012)

A maioria dos estudos realizados com pequenos animais na identificação de micro-organismos produtores de ESBL tem como alvo a *E. coli*, porém, essas enzimas já foram descritas em outras Enterobactérias, tais como: *Citrobacter* sp. (EWERS et al., 2011), *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp. (MA et al., 2009), *Pantoea agglomerans* (SFACIOTTE, 2016), *Serratia marcescens*, *Morganella morganii* e *Providencia* sp. (ZHAO e HU, 2013). Já foi identificado também ESBL em bactérias não pertencentes a família das *Enterobactérias*, como em *Pseudomonas aeruginosa* (SFACIOTTE, 2016), *Acinetobacter baumanii* (MANAGEIRO et al., 2012) e *Stenotrophomonas maltophilia* em humanos (NAIEMI et al., 2006)

Apesar de já identificados vários isolados ESBL em pequenos animais, os principais estudos estão focados em animais de produção, uma vez que a transferência dos genes de resistência entre alimentos de origem animal e os humanos já foram bastante descritos (SEIFFERT et al., 2013; TAMANG et al., 2013), porém a prevalência, principalmente da CTX-M em pequenos animais é limitada e necessita de maiores estudos (RUBIN e PITOUT, 2014).

Quando falamos em infecção hospitalar, as ESBL são uma das principais causadoras desse tipo de infecção em humanos, porém a prevalência desse tipo de micro-organismo ainda é pouco conhecida na veterinária e os casos de infecções hospitalares causadas por eles são mais escassos ainda.

2.5 CARBAPENEMASES

A resistência aos beta-lactâmicos em bacilos Gram negativos vem se tornando um problema emergente em todo mundo nos últimos anos, principalmente em casos de infecções hospitalares, levando ao aumento da mortalidade de pacientes e aumento dos custos com

hospitalizações (GENC, AKSU e GULCAN, 2016; ROBLEDO, AQUINO e VÁSQUEZ, 2011).

Os carbapenêmicos são antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos e são considerados a última escolha para tratamentos, usados inclusive em micro-organismos produtores de ESBL, sendo frequentemente utilizados para tratamento de infecções hospitalares humanas (SPELLBERG, 2011; WHO, 2011). Porém, já foram reportados isolados resistentes aos carbapenêmicos, principalmente os micro-organismos da família das Enterobacteriaceae (NORDMANN, NAAS e POIREL, 2011). Os mecanismos de resistência a esses antimicrobianos estão associados com a diminuição da permeabilidade de membrana, a super expressão de beta-lactamase ou a expressão de carbapenemases (THOMSON, 2010).

Vários tipos de carbapenemases já foram descritos em Enterobactérias, sendo as mais importantes clinicamente as: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), as carbapenemases zinco dependente, também conhecidas como metallo-beta-lactamase (Verona integron – VIM, imipenemase – IMP, New Delhi – NDM), as oxacilinases – 48 (OXA-48) (TZOUVELEKIS et al., 2012; NORDMANN, NAAS, POIREL, 2011) e uma cefalosporinase associada a perda de porina levando também a resistência aos beta-lactâmicos (AmpC) (NORDMANN et al., 2012).

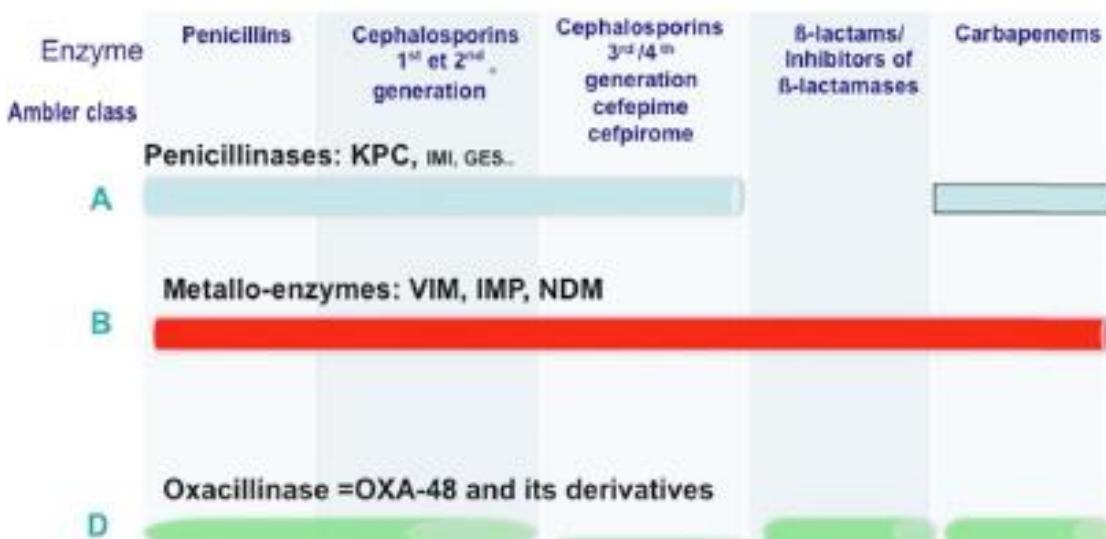
As beta-lactamasas são classificadas de acordo com vários critérios, sendo dois deles os critérios mais difundidos (1) de acordo com Ambler (1980) que classifica as beta-lactamasas de acordo com sua estrutura molecular enzimática em 4 grupos, onde as classes A, C e D são chamadas de serina-β-lactamase, as quais possuem o aminoácido serina no centro ativo da enzima; e a classe B, as quais são dependentes de zinco e então chamadas de metalo-β-lactamase, (2) já o segundo critério é de acordo com o perfil de inibição das β-lactamasas, conhecidos como grupo de Bush (NORDMANN, 2014; BUSH, JACOB e MEDEIROS, 1995). Atualmente, Bush e Jacob (2010), atualizaram o esquema de classificação de acordo com os dois critérios descritos, que estão representados na tabela 1 e figura 1.

Tabela 1: Classificação das principais beta-lactamases em bactérias Gram negativas

Grupo Bush-Jacob ⁱ	Classe Molecular ⁱⁱ	Enzimas representativas	Característica ⁱⁱⁱ	Substratos ^{iv}	Inibidores	
					Ácido clavulânico	EDTA
1; 1e	C	CMY-2; CMY-37	AmpC	Cfs	Não	Não
2be	A	TEM-3, SHV-2, CTX-M-2, 14, 15	ESBL	Oxiamino-Cfs e monobactans	Sim	Não
2bre	A	TEM-50	IRT-ESBL	Oxiamino-Cfs e monobactans	Não	Não
2de; 2df	D	OXA-11, 15; OXA-23, 48	ESBL; Carbapenemase	Oxiamino-Cfs e carbapenêmicos	Variável	Não
2f	A	GES-2, KPC-2, 3	Carbapenemases	Oxiamino-Cfs, cefamicinas, monobactans e carbapenêmicos	Variável	Não
3a	B (MBL)	SPM-1, IMP-1, VIM-1, NDM-1	Carbapenemases	Oxiamino-Cfs, cefamicinas e carbapenêmicos, mas não monobactans	Não	Sim

ⁱBush e Jacob (2010); ⁱⁱAmbler (1980); ⁱⁱⁱESBL (do inglês, Extended Spectrum β -Lactamase): β -lactamase de espectro estendido; IRT: TEM resistente a inibidor; MBL (Metalo- β -lactamases); ^{iv}Cfs: Cefalosporinas Oxiamino-Cfs: Cefalosporinas de amplo espectro; ^vEDTA (do inglês, *Ethylenediamine tetraacetic acid*): ácido etilenodiamino tetra-acético.

Figura 1: Espectro de ação das carbapenemases em Enterobacteriaceae.



Fonte: NORDMANN, 2014.

Apesar do nome, a enzima KPC não está restrita somente a *Klebsiella pneumoniae*, mas sim em todas as enterobactérias, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumanii*, pois é encontrada normalmente em plasmídeos e transposons, o que facilita sua disseminação (NORDMANN, 2014; CURIAO et al., 2010).

Em 1996 foi identificada a primeira KPC (KPC-1) localizada em plasmídeo, na Carolina do Norte, EUA (YIGIT et al., 2001). Após isso, a KPC plasmidial passou a ser isolada em vários países no mundo, tais como: China e Taiwan (CHUNG et al., 2011), Brasil (CHANG et al., 2013) e diferentes países da Europa (CANTON et al., 2012; BABOUEE et al., 2011; WENDT et al., 2010).

A primeira NDM (metalo-β-lactamase) descrita foi em um paciente sueco hospitalizado com infecção urinária após uma viagem para New Delhi, na Índia, em 2009. O micro-organismo em questão era uma *K. pneumoniae* resistente a quase todos os antimicrobianos, exceto tigeciclina e colistina (YONG et al., 2009). Autores britânicos determinaram que o grande reservatório dessas carbapenemases estejam localizados na Índia, Paquistão, Bangladesh e Sri-Lanka, através de um estudo onde eles isolaram NDM de bactérias encontradas na água consumida pela população e na água da chuva (WALSH et al., 2011).

Além de isoladas em casos de infecções hospitalares, as NDM já foram identificadas em amostras comunitárias, principalmente em *E. coli*, em casos de infecção urinária e diarreia, o que torna cada vez mais difícil o controle desse mecanismo de multirresistência, uma vez que controlar esses micro-organismos no hospital é possível, mas na comunidade é quase impossível (POIREL et al., 2011). No Brasil, as principais metalo-β-lactamase são a NDM e SPM (São Paulo metalo-β-lactamase) (TOLEMAN et al., 2002).

A carbapenemase OXA é derivada de genes de ESBL e está localizada em integrons, transposons e/ou sequências de inserção albergados em plasmídeos (WALTHER-RASMUSSEN e HOIBY, 2007). A identificação da OXA-48 é relativamente recente, e assim como outras carbapenemases já foi descrita em diferentes gêneros bacterianos da família *Enterobacteriaceae* e responsável por vários casos de infecção hospitalar (POIREL, BONNIN e NORDMANN, 2012).

Apesar de não ser considerada uma carbapenemase, os micro-organismos com a presença da enzima *ampC* são considerados hiperprodutores de beta-lactamase, porém, a presença dessa enzima confere resistência aos carbapenêmicos quando associada com sistema de efluxo ou alteração na permeabilidade da membrana externa (LIVERMORE; WOODFORD, 2006). As principais *ampC* com resistência aos carbapenêmicos são a CTM-Y e a FOX (JACOB, 2009).

Assim, o número de enzimas responsáveis por conferir resistência aos carbapenêmicos já identificadas é muito grande e há vários estudos isolando essas enzimas em casos de infecções em humanos, porém na medicina veterinária, esses dados são pouco conhecidos, tendo os primeiros relatos em animais de produção e mais recentemente em pequenos animais (EFSA, 2013; FISCHER et al., 2013; STOLLE et al., 2013).

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, J.L.; MORRIS, D.O.; GRIFFETH, G.C.; et al. Surveillance of healthy cats and cats with inflammatory skin disease for colonization of the skin by methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* ssp. *schleiferi*. **Vet Dermatol.**, v.18, p.252–259, 2007.
- AMBLER, R.P. The structure of beta-lactamase. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 289, p. 321-331, 1980.
- ARAUJO, C.; TORRES, C.; GONCALVES, A.; et al. Genetic detection and multilocus sequence typing of vanA-containing Enterococcus strains from mullets fish (*Liza ramada*). **Microb. Drug Resist.**, v.17, p.357–361, 2011.
- ARIAS, C. A.; PANESSO, D.; MCGRATH, D. M.; et al. Genetic basis for in vivo daptomycin resistance in enterococci. **New England Journal of Medicine**, Boston, v.365, p.892-900, 2011.
- ARIAS, C.A.; MURRAY, B.E. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v.10, p.266-278, 2012.
- BABOUEE, B.; WIDMER, A.F.; DUBUIS, O.; et al. Emergence of four cases of KPC-2 and KPC-3-carrying *Klebsiella pneumoniae* introduced to Switzerland, 2009-10. **Euro Surveill**, v.16, n.11, [PII:19817], 2011.
- BANNOEHR, J.; GUARDABASSI, L. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. **Vet. Dermatol.**, v.23, p.253–269, 2012.
- BATES, J. Epidemiology of vancomycin-resistant enterococci in the community and the relevance of farm animals to human infection. **J Hosp Infect.**, v.37, n.2, p.89-101, 1997.
- BEACHES ACHT - Beaches Environmental Assessment and Costal Health Act of 2000. (PL 106-284, 10 October 2000). **United States Statutes at Large**, v.114, p.870–877, 2000.
- BEMIS, D.A.; JONES, R.D.; FRANK, L.A.; et al. Evaluation of susceptibility test breakpoints used to predict *mecA*-mediated resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs. **J Vet Diagn Invest.**, v.21:p.53–58, 2009.

BEN BELGACEM, Z.; ABRIOUEL, H.; BEN OMAR, N.; et al. Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic Enterococcus faecium from artesanal Tunisian fermented meat. **Journal of Food Protection**, v.21, p.462-470, 2010.

BENDER, J.B.; SCHIFFMAN, E.; HIBER, L.; et al. Recovery of staphylococci from computer keyboards in a veterinary medical centre and the effect of routine cleaning. **Vet Record.**, v.170, n.16, p.414–416, 2012.

BENDER, J.B.; WATERS, K.C.; NERBY, J.; et al. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) isolated from pets living in households with MRSA-infected children [letter to the editor]. **Clin Infect Dis.**, v.54, p.449–450, 2012.

BENEDICT, K.M.; MORLEY, P.S.; VAN METRE, D.C. Characteristics of biosecurity and infection control programs at veterinary teaching hospitals. **J Am Vet Med Assoc**, v.233, n.5, p.767–73, 2008.

BERGLUND, B. Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. **Infect. Ecol. Epidemiol.** v.5, p.28564, 2015.

BEVAN, E. R.; JONES, A. M.; HAWKEY, P.M. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. **J Antimicrob Chemother** v.72, p.2145-2155, 2017.

BISWAS, P. P.; DEY, S.; ADHIKARI, L.; et al. Virulence markers of vancomycin resistant enterococci isolated from infected and colonized patients. **Journal of Global Infectious Diseases**, v.6, p.157-163, 2014.

BOND, R.; LOEFFLER, A. What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. **Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v.53, n.3, p.147-154, 2012.

BORTOLAIA, V.; HANSEN, K.H.; NIELSEN, C.A.; et al. High diversity of plasmids harbouring blaCMY-2 among clinical Escherichia coli isolates from humans and companion animals in the upper Midwestern USA. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.69, p.1492–1496, 2014.

BREATHNACH, A. Nosocomial infections and infection control. **Medicine**, v.41, n.11, p.649-653, 2013.

BUSH, K.; JACOB, G.A. Updated Functional Classification of β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, n.3, p.969–976, 2010.

BUSH, K.; JACOB, 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.

CAIN, C.L. Antimicrobial Resistance in Staphylococci in Small Animals. **Vet Clin Small Anim.**, v.43, p.19–40, 2013.

- CANTÓN, R.; AKÓVA, M.; CARMELI, Y.; et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. **Clin Microbiol Infect.**, v.18, p.413–31, 2012.
- CANTON, R.; GONZALEZ-ALBA, J.M.; GALAN, J.C. CTX-M enzymes: origin and diffusion. **Front. Microbiol.**, v.3, p.110, 2012
- CARATTOLI, A. Plasmids and the spread of resistance. **Int. J. Med. Microbiol.**, v.303, p.298–304, 2013.
- CARATTOLI, A.; LOVARI, S.; FRANCO, A.; et al. Extended-spectrum beta-lactamases in Escherichia coli isolated from dogs and cats in Rome Italy, from 2001 to 2003. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.49, p. 833–835, 2005.
- CARTWRIGHT, E.J.P.; PATERSON, G.K.; RAVEN, K.E.; et al. Use of Vitek 2 antimicrobial susceptibility profile to identify mecC in methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v.51, n.8, p.2732- 2734, 2013.
- CASTELLANO-GONZALEZ, M. J.; PEROZO-MENA, A. J.; VIVAS-VEJA, R. L.; et al. Molecular and phenotypical typification of methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) strains in a university hospital. **Revista Chilena de Infectología**, Santiago, v.26, n.1, p.39-48, 2009.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Vital signs: carbapenemresistant Enterobacteriaceae. **Morb Mortal Wkly Rep.**, v.62, n.9, p.165–70, 2013
- CHANG, M.R.; BIBERG, C.A.; LOPES, F.A.; et al. The first report of infection with Klebsiella pneumoniae carrying the bla kpc gene in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.**, v.46, p.114–5, 2013.
- CHUNG, K.P.; TSENG, S.P.; HUANG, Y.T.; et al. Arrival of Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)-2 in Taiwan. **J Antimicrob Chemother**, v.66, p.1182–4, 2011.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals; approved standard. 3th ed. M31-A3. Wayne: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2008. v.28, n.8, 103 p.
- COQUE, T.M.; NOVAIS, A.; CARATTOLI, A.; et al. Dissemination of clonally related Escherichia coli strains expressing extended-spectrum -lactamase CTX-M-15. **Emerg. Infect. Dis.**, v.14, p.195–200, 2008.
- COUTO, N.; POMBA, C.; MOODLEY, A.; et al. Prevalence of methicillin-resistant staphylococci among dogs and cats at a veterinary teaching hospital in Portugal. **Vet Rec.**, v.169, n.3, p.169:172, 2011.

CURIAO, T.; MOROSINI, M.I.; RUIZ-GARBAJOSA, P.; et al. Emergence of blaKPC-3-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 Klebsiella pneumoniae clones in Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.65, n.8, p.1608-1614, 2010.

DALLAP, S.B.L.; ACETO, H.; RANKIN, S.C. Outbreak of salmonellosis caused by *Salmonella enterica* serovar Newport MDR-AmpC in a large animal veterinary teaching hospital. **J. Vet. Intern. Med.**, v.24, n.1138–1146, 2010.

DE BRIYNE, N.; ATKINSON, J.; POKLUDOVA, L.; et al. Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. **Vet. Rec.**, v.175, p. 325, 2014.

DEVRIESE, L. A.; VANCANNEYT, M.; BAELE, M.; et al. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, n.4, p.1569-1573, 2005.

DIERIKX, C.M.; VAN DUIJKEREN, E.; SCHOORMANS, A.H.W.; et al. Occurrence and characteristics of extended-spectrum-β-lactamase and AmpC producing clinical isolates derived from companion animals and horses. **J Antimicrob Chemother.**, v.67, p.1368–1374, 2012.

ECDC, 2018. Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe 2017 Annual report of the European Antimicrobial resistance Surveillance Network (EARS-net) 2017 (Stockholm, ECDC).

ECKERT, C.; GAUTIER, V.; SALADIN-ALLARD, M.; et al. Dissemination of CTX-M-type beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Paris, France. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.48, p.1249–1255, 2004

EFSA, 2013. Scientific Opinion on Carbapenem resistance in food animal ecosystems. EFSA J. 11.

EFSA, ECDC, 2015. EU Summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. EFSA J.13,1–178, 2015

EKIRI, A.B.; MORTON, A.J.; LONG, M.T.; et al. Review of the epidemiology of and infection control aspects of nosocomial *Salmonella* infections in hospitalized horses. **Equine Vet Educ.**, v.22, n.12, p.631–41, 2010.

ESPINOSA-GONGORA, C.; SHAH, S.Q.A.; JESSEN, L.R.; et al. Quantitative assessment of faecal shedding of b-lactam-resistant *Escherichia coli* and enterococci in dogs. **Veterinary Microbiology**, v.181, p.298–302, 2015.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL - ECDC. Annual epidemiological report Reporting on lligence data. Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe. Stockholm: ECDC, 2011. 227 p.

EWERS, C.; BETHE, A.; WIELER, L.H.; et al. Companion animals: a relevant source of extended-spectrum beta-lactamase-producing fluoroquinolone-resistant *Citrobacter freundii*. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.37, p.86–87, 2011

FAZAKERLEY, J.; NUTTALL, T.; SALES, D.; et al. Staphylococcal colonization of mucosal and lesional skin sites in atopic and healthy dogs. **Vet Dermatol.**, v.20, p.179–84, 2009.

FERIA, C.; FERREIRA, E.; CORREIA, J.D.; et al. Patterns and mechanisms of resistance to beta-lactams and beta-lactamase inhibitors in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs in Portugal. **J. Antimicrob. Chemother.** v.49, p.77–85, 2002.

FISCHER, J.; RODRIGUEZ, I.; SCHMOGER, S.; et al. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* producing VIM-1 carbapenemase isolated from livestock farms. **J. Antimicrob. Chemother.** v.68, p.478–480, 2013.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology, Washington**, v.155, n.6, p.1749-1757, 2009.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. **Microbiology, Washington**, v.155, n.6, p.1749-1757, 2009.

FITZGERALD, J.R. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: origin, evolution and public health threat. **Trends Microbiol.**, v.20, p.192–198, 2012.

GARCIA-ALVAREZ, L.; WEBB, C.R.; HOLMES, M.A. A novel field-based approach to validate the use of network models for disease spread between dairy herds. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v.139, n.12, p.1863-1874, 2011.

GENC, O.; AKSU, E.; GULCAN, A. The identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae by using molecular assay and phenotyping confirmation tests. **Journal of Microbiological Methods**, v.125, p. 8–11, 2016.

GETACHEW, Y.; HASSAN, L.; ZAKARIA, Z.; et al. Genetic variability of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from humans chickens, and pigs in Malaysia. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.79, p.4528–4533, 2013.

GHOSH, A.; DOWD, S.E.; ZUREK, L. Dogs Leaving the ICU Carry a Very Large Multi-Drug Resistant Enterococcal Population with Capacity for Biofilm Formation and Horizontal Gene Transfer. **PLoS ONE**, v.6, n.7, p.22451, 2011.

GHOSH, A.; KUKANICH, K.S.; BROWN, C.E.; et al. Resident cats in small animal veterinary hospitals carry multidrug resistant enterococci and are likely involved in crosscontamination of the hospital environment. **Frontiers in Microbiol.**, v.3, p.1–14, 2012.

GILMORE, M.S.; CLEWELL, B.; IKE, Y.; et al. Enterococci from commensals to leading causes of drug resistant infection. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary, 2014.

GINGRICH, E.N.; KURT, T.; HYATT, D.R.; et al. Prevalence of methicillin-resistant staphylococci in northern Colorado shelter animals. **J Vet Diagn Invest.**, v.23, p.947–950, 2011.

GIRLING, S.J.; FRASER, M.A. Bacterial carriage of computer keyboards in veterinary practices in Scotland. **Vet Record.**, v.165, n.1, p.26–7, 2009.

GÓMEZ-SANZ, E.; TORRES, C.; LOZANO, C.; et al. Detection and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in healthy dogs in La Rioja, Spain. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect.**, v.34, p.447–453, 2011.

GORTEL, K.; CAMPBELL, K.L.; KAKOMA, I.; et al. Methicillin resistance among staphylococci isolated from dogs. **Am. J. Vet. Res.**, v.60, p.1526–1530, 1999.

GRIFFETH, G.C.; MORRIS, D.O.; ABRAHAM, J.L.; et al. Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. **Vet Dermatol.**, v.19, p.142–149, 2008.

GRONTHAL, T.; EKLUND, M.; THOMSON, K., et al. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and the molecular epidemiology of methicillin-resistant *S. pseudintermedius* in small animals in Finland. **J Antimicrob Chemother.** v.72, p.1021-1030, 2017.

HIDRON, A.I.; EDWARDS, J.R.; PATEL, J.; et al. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. **Infection Control and Hospital Epidemiology, Thorofare**, v.29, n.11, p.996-1011, 2008.

HIRAMATSU, K. Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. **The Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 1, n. 3, p. 147-155, 2001.

HOLLENBECK, B.L.; RICE, L.B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. **Virulence**, v.3, p.421-433, 2012.

HORDIJK, J.; SCHORMANS, A.; KWAKERNAAK, M.; et al. High prevalence of fecal carriage of extended spectrum -lactamase/AmpC-producing Enterobacteriaceae in cats and dogs, **Front Microbiol.**, v.4, p.242, 2013.

Infectious Diseases Society of America; SPELLBERG, B.; BLASER, M.; GUIDOS, R.J.; et al. Combating antimicrobial resistance: policy recommendations to save lives. **Clin Infect Dis.**, v.52, Suppl. 5, p.397–428, 2011.

INTERNATIONAL WORKING GROUP ON THE CLASSIFICATION OF STAPHYLOCOCCAL CASSETTE CHROMOSOME ELEMENTS - IWG-SCC. Classification of staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec): guidelines for reporting novel SCCmec elements. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.53, n.12, p.4961-4967, 2009.

ISHIHARA, K.; SHIMOKUBO, N.; SAKAGAMI, A.; et al. Occurrence of molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in an academic veterinary hospital. **Appl Environ Microbiol.**, v.76, p.5165-5174, 2010.

IVERSEN, A.; KUHN, I.; FRANKLIN, A.; et al. High prevalence of vancomycin-resistant enterococci in Swedish sewage. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.68, p.2838–2842, 2012.

JACOB, G.A. AmpC β -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.22, n.1. p.161–182, 2009.

JACOBY, G.; BUSH, K. B-lactamase classification and amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant enzymes (Lahey Clinic), 2014

JACOBY, G.A.; BUSH, K. 2013. Beta-lactamase classification and amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant enzymes, 2013

JONES, R.D.; KANIA, S.A.; ROHRBACH, B.W.; et al. Prevalence of oxacillin- and multidrugresistant staphylococci in clinical samples from dogs: 1,772 samples (2001- 2005). **J Am Vet Med Assoc.**, n.230, p.221–7, 2007.

KADLEC, K.; SCHWARZ, S. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius*. **Vet. Dermatol.**, v.23, p.276–282, 2012.

KANIA, S.A.; WILLIAMSON, N.L.; FRANK, L.A.; et al. Methicillin resistance of staphylococci isolated from the skin of dogs with pyoderma. **Am J Vet Res.**, v.65, p.1265–1268, 2004.

KAWAKAMI, T.; SHIBATA, S.; MURAYAMA, N.; et al. Antimicrobial susceptibility and methicillin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolated from dogs with pyoderma in Japan. **J Vet Med Sci.**, v.72, p.1615–1619, 2010.

KHAN, H.A.; AHMA, A.; MEHBOOB, R. Nosocomial infections and their control strategies. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.5, p.509-514, 2015.

KJELLMAN, E. E.; SLETTEMEAS, J. S.; SMALL, H., et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) from healthy dogs in Norway – occurrence, genotypes and comparison to clinical MRSP. **Microbiology open**, v.4, n.6, p.857-866, 2015.

KNIGHT, G.M.; BUDD, E.L.; WHITNEY, L.; et al. Shift in dominant hospital-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (HA-MRSA) clones over time. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.67, p.2514–2522, 2012.

KRAMER, A.; SCHWEBKE, I.; KAMPF, G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. **BMC Infectious Diseases, Boston**, v.6, n.130, p.1-8, 2006.

LAARHOVEN, L.M.; DE HEUS, P.; VAN LUIJN J.; et al. Longitudinal study on methicillinresistant *Staphylococcus pseudintermedius* in households. **PLoS One**, v.6, p.27788, 2011.

LEAVIS, H.L.; BONTEN, M.J.; WILLEMS, R.J. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. **Current Opinion in Microbiology**, v.9, p.454-460, 2006.

LEBRETON, F.; DEPARDIEU, F.; BOURDON, N.; et al. D-Alad- Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.55, n.10, p.4606-4612, 2011.

LEE, J.H.; BAE, I.K.; LEE, S.H.; New definitions of extended-spectrum beta-lactamase conferring worldwide emerging antibiotic resistance. **Med. Res. Ver.**, v.32, p.216–232, 2012.

LEE, S.M.; ENDER, M.; ADHIKARI, R.; et al. Fitness cost of staphylococcal cassette chromosome mec in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by way of continuous culture. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.51, p.1497–1499, 2007.

LEVERSTEIN-VAN HALL, M.A.; DIERIKX, C.M.; COHEN STUART, J.; et al. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.17, p.873–880, 2011.

LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **Trends in Microbiology**, v.14, n 9, p.413-420, 2006.

LOEFFLER, A.; LINEK, M.; MOODLEY, A.; et al. First report of multiresistant, *mecA*positive *Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 cases from a veterinary dermatology referral clinic in Germany. **Vet. Dermatol.**, v.18, p.412–421, 2007.

LOPEZ, M.; SAENZ, Y.; ROJO-BEZARES B.; et al. Detection of vanA and vanB2-containing enterococci from food samples in Spain, including *Enterococcus faecium* strains of CC17 and the new singleton ST425. **Int J Food Microbiol.**, v.133, p.172–178, 2009.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v.111, n.9, p.1265-1273, 2003.

LOZANO, C.; GONZALEZ-BARRIO, D.; CAMACHO, M.C.; et al. Characterization of faecal vancomycin-resistant enterococci with acquired and intrinsic resistance mechanisms in wild animals, Spain. **Environ. Microbiol.**, p.1-8, 2015.

MA, J.; ZENG, Z.; CHEN, Z.; et al. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6')*-Ib-cr, and *qepA* among ceftiofur-resistant Enterobacteriaceae isolates from companion and food-producing animals. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.53, p.519–524, 2009.

MAGILL, S.S.; EDWARDS, J.R.; BAMBERG, W. et al. Multistate point-prevalence survey of health care-associated infections. **N Engl J Med.**, v.370, p.1198–208, 2014.

MALACHOWA, N.; DELEO, F.R.; Mobile genetic elements of *Staphylococcus aureus*. **Cell. Mol. Life Sci.**, v.67, p.3057–3071, 2010.

MALIK, S.; CHRISTENSEN, H.; PENG, H.; et al. Presence and diversity of the beta-lactamase gene in cat and dog staphylococci. **Vet. Microbiol.**, v.123, p.162–168, 2007.

MANAGEIRO, V.; JONES-DIAS, D.; FERREIRA, E.; et al. Genetic diversity and clonal evolution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Portugal and the dissemination of ST118. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v.40, p.398–403, 2012.

MARCADE, G.; MICOL, J.B.; JACQUIER, H.; et al. Outbreak in a haematology unit involving an unusual strain of glycopeptideresistant *Enterococcus faecium* carrying both vanA and vanB genes. **J Antimicrob Chemother.**, v.69, n.2, p.500-505, 2014.

MARTINS, L.R.L.; PINA, S.M.R.; SIMÕES, R.L.R.; et al. Common phenotypic and genotypic antimicrobial resistance patterns found in a case study of multiresistant *E. coli* from cohabitant pets, humans, and household surfaces. **J Environ Health.**, v.75, p.74–81, 2013.

MATSUMOTO, Y.; IKEDA, F.; KAMIMURA, T.; et al. Novel plasmid-mediated -lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyiminocephalosporins. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.32, p.1243–1246, 1988.

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

MedVetNet Workpackage 9 Genetic Characterisation for Strains with Beta-lactamase Activity (2006) www.medvetnet.org/pdf/Reports/Appendix_2_Workpackage_9.doc

MORRIS, D.O.; LAUTENBACH, E.; ZAOUTIS, T.; et al. Potential for pet animals to harbour methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* when residing with human MRSA patients. **Zoonoses Public Health**, v.59, p.286–293, 2012.

MULVEY, M.R.; SOULE, G.; BOYD, D.; ET al. Characterization of the first extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella* isolate identified in Canada **J. Clin. Microbiol.**, v.41, p.460–462, 2003

NAIEMI, N.; DUIM, B.; BART, A. A CTX-M extended-spectrum -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. **J. Med. Microbiol.**, v.55, p.1607–1608, 2006.

NORDMANN, P. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Overview of a major public health challenge. **Médecine et maladies infectieuses**, v.44, p.51–56, 2014.

NORDMANN, P.; GNIADKOWSKI, M.; GISKE, C.G.; et al. Identification and screening of carbapenemaseproducing Enterobacteriaceae. **Clin Microbiol Infect.**, v.18, p.432–38, 2012

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Emerg. Infect. Dis.**, v.17, p.1791–1798, 2011.

O'DRISCOLL, T.; CRANK, C.W. Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology clinical manifestations, and optimal management. **Infect. Drug Resist.**, v.8, p.217–230, 2015.

OGEER-GYLES, J.S.; MATHEWS, K.A.; BOERLIN P. Nosocomial infections and antimicrobial resistance in critical care medicine. **J. Vet. Crit. Care.** v.16, p.1-18, 2006.

OLESEN, H.; HASMAN, F.M. Aarestrup Prevalence of beta-lactamases among ampicillin-resistant Escherichia coli and Salmonella isolated from food animals in Denmark **Microb. Drug Resist.**, v.10, p.334–340, 2004.

OLIVEIRA, A. C; CARDOSO, C. S; MASCARENHAS, D. Precauções de contato em Unidade de Terapia Intensiva: fatores facilitadores e dificultadores para adesão dos profissionais. **Rev Esc Enferm USP** vol.44, n.1, p.161-165, 2010.

OLSEN, R. H.; SCHØNHEYDER, H. C.; CHRISTENSEN, H.; et al. Enterococcus faecalis of human and poultry origin share virulence genes supporting the zoonotic potential of E. faecalis. **Zoonoses and Public Health**, v.59, p.256-263, 2012.

ORAVCOVA, V.; GHOSH, A.; ZUREK, L.; et al. Vancomycin-resistant enterococci in rook (*Corvus frugilegus*) wintering throughout Europe. **Environ. Microbiol.**, v.15, p.548–556, 2013.

PANTOSTI, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* associated with animals and its relevance to human health. **Front. Microbiol.**, v.3, p.127, 2012.

PATERSON, D.L.; BONOMO, R.A. Extended-spectrum -lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Reviews** 18, 657–686, 2005.

PATERSON, G.K.; LARSEN, A.R.; ROBB, A.; et al. The newly described *mecA* homologue, *mecA(LGA251)*, is present in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a diverse range of host species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v.67, n.12, p.2809-2813, 2012.

PAUL, N.C.; MOODLEY, A.; GHIBAUDO, G.; et al. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in small animal veterinarians: indirect evidence of zoonotic transmission. **Zoonoses Public Health**, v.58, p.533–539, 2011.

PELLERIN, J.L.; BOURDEAU, P.; SEBBAG, H.; et al. Epidemiosurveillance of antimicrobial compound resistance of *Staphylococcus intermedius* clinical isolates from canine pyodermas. **Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.**, v.21, p.115–133, 1988.

PELLIGAND, L.; HAMMOND, R.; RYCROFT, A. An investigation of the bacterial contamination of small animal breathing systems during routine use. **Vet. Anaesthet. Analg.**, v.34, p.190-199, 2007.

- PERRETEREN, V.; KADLEC, K.; SCHWARZ, S.; et al. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.65, p.1145–1154, 2010.
- PETERSEN, A.; STEGGER, M.; HELTBERG, O.; et al. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying the novel *mecC* gene in Denmark corroborates a zoonotic reservoir with transmission to humans. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.19, n.1, p.16–22.
- PFEIFER, Y.. CULLIK, A.; WITTE, W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. **Int. J. Med. Microbiol.**, v.300, p.371–379, 2010.
- PITOUT, J.D. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: an update on antimicrobial resistance, laboratory diagnosis and treatment. **Expert Rev. Anti Infect. Ther.**, v.10, p.1165–1176, 2012.
- POETA, P.; COSTA, D.; RODRIGUES, J.; et al. Study of faecal colonization by vanA-containing *Enterococcus* strains in healthy humans, pets, poultry and wild animals in Portugal. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.55, p.278–280, 2005.
- POIREL, L.; BENOUDA, A.; HAYS, C.; et al. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Morocco. **J Antimicrob Chemother**, v.66, p.2781–3, 2011.
- POIREL, L.; BONNIN, R.A.; NORDMANN, P. Analysis of the resistome of a multidrugresistant NDM-1-producing *Escherichia coli* strain by high-throughput genome sequencing. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.55, p.4224–9, 2011.
- RICE, L.B. The complex dynamics of antimicrobial activity in the human gastrointestinal tract. **Trans Am Clin Climatol Assoc.**, v.124, p.123-132, 2013.
- ROBERTS, M.C.; SOGE, O.O.; GIARDINO, M.A.; et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. in environments from the West Coast of the USA. **J. Appl. Microbiol.**, v.107, p.300–307, 2009.
- ROBLEDO, I.E.; AQUINO, E.E.; VAZQUEZ, G.J. Detection of the KPC gene in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* during a PCR-based nosocomial surveillance study in Puerto Rico. **Antimicrob Agents Chemother**, v.55, p.2968–70, 2011.
- RUBIN, J.E.; CHIRINO-TREJO, M. Prevalence, sites of colonization, and antimicrobial resistance among *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from healthy dogs in Saskatoon, Canada. **J Vet Diagn Invest.**, v.23, p.351–354, 2011.
- RUBIN, J.E.; PITOUT, J.D.D. Extended-spectrum b-lactamase, carbapenemase and AmpC producing Enterobacteriaceae in companion animals. **Veterinary Microbiology**, v.170, p.10–18, 2014.

RUPLE-CZERNIAK, A.; ACETO, H.W.; BENDER, J.B.; et al. Syndromic surveillance for evaluating the occurrence of healthcare-associated infections in equine hospitals. **Equine Vet J.**, v.46, n.4, p.435–40, 2014.

RUPLE-CZERNIAK, A.; ACETO, H.W.; BENDER, J.B.; et al. Using syndromic surveillance to estimate baseline rates for healthcare-associated infections in critical care units of small animal referral hospitals. **J Vet Intern Med**, v.27, n.6, p.1392–9, 2013

RUSCHER, C.; LUBKE-BECKER, A.; SEMMLER, T.; et al. Widespread rapid emergence of a distinct methicillin- and multidrug-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) genetic lineage in Europe. **Vet Microbiol.**, v.144, p.340–346, 2010.

SANTOS, W.G.; DINIZ, R.C.; CARVALHO, I.A.; FREITAS, P.M.C.F. Infecção hospitalar em medicina veterinária. **Revta Vet. Zootec. Minas**, v.21, p.10-15, 2012.

SASAKI, T.; KIKUCKI, K.; TANAKA, Y.; et al. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. **J Clin Microbiol.**, v.45, p.2770–2778, 2007.

SCHEFTEL, J.M.; ELCHOS, B.L.; CHERRY, B.; et al. Compendium of veterinary standard precautions for zoonotic disease prevention in veterinary personnel: National Association of State Public Health Veterinarians Veterinary Infection Control Committee. **J Am Vet Med Assoc.**, v.237, n.12, p.1403–22, 2010.

SCOTT, R.D. The direct medical costs of healthcare-associated infections in U.S. hospitals and the benefits of prevention. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention; Division of Healthcare Quality Promotion; 2009.

SEIFFERT, S.N.; HILTY, M.; PERRETER, V.; et al. Extended-spectrum cephalosporin-resistant gram-negative organisms in livestock: an emerging problem for human health? **Drug Resist. Updates**, v.16, p.22–45, 2013

SFACIOTTE, R. A. P.; CORONEL, L. G.; OSAKI, S. C.; Gram-positive bacterial resistant strains of interest in animal and public health. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.36, n.4, p.2693-2712, 2015.

SHEPARD, B.D.; GILMORE, M.S. Differential expression of virulence-related genes in *Enterococcus faecalis* in response to biological cues in serum and urine. **Infection and Immunity**, v.70, p.4344–4352, 2002.

SHORE, A.C.; COLEMAN, D.C. Staphylococcal cassette chromosome *mec*: Recent advances and new insights. **International Journal of Medical Microbiology**, v.303, 350– 359, 2013.

SIEVERT, D.M.; RICKS, P.; EDWARDS, J.R.; et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v.34, n.1, p.1–14, 20, 2013.

- SLETVOLD, H.; JOHNSEN, P.J.; WIKMARK, O.G.; et al. Tn1546 is part of a larger plasmid-encoded genetic unit horizontally disseminated among clonal *Enterococcus faecium* lineages. **J Antimicrob Chemother.**, v.65, p.1894–1906, 2010.
- STEFANI, S.; CHUNG, D.R.; LINDSAY, J.A.; et al. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology and harmonisation of typing methods. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v.39, p.273–282, 2012.
- STEGMANN, R.; BURNENS, A.; MARANTA, C.A.; et al. Human infection associated with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.65, p.2047–2048, 2010.
- STOLLE, I.; PRENGER-BERNINGHOFF, E.; STAMM, I.; et al. Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* in dogs. **J. Antimicrob. Chemother.** v.68, p.2802–2808, 2013.
- STULL, J.W.; WEESE, J.S. Hospital-Associated Infections in Small Animal Practice. **Vet Clin Small Anim.**, v.45, p.217–233, 2015.
- TAMANG, M.D.; NAM, H.M.; KIM, S.R.; et al. Prevalence and molecular characterization of CTX-M beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from healthy swine and cattle. **Foodborne Pathog. Dis.**, v.10, p.13–20, 2013.
- TESHAGER, T.; DOMINGUEZ, L.; MORENO, M.A.; et al. Isolation of an SHV-12 beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strain from a dog with recurrent urinary tract infections. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.44, p.3483–3484, 2000
- THOMSON, K.S. Extended-spectrum β-lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. **J Clin Microbiol.**, v.48, p.1019–25, 2010.
- TOLEMAN, M.A.; SIMM, A.M.; MURPHY, T.A.; et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-β-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.50, p.673–679, 2002.
- TORRES, C.; TENORIO, C.; PORTILLO, A.; et al. Intestinal colonization by vanA- or vanB2-containing enterococcal isolates of healthy animals in Spain. **Microb. Drug Resist.**, v.9, p.47–52, 2003.
- TZOUVELEKIS, L.S.; MARKOGIANNAKIS, A.; PSICHOGIOU, M.; et al. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.25, n.4, p.682–707, 2012.
- VAN DUIKEREN, E.; KAMPHUIS, M.; VAN der MIJE, I.C.; et al. Transmission of methicillinresistant *Staphylococcus pseudintermedius* between infected dogs and cats and contact pets, humans and the environment in households and veterinary clinics. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.150, n.3-4, p.338-343, 2011.

VANDERHAEGHEN, W.; VAN DE VELDE, E.; CROMBE, F.; et al. Screening for methicillinresistant staphylococci in dogs admitted to a veterinary teaching hospital. **Res Vet Sci.**, v.93, n.1, p.133–136, 2011.

WALSH, T.R.; WEEKS, J.; LIVERMORE, D.M.; et al. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. **Lancet Infect Dis**, v.11, p.355–62, 2011.

WALTHER-RASMUSSEN, J.; HØIBY, N. Class A carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.60, p.470–482, 2007.

WEESE, J.S. Monitoring for surgical infection, p.170-179. In: TOBIAS, K.M.; JOHNSTON, S.A. (Eds), **Veterinary Surgery, Small Animals**. Elsevier Saunders, Missouri, 2012.

WEESE, J.S.; VAN DUIKEREN, E. Methicillinresistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v.140, n.3-4, p.418-429, 2010.

WENDT, C.; SCHÜTT, S.; DALPKE, A.H.; et al. First outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)- producing *K. pneumoniae* in Germany. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.29, p.563–70, 2010.

WERNER, G.; GFRÖRER, S.; FLEIGE, C.; et al. Tigecycline-resistant *Enterococcus faecalis* strain isolated from a German ICU patient. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 61, n.5, p. 1182-1183, 2008.

WHO, 2011. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data 3rd Revision, 2011.

WOODFORD, N.; TURTON, J.F.; LIVERMORE, D.M. Multiresistant gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.35, p.736–755, 2011.

WOODFORD, N.; TURTON, J.F.; LIVERMORE, D.M.; Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. **FEMS Microbiol. Rev.** v.35, p.736–755, 2011.

YIGIT, H.; QUEENAN, A.M.; ANDERSON, G.J.; et al. Novel carbapenemhydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.1151– 1161, 2001.

YILMAZ, E. S.; ASLANTAS, O.; ONEN, S. P.; et al. Prevalence, antimicrobial resistance and virulence traits in enterococci from food of animal origin in Turkey. **LWT - Food Science and Technology**, v.66, p.20-26, 2016.

YONG, D.; TOLEMAN, M.A.; GISKE, C.G.; et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique

genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53, p.5046–54, 2009.

ZHAO, W.H.; HU, Z.Q. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum - β -lactamases in Gram-negative bacteria. **Crit. Rev. Microbiol.**, v.39, p.79–101, 2013.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

- Detectar os principais micro-organismos multirresistentes colonizando pequenos animais hospitalizados em um hospital veterinário escola e apontar os principais pontos de contaminação de um hospital veterinário.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar micro-organismos produtores de ESBL em animais hospitalizados e determinar o perfil de sensibilidade antimicrobiana das bactérias produtoras de ESBL.
- Detectar os principais genes de resistência em bactérias produtoras de ESBL isoladas de animais hospitalizados.
- Identificar *Enterococcus* vancomicina resistente (VRE) em animais sadios e doentes hospitalizados no HCV e determinar o perfil de sensibilidade antimicrobiana desses isolados.
- Determinar a presença dos principais genes de resistência a vancomicina em VRE.
- Identificar as principais espécies de *Staphylococcus* meticilina resistente e determinar seu perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.
- Detectar micro-organismos produtores de carbapenemases e/ou beta-lactamase do tipo *ampC* em cães e gatos hospitalizados em um hospital veterinário e estabelecer o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.
- Mapear os principais pontos de contaminação bacteriana de um hospital veterinário de ensino.
- Identificar os principais micro-organismos responsáveis por IH e seus genes de resistência aos antimicrobianos.

4 ARTIGO 1

(Submetido ao periódico *Journal of Infection and Public Health*)

Identification, antimicrobial resistance and detection of blaTEM, blaSHV and, blaCTX-M genes in ESBL-producing bacteria recovered from dogs and cats admitted to a veterinary hospital in South Brazil

4.1 ABSTRACT

Objectives: The objective of this study was to identify the main ESBL-producing bacteria and, to detect the frequency of the major genes responsible to trigger this resistance in hospitalized animals.

Methods: We collected 106 rectal swabs from cats (n=25) and dogs (n=81) to detect ESBL-producing isolates. ESBL-positive samples were submitted to the antimicrobial susceptibility test and PCR was performed to detect TEM, SHV and CTX-M genes from different groups.

Results: We observed that 44.34% of these samples (9 cats and 38 dogs) were positive for ESBL-producing bacteria. Out of these 47 animals, ESBL-positive results were detected as follow: only during admission to hospital collection (n=29), between admission and discharge period (n=9) and, after hospital discharge (n=35), resulting in 73 Gram-negative ESBL-producing bacterial isolates. Thirteen animals (27.66%) were hospitalized for elective castration (healthy animals). *Escherichia coli* was the major ESBL-producing bacteria isolated (53.42%), followed by *Pseudomonas aeruginosa* (5.48%) and, *Proteus mirabilis* (5.48%). Antimicrobial resistance profile of ESBL-producing isolates showed that 67 isolates (91.78%) were resistant to three or more antibiotic classes, while 13 of them (17.81%) were resistant to all tested antimicrobial classes. TEM gene exhibited the highest frequency in ESBL-producing isolates, followed by OXA-1, CTX-M (group 1) and, CTX-M (group 9) genes.

Conclusion: These results are useful to assess the predominance of ESBL-producing isolates recovered from dogs and cats in Brazil. Consequently, we draw attention to these animals, as they can act as reservoirs for these microorganisms, which are the major pathogens of nosocomial infections worldwide.

Keywords: multidrug resistance; veterinary hospital; TEM; CTX-M; small animals; ESBL.

4.2 INTRODUCTION

One of the major resistance mechanisms developed by Gram-negative bacteria is the hydrolysis of β -lactam ring through the action of enzymes. This process confers resistance to beta-lactam antimicrobial classes, including penicillin, cephalosporins (especially those from the third generation) and, monobactams [1]. These enzymes do not hydrolyze cephemycins (cefoxitin) and carbapenemics, but they can be inactivated by β -lactamase inhibitors (clavulanic acid, sulbactam and, tazobactam) [2]. The aforementioned enzymes are known as extended-spectrum beta-lactamases (ESBL), which are divided into three main groups: TEM, SHV and, CTX-M [3]. As other ESBL-encoding genes, OXA-1 gene (found in plasmid and integron locations of Gram-negative microorganisms) is frequently associated with worldwide-spread CTX-M-15 ESBL, conferring reduced susceptibility to ceftazidime, and combination of beta-lactams and beta-lactamase inhibitors [4,5].

ESBL encoding genes are located in conjugative plasmids or integrons. Besides that, transference of these genes to other enterobacteria species can occur, which facilitates even more its spread [6]. In the last decades, resistance to cephalosporins has become a worldwide threat to health public [7,8], which is often responsible for nosocomial infections, and even community-acquired infections [9].

Companion animals, especially cats and dogs, are important sources of antimicrobial resistance gene transmission due to direct contact with humans, posing public health to great risk [10-12]. Besides that, in the past years studies have reported worldwide the presence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* isolates recovered from products of animal origin and, companion animals [13].

Most research conducted in small animals aimed the identification of ESBL-producing bacteria, especially *E. coli*. However, other types of *Enterobacteriaceae*, such as *Citrobacter* spp. [14], *Enterobacter* spp., *Klebsiella* sp. [15], *Pantoea agglomerans* [16], *Serratia marcescens*, *Morganella morganii* and, *Providencia* spp. have also been reported as ESBL-producing bacteria [17]. In addition, other investigations demonstrated that non-enterobacteria such as *Pseudomonas aeruginosa* [16], *Acinetobacter baumannii* [18] and, *Stenotrophomonas maltophilia* are also able to produce ESBL in humans.

Epidemiological studies on molecular characterization of ESBL-producing bacteria in small animals admitted to veterinary hospitals are very scarce. For that reason, this study had the objective to identify the major ESBL-producing Gram-negative bacteria and, determine the key genes responsible for antimicrobial resistance in hospitalized animals.

4.3 MATERIAL AND METHODS

4.3.1 Samples

The Brazilian veterinary medical teaching hospital of Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC) treats approximately 5000 animals per year. In this observational study, rectal samples were collected from consecutive hospitalized small animals admitted between September 2017 and December 2017. Sample collection occurred at admission and discharge of the patient. If hospitalization was longer than three days, additional samples were collected following our pre-established guidelines. These collections were then performed between admission and discharge days. Prior to this procedure, swabs were humidified with sterile water. Rectal swab specimens were stored in tubes containing 15 mL of Brain Heart Infusion (BHI) broth and, supplemented with 10 mcg ceftriaxone disk. Later, rectal samples were sent to Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA) of CAV-UDESC, where they were incubated at 37°C for 24h.

4.3.2 Phenotypic screening for ESBL-producing isolates

Samples were inoculated onto McConkey agar at 37°C for 24h. Then, we screened positive samples for bacterial growth. In order to detect ESBL-producing isolates, we performed disk approximation testing according to Drieux [19] recommendations. For the test, one amoxicillin/clavulanic acid (AMC) disk was centrally placed on inoculated Mueller-Hinton agar plate. Then, additional disks of third and fourth-generations of cephalosporins and, aztreonam (AZT) were placed at a distance of 20 mm from center to center of the plate. The third-generation cephalosporins used were ceftazidime (CAZ), cefotaxime (CTX), and ceftriaxone (CRO). Cefepime (CPM) was the only fourth-generation cephalosporin used. Agar plate was incubated at 37°C for 24h. After this incubation period, we considered an ESBL-producing positive sample if there was a formation of a phantom zone, distortion of the inhibition zone edge toward the disk or, when the sample exhibited resistance to all antimicrobial agents.

4.3.3 Biochemical identification of ESBL-producing isolates and antimicrobial susceptibility testing profile

ESBL-producing bacteria were identified with Gram-negative Bactray system kit (Laborclin®, Vargem Grande, Brazil). To verify the susceptibility of isolates, we performed disk diffusion tests as described by Clinical and Standards Institute [19]. Mueller-Hinton agar plates were incubated 35+ 2°C for a period of 16-18h. The following disk diffusion disks were used: ampicillin (10 µg), amoxicillin/clavulanic acid (20 mcg/10 mcg), ticarcillin/clavulanic acid (75 µg/10 µg), cephalothin (30 µg), ceftriaxone (30 µg), ceftazidime (30 µg), cefotaxime (30 µg), ceftiofur (30 µg), cefepime (30 µg), cefoxitin (30 mcg), aztreonam (30 µg), imipenem (10 mcg), meropenem (10 µg), gentamicin (10 µg), streptomycin (10 µg), amikacin (30 µg), tobramycin (10 µg), chloramphenicol (30 µg), nitrofurantoin (10 mcg), enrofloxacin (5 µg), norfloxacin (10 µg), ciprofloxacin (5 µg), marbofloxacin (5 µg), levofloxacin (5 µg), tetracycline (30 µg), doxycycline (30 µg) and, trimethoprim/sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg). The zones of growth inhibition around each antibiotic disks were measured and, interpreted using the criteria established by CSLI for human and animal specimens [20,21].

Isolates that exhibited intermediate resistance were classified under resistance pattern, since therapeutic effect is uncertain and, antibiotic exposure might result in therapeutic failure [18]. *Escherichia coli* ATCC 25922 reference strain was used as quality control to determine susceptibility to antimicrobial agents.

4.3.4 Bacterial DNA extraction

Genomic DNA extraction of the isolates and reference strains was performed in accordance to previous protocol with some adaptations [22]. Bacterial isolates were inoculated in BHI broth at 37°C for 24h and stored at -20°C. A volume of 200 µL of each isolated was transferred to a sterile microtube, mixed with 500 µL of chloroform: isoamyl alcohol (24:1), and incubated in water bath at 56°C for 30 min. After that, microtube was centrifuged at 12,000 rpm for 10 min, and supernatant transferred to a new sterile microtube. We then added 600 µL of 70° alcohol, and further centrifuged the tube at 13,500 rpm for 20 min. After this procedure, supernatant was carefully discarded by inversion. Once DNA sample was completely dried, we added 200µL of Milli-Q water. DNA concentration measurements were performed on Nanodrop (Thermofisher, Waltham, USA). To perform PCR tests, DNA concentration was adjusted to 15-100 ng.

4.3.5 Genotypic characterization of ESBL-producing isolates

Isolates that exhibited positive ESBL phenotypic profile were further investigated to verify the presence of carbapenemase genes. For that, we performed two multiplex PCRs: one to detect the genes *BlaTEM*, *BlaSHV*, and *BlaOXA-1*; and the other to disclose *BlaCTX-M* genes of groups 1, 2, and 9. In addition, a conventional PCR was conducted to identify *BlaCTX-M* genes of groups 8 and 25, using specific primers (Table 2) [23]. Amplification reactions were conducted in a 50 µL final volume containing PCR buffer (Tris-HCl - 20mM, KCl - 50mM), MgCl₂ (1.5mM), dNTP (200mM of each), Taq DNA polymerase (1U), primers (4 pmol of each), and bacterial DNA (2µL). The PCR program was carried out as follows: initial denaturation at 94°C for 10 min; 40 cycles of denaturation step at 94 °C for 40 s, annealing of the primer at 56 °C for 40 s, and 1 min of extension at 72 °C. The last cycle extension was at 72 °C for 7 min.

Amplified fragments were subjected to electrophoresis in 2% agarose gel (100V, 300mA) for 1 h, stained with GelRedTM and, visualized in transilluminator. *Klebsiella pneumoniae* CCBH5991 and *Klebsiella pneumoniae* CCBH15948 reference strains were used to assure quality control for the detection of *BlaTEM+*, *BlaSHV+*, *BlaCTX-M+*, and *BlaOXA+* genes (Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz). *Escherichia coli* ATCC 25922 reference strain was used as a negative control.

4.4 RESULTS

A total of 106 samples of animals, 23.58% from cats and 76.42% from dogs, were collected. Because four of these animals required hospitalization longer than three days, it was necessary to perform more collections between admission and discharge days. Thus, the total amount of samples analyzed were 224.

We detected the presence of ESBL-producing bacteria in 47 animals (44.34%), being nine cats (9/25 - 36%) and 38 dogs (38/81 - 46.91%). ESBL-producing isolates were positive as follows: 29 during admission to HCV, 9 between admission and discharge period, and 35 at hospital discharge, which resulted in 73 positive Gram-negative samples. Tables 2 and 3 comprehends detailed information for each animal.

Of the 47 animals that were positive for ESBL-producing isolates, thirteen (27.66%) were hospitalized for elective castration (salpingo-oophorectomy in females and orchietomy in males). Only a single healthy animal was positive for ESBL-producing bacteria at hospital

admission, whereas 11 were positive only at the hospital discharge. Table 2 shows the identification of types of microorganisms and, beta-lactam resistance genes from the isolates recovered from these animals. Characterization of samples from sick hospitalized animals, including ESBL genes detection, is illustrated in Table 3.

Of the 73 ESBL-producing isolates, we observed the presence of *E. coli* (53.42%), *Pseudomonas aeruginosa* (15.07%), *Proteus mirabilis* (5.48%), *Salmonella* spp. (5.48%), *Klebsiella oxytoca* (4.11%), *Citrobacter freundii* (2.74%), *Acinetobacter baumannii* (2.74%), *Stenotrophomonas maltophilia* (2.74%), *Serratia liquefaciens* (2.74%), *Citrobacter braakii* (1.37%), *Citrobacter youngae* (1.37%), *Serratia marcescens* (1.37%), and *Hafnia alvei* (1.37%).

We conducted antimicrobial susceptibility testing for seven different antibiotic classes on ESBL positive samples to assess the multidrug resistance profile (multidrug resistance defined as phenotypic resistance to at least three of the tested antibiotic classes). Out of the 73 ESBL-producing bacteria samples, 67 (91.78%) were resistant to at least three classes, whereas 13 (17.81%) were resistant to all of them. We only observed resistance values below 10% for meropenem (2.74%), imipenem (5.48%), and amikacin (9.59%). On the other hand, the other antimicrobial agents revealed a resistance values higher than 50%, except for tobramycin (39.73%) and, nitrofurantoin (42.247%).

Molecular characterization of ESBL-encoding genes revealed that all isolates harbored BlaTEM gene, which was identified alone in 23 isolates (31.51%) or combined with the other genes. The combinations found were: BlaTEM + BlaOXA-1 in 17 isolates (23.38%); BlaTEM + BlaCTX-M-1 and, BlaTEM + BlaCTX-M-1 + BlaOXA-1 both in 7 isolates (9.59%); BlaTEM + BlaSHV and, BlaTEM + BlaCTX-M-9 both in 6 isolates (8.22%); BlaTEM + BlaCTX-M-9 + BlaOXA-1 in 4 isolates (5.48%); BlaTEM + BlaSHV + BlaCTX-M-1, BlaTEM + BlaSHV + BlaOXA-1 and, BlaTEM + BlaSHV + BlaCTX-M-1 + BlaOXA-1 in 1 isolate (1.37%). We could not detected the presence of CTX-M gene from groups 8 and 25 (Table 2 and 3).

4.5 DISCUSSION

Most studies underscore the detection of the major genes encoding the production of extended-spectrum beta-lactamases in *E. coli*, but our study demonstrates that there are other very important microorganisms involved in the dissemination of the aforementioned genes. Surprisingly, as 46.58% (34/73) of the isolates were identified as non-*E. coli*, 44.12% (15/34) of them did not even belong to the *Enterobacteriaceae* family. Although this fact has been

previously reported by other authors [6,16-17], there is still a lack of investigations pinpointing the association of bacterial identification in hospitalized animals (healthy and sick) with occurrence of genes encoding ESBL-production and, antimicrobial susceptibility profile.

ESBL-producing bacteria were isolated from 47 (44.34%) animals, a value that is well above those found in other countries such as USA (3.80%), Algeria (11.7%), Mexico and Switzerland (17%), and even Southeast of Brazil (28.50%) [10, 24-27]. This is an alarming situation, since companion animals are constantly in contact with their owners and human environment. Besides that, these results reinforce that the current conditions of this teaching veterinary hospital, where the flow of people is high, might promote the dissemination of this type of microorganism.

The results from the current study indicated that 91.78% of ESBL-producing isolates were considered multidrug resistant, a value similar to the described by Zogg et al [27] (88.60%). In addition, Liu et al., [24] showed that 75.00% of ESBL-producing samples were resistant to at least ten antimicrobial drugs. We interestingly observed that 89.00% of the isolates were resistant to the same number of antibiotics described by these authors and, 39.73% were actually resistant to at least 20 antimicrobial drugs. The other concerning fact is that 17.81% of our resistant ESBL-producing samples were resistant to all antimicrobial classes tested (n=7), which dramatically affects the choice of antibiotic therapy for these animals, and impairs the safety of care by dissemination of opportunistic microorganisms to the environment.

On the subject of antimicrobial drug of beta-lactam class (except for carbapenems), drug resistance profile varied from 71.23% to 98.63% (ceftriaxone and cefotaxime), which were in agreement with those presented by Liu et al., [24]; however, they were higher than the ones reported by Carvalho et al [10] (values between 9.50% and 33.30%). These high levels of resistance to the aforementioned antimicrobial class increase the use of carbapenems (meropenem and imipenem), which usually are only approved for clinical treatment of severe infections [28], and consequently, leads to the emergence and dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. With respect to carbapenems, only 2.74% of ESBL were resistant to meropenem, and 5.48% to imipenem, suggesting a decrease of permeability or even the presence of enzymes responsible for hydrolyzing antimicrobials of this group.

ESBL antimicrobial resistance in human and animal isolates is commonly associated with other antibiotic classes [27,29]. Antimicrobial agents such as amoxicillin/clavulanic acid, chloramphenicol, trimethoprim/sulfamethoxazole and fluoroquinolones are frequently used to treat infections caused by *E. coli* in cats and dogs, which led to an increase of multidrug resistant

strains [14,30]. Similarly, the current study underscores this finding, as we observed more than 50% resistance to these antibiotics.

Baede et al [31] and Schmidt et al [32] reported the presence of ESBL genes in isolates recovered from both healthy and sick animals. Interestingly, these results are in agreement with ours, as we demonstrated that 27.66% of hospitalized animals for elective castration (without any signs of sickness or disease) had also positive samples for ESBL genes.

Except for two animals, ESBL retrieved from these patients were identified at the hospital discharge day, which suggests a veterinary nosocomial colonization. This fact points out that after bacterial colonization, this animal will return to its natural environment and, consequently, will most likely disseminate these potential pathogenic and multidrug resistant bacteria to the community.

Molecular characterization of ESBL-producing isolates in the veterinary medicine assists in the surveillance, monitoring and, tracking of the most important genes encoded by these microorganisms and responsible for resistance to the most used antibiotic class in the veterinary praxis routine. According to Carvalho et al [10], these pieces of information are also essential to identify similarity among bacterial human and animal isolates, since the prevalence of these genes in animals is not yet well established in Brazil.

As stated by D'Andrea et al. [33], since the first sporadic detection of CTX-M in animals, CTX-M type ESBLs have proved successful globally diffusion, and became overall the most prevalent type of ESBL, replacing the TEM- and SHV-types. In contrast to other studies that reported a predominance of CTX-M type of ESBL [10,25], our study showed that 100% of the samples harbored TEM enzyme, whereas only 35.62% were positive for CTX-M. Liu et al., [24] suggest that historical aspects of animal treatment, geographical region and, phenotypic profile of ESBL-producing isolates might affect the occurrence of *Bla*CTX-M gene.

In relation to CTX-M enzyme variants, group 1 was the most isolated (61.54%), followed by group 9 (38.46%). Likewise, other studies worldwide showed that *bla*CTX-M-15 gene (from group 1) was the most predominant [13,24-25,27,34]. Bevan et al [13] confirmed that *Bla*CTX-M-2 gene is still predominant in ESL-producing isolates recovered from human specimens in South America. Although we examined animal samples, none of them exhibited any variant of this gene.

Our findings showed that sick and healthy animals are potential carriers of ESBL-producing bacteria. Although *E. coli* is the most isolated ESBL-producing bacteria in animals, other species were also identified as carriers of resistance genes, which shows how inter- and intra-dissemination is eased among these microorganisms. Currently, TEM is not the most

predominant gene in ESBL isolates worldwide. However, our results revealed that all samples harbored this gene, which reinforces the idea that antimicrobial resistance varies according to period and geographic region of the study.

These results are useful to assess the predominance of ESBL-producing isolates recovered from dogs and in cats in Brazil. Consequently, we draw attention to these animals, as they can act as reservoirs for these microorganisms, which are the major pathogens of nosocomial infections worldwide.

Acknowledgements

We thank the Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) and the Instituto Adolfo Lutz for providing the reference strains.

Funding: This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina - FAPESC.

Conflict of Interest Statement

Conflicts of interest: none.

Ethical approval

This study was approved by the ethical committee of Universidade do Estado de Santa Catarina (2042290617), Brazil.

4.6 REFERENCES

- [1] Dahms C, Hübner NO, Kossow A, Mellmann A, Dittmann K, Kramer A. Occurrence of ESBL-producing *Escherichia coli* in livestock and farm workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany. PLoS One 2015;10:e0143326. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143326>.
- [2] Lee JH, Bae IK, Lee SH. New definitions of extended-spectrum beta-lactamase conferring worldwide emerging antibiotic resistance. Med Res Ver 2012;32:216–232. DOI: 10.1002/med.20210.

- [3] Huber H, Zweifel C, Wittenbrink MM, Stephan R. ESBL-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Switzerland. *Vet Microbiol* 2013;162:992-996. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.10.029.
- [4] Sugumar M, Kumar KM, Manoharan A, Anbarasu A, Ramaiah S. Detection of OXA-1 β -Lactamase gene of *Klebsiella pneumoniae* from blood stream infections (BSI) by conventional PCR and in-silico analysis to understand the mechanism of OXA mediated resistance. *PLoS ONE* 2014;9(3):e91800. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0091800>.
- [5] Poirel L, Revathi G, Bernabeu S, Nordmann P. Detection of NDM-1- producing *Klebsiella pneumonia* in Kenya. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:934-936. DOI: 10.1128/AAC.01247-10.
- [6] Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol* 2013;303:298–304. DOI: 10.1016/j.ijmm.2013.02.001.
- [7] EFSA, ECDC. EU Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. *EFSA J* 2015;13:1-178.
- [8] Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011;35:736–755. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x.
- [9] Berglund B. Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. *Infect Ecol Epidemiol* 2015;5:28564. DOI: 10.3402/iee.v5.28564.
- [10] Carvalho AC, Barbosa AV, Arais LR, Ribeiro PF, Carneiro VC, Cerqueira AMF. Resistance patterns, ESBL genes, and genetic relatedness of *Escherichia coli* from dogs and owners. *Braz J Microbiol* 2016;47:150–158. DOI: 10.1016/j.bjm.2015.11.005.
- [11] De Briyne N, Atkinson J, Pokludova L, Borriello SP. Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. *Vet Rec* 2014;175:325. DOI: 10.1136/vr.102462.

- [12] Hordijk J, Schoormans A, Kwakernaak M, Duim B, Broens E, Dierikx C, et al. High prevalence of fecal carriage of extended spectrum-lactamase/AmpC-producing *Enterobacteriaceae* in cats and dogs. *Front Microbiol* 2013;4:242. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00242.
- [13] Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *J Antimicrob Chemother* 2017;72:2145–2155. doi: 10.1093/jac/dkx146.
- [14] Ewers C, Bethe A, Wieler LH, Guenther S, Stamm I, Kopp PA, et al. Companion animals: a relevant source of extended-spectrum beta-lactamase-producing fluoroquinolone-resistant *Citrobacter freundii*. *Int J Antimicrob Agents* 2011;37:86–87.
- [15] Ma J, Zeng Z, Chen Z, Xu X, Wang X, Deng Y. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr, aac(6')-Ib-cr, and qepA among ceftiofur-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from companion and food-producing animals. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;53:519–524. DOI: 10.1128/AAC.00886-08.
- [16] Sfaciotte RAP, Coronel LG, Snak A, Bordin JT, Wildemann P, Melo FD, et al. Antimicrobial resistance phenotypic profile of isolates from clinical infections in dogs. *Acta Sci Vet* 2017;45:1485. DOI: <https://doi.org/10.22456/1679-9216.80501>
- [17] Zhao WH, Hu ZQ. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol* 2013;39:79–101. DOI: 10.3109/1040841X.2012.691460.
- [18] Manageiro V, Jones-Dias D, Ferreira E, Louro D, Caniça M. Genetic diversity and clonal evolution of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Portugal and the dissemination of ST118. *Int J Antimicrob Agents* 2012;40:398–403. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2012.06.013.

- [19] CLSI. Performance Standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard-12th edition. M02-A12. Wayne, PA: (2015). Clinical and Laboratory Standards Institute.
- [20] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 28th ed. CLSI Supplement M100. Wayne, Pennsylvania, USA. CLSI, 2018.
- [21] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for Antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals. 5th ed. CLSI standard VET01. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.
- [22] Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 1990;12(1):13-15.
- [23] Dallenne C, Da Costa A, Decre D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother 2010;65:490–495. doi: 10.1093/jac/dkp498
- [24] Liu X, Thungrat K, Boothe DM. Occurrence of OXA-48 Carbapenemase and other β -Lactamase genes in ESBL-producing multidrug resistant *Escherichia coli* from dogs and cats in the United States, 2009–2013. Front Microbiol 2016;7:1057. DOI: 10.3389/fmicb.2016.01057
- [25] Yousfi M, Mairi A, Touati A, Hassissene L, Brasme L, Guillard T, et al. Extended spectrum β -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* fecal isolates from healthy companion animals in Algeria J Infect Chemother 2016;22:431–435. DOI: 10.1016/j.jiac.2016.03.005
- [26] Rocha-Gracia RC, Cortes-Cortes G, Lozano-Zarain P, Bello F, Martínez-Laguna Y, Torres C. Faecal *Escherichia coli* isolates from healthy dogs harbour CTX-M-15 and CMY-2 b-lactamases. Vet J 2015;203:315e9. DOI: 10.1016/j.tvjl.2014.12.026

- [27] Zogg AL, Zurfluh K, Schmitt S, Nuesch-Inderbinen M, Stephan R. Antimicrobial resistance, multilocus sequence types and virulence profiles of ESBL producing and non-ESBL producing uropathogenic *Escherichia coli* isolated from cats and dogs in Switzerland. *Vet Microbiol* 2018;216:79-84. DOI: 10.1016/j.vetmic.2018.02.011.
- [28] Hawkey PM. Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: a product of globalization. *J Hosp Infect* 2015;89:241–7. DOI: 10.1016/j.jhin.2015.01.008
- [29] Lavigne JP, Bruyère F, Bernard L, Combescure C, Ronco E, Lanotte P et al. Resistance and virulence potential of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients hospitalized in urology departments: a French prospective multicentre study. *J Med Microbiol* 2016;65(6):530-537. DOI: 10.1099/jmm.0.000247
- [30] Barsanti, J. Genito urinary infections. In: Greene C.E. (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat*. 4th ed. Elsevier Saunders, St Louis, USA, 2012;1013–1031.
- [31] Baede VO, Wagenaar JA, Broens EM, Duim B, Dohmen W, Nijssse R et al. Longitudinal study of extended-spectrum- β -Lactamase- and AmpC-producing Enterobacteriaceae in household dogs. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:3117-3124.
- [32] Schmidt VM, Pinchbeck GL, Nuttall T, McEwan N, Dawson S, Williams NJ. Antimicrobial resistance risk factors and characterisation of faecal *E. coli* isolated from healthy Labrador retrievers in the United Kingdom. *Prev Vet Med* 2015;119:31-40.
- [33] D'Andrea MM, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. CTX-M-type β -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol* 2013;303:305-17. DOI: 10.1016/j.ijmm.2013.02.008
- [34] Maeyama Y, Taniguchi Y, Hayashi W, Ohsaki Y, Osaka S, Koide S et al. Prevalence of ESBL/AmpC genes and specific clones among the third-generation cephalosporin-resistant *Enterobacteriaceae* from canine and feline clinical specimens in Japan. *Vet Microbiol* 2018;216:183-189. DOI: 10.1016/j.vetmic.2018.02.020

TABELAS

Tabela 2: List of primers used in PCR for detection of ESBL-producing bacteria.

<i>β-lactamase</i>	<i>Primer</i>	<i>Sequence of oligonucleotides (5'-3')</i>	<i>Size of amplified fragment</i> (bp)	<i>Described by:</i>
<i>BlaTEM</i> (<i>BlaTEM-1</i> and <i>TEM-2</i>)	MultiTSO-T_f	CATTTCCGTGTCGCCCTTATT	800	
	MultiTSO-T_r	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC		
<i>BlaSHV</i> (<i>BlaSHV-1</i>)	MultiTSO-S_f	AGCCGCTTGAGCAAATTAAAC	713	
	MultiTSO-S_r	TCCCGCAGATAAATCACCAAC		
<i>BlaOXA</i> (<i>BlaOXA-1</i> , <i>BlaOXA-2</i> and <i>BlaOXA-30</i>)	MultiTSO-S_f	GGCACCAGATTCAACTTCAAG	564	
	MultiTSO-S_r	GACCCAAGTTCCCTGTAAGTG		
<i>BlaCTX-M</i> group 1 (<i>BlaCTX-M-1</i> , <i>BlaCTX-M-3</i> e <i>BlaCTX-M-15</i>)	MultiCTXMGP1_f	TAGGAARTGTGCCGCTGYA	688	Dallenne et al. (2010)
	MultiCTXMGP1-2r	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT		
<i>BlaCTX-M</i> group 2 (<i>BlaCTX-M-2</i>)	MultiCTXMGP2_f	CGTTAACGGCACGATGAC	404	
	MultiCTXMGP1-2r	CGATATCGTTGGTGGTRCCAT		
<i>BlaCTX-M</i> grupo 9 (<i>BlaCTX-M-9</i> and <i>BlaCTX-M-14</i>)	MultiCTXMGP9_f	TCAAGCCTGCCGATCTGGT		
	MultiCTXMGP9_r	TGATTCTGCCGCTGAAG	561	
<i>BlaCTX-M</i> group 8/25 (<i>BlaCTX-M-8</i> , <i>BlaCTX-M-25</i> , <i>BlaCTX-M-26</i> and <i>BlaCTX-M-39</i> - 41)	CTX-Mg8/25_f	AACRCRCAGACGCTCTAC	326	
	CTX-Mg8/25_r	TCGAGCCGGAASGTGTYAT		

f:forward, r: reverse

Tabela 3: List of healthy animals admitted to CAV/UDESC that revealed positive for ESBL in faecal samples, associated with antimicrobial susceptibility profile and, detection of resistance genes.

Animal species	No. of isolates	Reason for hospitalization	Bacterial species recovered	Time of collection	No. of hospitalization days	Bla gene	Resistance to antimicrobial classes	Resistance to antimicrobial agents (No.)
cat	1	USO	<i>E. coli</i>	Discharge	2	TEM/SHV/CTX-M-1	BLT/AG/FQ/TET/SUL	20
cat	1	USO	<i>E. coli</i>	Discharge	2	TEM/CTX-M-9	BLT/AG/TET/SUL	16
dog	1	USO	<i>E. coli</i>	Discharge	2	EM/CTX-M-9	BLT/AG/FQ/TET/SUL	17
cat	1	USO	<i>Hafnia alvei</i>	Discharge	2	TEM/CTX-M-1/OXA-1	BLT/AG/FQ/TET/SUL/AMP	23
cat	1	USO	<i>Citrobacter braakii</i>	Discharge	3	TEM/CTX-M-9	BLT/AG/FQ/TET/NIT/SUL/AMP	17
dog	2	OE	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	admission and discharge	2	TEM/SHV	BLT/AG/TET/NIT/SUL/AMP	12
dog	1	USO	<i>Citrobacter freundii</i>	Discharge	2	TEM	BLT	8
dog	1	OE	<i>Citrobacter freundii</i>	Discharge	2	TEM/CTX-M-9	BLT/AG/TET/SUL/AMP	15
dog	1	USO	<i>E. coli</i>	Discharge	2	TEM/OXA-1	BLT/AG/FQ/TET/SUL	19
cat	1	USO	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Discharge	2	TEM/CTX-M-1/OXA-1	BLT/AG/FQ/TET/NIT/SUL/AMP	20
cat	1	USO	<i>E. coli</i>	Discharge	2	TEM	BLT/AG/TET	14
dog	1	USO	<i>E. coli</i>	Admission	2	TEM	BLT/FQ/TET/AMP	16
cat	1	OE	<i>E. coli</i>	Discharge	2	TEM	BLT	5

USO: salpingo-oophorectomy; OE: orchectomy; BLT: beta-lactam antibiotics; AG: aminoglycosides; FQ: fluoroquinolones; TET: tetracycline; SUL: sulfonamide; AMP: amphenicols; NIT: nitrofurans. *A total of 27 antimicrobial agents were used.

Tabela 4: List of sick animals admitted to CAV/UDESC that revealed positive for ESBL in faecal samples, associated with antimicrobial susceptibility profile and, detection of resistance genes.

Animal species	No. of isolates	Reason for hospitalization	Bacterial species recovered	Time of collection	No. of hospitalization days	Bla gene	Resistance to antimicrobial classes	Resistance to antimicrobial agents (No.)
cat	1	wound debridement	<i>E. coli</i>	admission	2	TEM	BLT/AG/TET	11
dog	1	anemia	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	admission	2	TEM/SHV/OXA-1	BLT/TET/NIT/SUL/AMP	12
dog	2	lymphoma	<i>Acinetobacter baumanii</i>	admission and discharge	3	TEM/CTX-M-1	BLT/TET/NIT/SUL/AMP	11
dog	2	splenectomy	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	admission and discharge	3	TEM/OXA-1	BLT/AG/TET/NIT/SUL/AMP	15
dog	1	dental prophylaxis	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	admission	2	TEM/OXA-1	BLT/AG/FQ/TET/NIT/SUL/AMP	15
dog	2	cystotomy	<i>Klebsiella oxytoca</i>	admission and discharge	4	TEM/CTX-M-1/OXA-1	BLT/AG/FQ/TET/NIT/SUL/AMP	24
cat	1	injury caused by bite	<i>E. coli</i>	discharge	3	TEM	BLT	12
dog	1	osteomyelitis	<i>E. coli</i>	discharge	3	TEM	BLT/NIT	8
cat	3	FLUTD	<i>Salmonella spp</i>	Admission and discharge	6	TEM/OXA-1	BLT/AG/FQ/TET/SUL/AMP	24

dog	1	ND	<i>Klebsiella oxyoeca</i>	discharge	3	TEM/CTX-M-9/OXA-1	BLT/AG/TET/SUL	13
dog	2	canine distemper	<i>E. coli</i>	Admission and discharge	2	TEM/CTX-M-1	BLT/AG/FQ/TET/NIT/SUL	22
dog	1	osteosynthesis of elbow	<i>Proteus mirabilis</i>	discharge	5	TEM/CTX-M-1/OXA-1	BLT/AG/FQ/TET/SUL/AMP	25
dog	3	injury	<i>E. coli</i>	Admission , in between, and discharge	5	TEM/OXA-1	BLT/AG/FQ/TET/SUL/AMP	22
dog	1	ND	<i>Salmonella spp</i>	admission	2	TEM/CTX-M-9/OXA-1	BLT/AG/FQ/TET/SUL/AMP	20
dog	1	CSF	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	discharge	3	TEM/CTX-M-1/OXA-1	BLT/AG/FQ/TET/SUL/AMP	17
dog	3	hip and tail injury	<i>E. coli</i>	admission, in between, and discharge	7	TEM/OXA-1	BLT/AG/FQ/TET/SUL/AMP	20
dog	2	venomous animal bite	<i>Serratia marcescens and</i> <i>Proteus mirabilis</i>	in between, and discharge	6	TEM/CTX-M-1 TEM/SHV/CTX-M- 1/OXA-1	BLT/AG/FQ/TET/NIT/SUL/ BLT/AG/FQ/TET/SUL/AMP	20 21
dog	1	ND	<i>E. coli</i>	admission	2	TEM/CTX-M-1/OXA-1	BLT/AG/FQ/TET/NIT/ SUL/AMP	25
dog	3	ND	<i>E. coli</i>	admission, in between, discharge	6	TEM	BLT/FQ/TET/AMP	14

dog	1	nodulectomy	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	admission	2	TEM	BLT/AG/TET/NIT/ SUL/AMP	14
dog	2	fistula correction	<i>Serratia liquefaciens</i>	admission and discharge	2	TEM/SHV/CTX-M-9	BLT/AG/FQ/TET/SUL/AMP	22
dog	2	bronchoscopy	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	admission and discharge	3	TEM	BLT/AG/FQ/TET/NIT/ SUL/AMP	18
cat	3	exploratory laparotomy	<i>E. coli</i>	admission, in between, and discharge	6	TEM/SHV	BLT/AG/FQ/TET/SUL/AMP	23
dog	1	bilateral mastectomy	<i>Citrobacter youngae</i>	admission	3	TEM/OXA-1	BLT/AG/FQ/TET/SUL	20
dog	5	mastectomy and reconstruction	<i>E. coli</i>	admission, in between, and discharge	12	TEM/CTX-M-1	BLT/AG/FQ/TET/SUL/AMP	21
dog	1	ND	<i>Proteus mirabilis</i>	admission	2	TEM	BLT/AG/TET/NIT	12
dog	2	dental prophylaxis	<i>E. coli</i>	admission	2	TEM	BLT	7
dog	2	dental prophylaxis	<i>Proteus mirabilis</i>	discharge	2	TEM	BLT/TET/NIT/AMP	8
dog	1	ND	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	admission	2	TEM	BLT/AG/FQ/TET/NIT/ SUL/AMP	20
dog	2	nodulectomy	<i>E. coli</i>	admission and discharge	2	TEM/OXA-1	BLT/AG/FQ/TET/SUL/AMP	23

dog	1	dental plaque	<i>E. coli</i>	admission	2	TEM	BLT/AG/FQ/TET/SUL	18
dog	1	exposed fracture LHL	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	discharge	7	TEM/SHV	BLT/AG/FQ/TET/NIT/SUL/AMP	16
dog	1	mammary neoplasia	<i>E. coli</i>	admission	2	TEM/CTX-M-9	BLT/AG/TET/NIT/SUL/AMP	16
dog	2	mastectomy	<i>E. coli</i>	admission and discharge	3	TEM/CTX-M-9/OXA-1	BLT/AG/FQ/TET/NIT/SUL/AMP	25
dog	2	elbow dislocation	<i>E. coli</i>	admission and discharge	3	TEM/OXA-1	BLT/AG/FQ/TET/NIT/SUL/AMP	25

CSF: cerebrospinal fluid collection; OSH: ovariosalpingoesterectomia; FLUTD: feline lower urinary tract disease; ND: diagnosis not defined; LHL: left hind limb; BLT: beta-lactam antibiotics; AG: aminoglycosides; FQ: fluoroquinolones; TET: tetracycline; SUL: sulfonamide; AMP: amphenicols; NIT: nitrofurans.

*A total of 27 antimicrobial agents were used.

5 ARTIGO 2

(Submetido ao periódico *Journal of Global Antimicrobial Resistance*)

Vancomycin Resistance in *Enterococcus* isolates from small animals in veterinary hospital.

5.1 ABSTRACT

Objectives: The objective of this study was to identify vancomycin-resistant *Enterococcus* isolated from animals admitted to a university veterinary hospital and to determine the presence of the major resistance genes to vancomycin.

Methods: A total of 106 rectal swabs were collected from cats (n = 25) and dogs (n = 81) for the detection of vancomycin resistant *Enterococcus* (VRE). Positive samples for VRE were submitted to the antimicrobial susceptibility test of different classes and PCR was performed to identify the *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, and *vanG* genes.

Results: *Enterococcus faecalis* was the most VRE isolated of the animals (35.8%), found in healthy animals as well as in diseased animals. *Enterococcus* was identified with the presence of the *vanA* gene (52,54% - n=31), *vanB* gene (23,73% - n=14), *vanC* (20,34% - n=12) and *vanE* gene (3,39% - n=2). The antimicrobials with the lowest resistance were chloramphenicol (5.08%, n = 3), ampicillin (6.78%, n = 4) and penicillin G (18.64%, n = 11). In contrast, those with the highest resistance were: enrofloxacin (79.66%, n = 47), rifampicin (67.80%, n = 40) and ciprofloxacin (61.02%, n = 36). Seven *Enterococcus* (five *E. faecalis*, one *E. faecium* and one *E. gallinarum* group) in addition to resistance to vancomycin were also resistant to high doses of aminoglycosides (HLAR) (gentamicin 120mcg).

Conclusion: The non-existence of a Hospital Infection Control Commission at a veterinary hospital in Brazil increases the chance of dissemination of multiresistant microorganisms in the environment, which contributes to the contamination of hospitalized animals, further aggravating the health status of the animal and exposing health professionals contact with these microorganisms.

Keywords: VRE; dogs; multidrug resistance; HLAR; antimicrobial.

5.2 INTRODUCTION

The microorganisms belonging to the genus *Enterococcus* are Gram positive, catalase negative, facultative anaerobic cocci and are considered part of the normal intestinal microbiota of humans and animals (KIM et al., 2016). More than 50 different species have been described, with *E. faecalis* and *E. faecium* being the most clinically relevant species (GUZMAN et al., 2016).

Enterococci are considered to be commensal microorganisms with a worldwide spread (ESPINOSA-GONGORA et al., 2015), and for a long time they were considered harmless and only in the last decades were considered an emerging bacterium of great importance in the health area, mainly with the increase of their incidence in hospital infections (KHAN, AHMA e MEHBOOB, 2015; MARCADE et al., 2014; ARIAS e MURRAY, 2012).

Antimicrobial resistance in *Enterococcus* may be intrinsic, as occurs with the class of polymyxins, lincosamides, penicillins, and low levels of aminoglycosides (NISHIYAMA et al., 2017) or can be acquired through plasmids, integrons and / or transposons (HOLLENBECK and RICE, 2012; BEM BELGACEM et al., 2010), which facilitates the transmission of resistance genes to the environment, human and animal.

After the first isolated in 1988 in France (O'DRISCOLL and CRANK, 2015), ten different variations in the vancomycin resistance gene of *Enterococcus* (VRE) were found (*vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanF*, *vanG*, *vanL*, *vanM*, *vanN*) (HOLLENBECK e RICE, 2012; LEBRETON et al., 2011), with the *vanA* and *vanB* genes being the most prevalent (FREITAS et al., 2016).

In veterinary medicine, especially in small animals, there are not many studies on VRE, but multiresistant *Enterococcus* are identified regularly (GHOSH, DOWD e ZUREK, 2011). Thus, the aim of this study was to identify vancomycin-resistant *Enterococcus* isolated from healthy and diseased animals, both admitted to a university veterinary hospital, as well as to determine the presence of the major vancomycin resistance genes.

5.3 MATERIAL AND METHODS

5.3.1. Samples

The Brazilian veterinary medical teaching hospital of Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC) treats approximately 5000 animals per year. Rectal swabs of 81 dogs

and 25 cats were collected at admission in HCV and another after discharge of patients from the veterinary hospital in the period from September to December 2017. The reason for hospitalization was not taken into account, but samples were only collected from animals that remained for more than two days hospitalized. The swabs were previously humidified with sterile 0.85% saline solution for collection. After collection the swabs were deposited in tubes containing Enterococcosel broth supplemented with 6mcg of vancomycin and carried to the Center for Diagnostic Animal Microbiology (CEDIMA) of the CAV-UDESC, where it was incubated at 37°C for 48h.

*5.3.2 Phenotypic Detection of vancomycin resistant *Enterococcus* (VRE)*

The tubes containing *Enterococcosel* broth supplemented with vancomycin that showed blackish coloration after 48h incubation were plated on 5% sheep blood agar with vancomycin discs in the center of the plate. Samples that presented growth in blood agar and formed halos less than or equal to 17cm were submitted to the Gram test to confirm Gram positive cocci in addition to the catalase test to identify microorganisms belonging to the genus *Enterococcus*.

*5.3.3 Antimicrobial susceptibility test of *Enterococcus* and detection of high level of aminoglycoside resistance (HLAR)*

Strains identified as *Enterococcus* were tested for antimicrobial susceptibility profile using the disk diffusion technique using the following disks: vancomycin (10 ug), teicoplanin (30 ug), penicillin G (10 UI), ampicillin (10 ug), enrofloxacin (5 ug), levofloxacin (5 ug), marbofloxacin (5 ug), ciprofloxacin (5 ug), norfloxacin (10 ug), tetracycline (30 ug), doxycycline (30 ug), rifampicin (5 ug), nitrofurantoin (300 ug) e chloranphenicol (30 ug). For the identification of high-level aminoglycoside resistance *Enterococcus* (HLAR) the gentamicin disk (120 µg) was used. The zones of growth inhibition around each antibiotic disks were measured and, interpreted using the criteria established by CSLI for human and animal specimens [20,21]. *Escherichia coli* ATCC 25922 reference strain was used as quality control to determine susceptibility to antimicrobial agents.

5.3.4 Bacterial DNA extraction

DNA extraction from all phenotypically suggestive samples of vancomycin resistant *Enterococcus* isolated from the animals was performed through the protocol described by Parussolo et al (2019) to identify the *Enterococcus* species and to detect the gene that confers resistance to vancomycin. DNA concentration measurements were performed on Nanodrop (Thermofisher, Waltham, USA). To perform PCR tests, DNA concentration was adjusted to 15-100 ng.

5.3.5 Molecular confirmation of *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* and detection of genes conferring resistance to vancomycin

Two techniques of Multiplex PCR, one for identification of the two main species of *Enterococcus* (*E. faecium* and *E. faecalis*) and another for the detection of vancomycin genes (*vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* and *vanG*) were performed. Specific primers described in a previous study were used (DEPARDIEU, PERICHON and COURVALIN, 2004). Samples identified as Enteroroccus but negative for PCR identification and presence of *vanC* gene were identified as belonging to *Enterococcus gallinarum* group.

To identify the *Enterococcus* species, Amplification reactions were conducted in a 25 µL final volume containing PCR buffer (Tris-HCl - 20mM, KCl - 50mM), MgCl₂ (1.5mM), dNTP (200mM of each), Taq DNA polymerase (1U), primers (4 pmol of each), and bacterial DNA (2µL). for identification of vancomycin resistance genes the protocol was followed: 50 µL final volume containing PCR buffer (Tris-HCl - 20mM, KCl - 50mM), MgCl₂ (1.5mM), dNTP (200mM of each), Taq DNA polymerase (1U), primers (4 pmol of each), and bacterial DNA (3µL).

For both reactions, o PCR program was carried out as follows: initial denaturation at 94°C for 10 min; 40 cycles of denaturation step at 94 °C for 40 s, annealing of the primer at 56 °C for 40 s, and 1 min of extension at 72 °C. The last cycle extension was at 72 °C for 7 min. Amplified fragments were subjected to electrophoresis in 2% agarose gel (100V, 300mA) for 1 h, stained with GelRedTM and, visualized in transilluminator. *Enterococcus faecium* (ATCC 51299) and *Enterococcus faecalis* (ATCC 700221) reference strains were used to assure quality control for the detection (Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz). *Escherichia coli* ATCC 25922 reference strain was used as a negative control.

5.4 RESULTS

Of the 81 dogs and 25 cats, 30.8% (n = 25) and 52% (n = 13) vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* (VRE_{fs}) were isolated from the rectal swabs respectively, while vancomycin resistant *Enterococcus faecium* (VRE_{fm}) was isolated in 6.2% (n = 5) of the dogs, in addition to isolated 4.9% (n = 4) *Enterococcus gallinarum* group (VRE_{gg}) from dogs and 4% (n= 1) from cats (Table 5). Two dogs were colonized simultaneously by VRE_{fs} and VRE_{fm}. Of the 46 animals (32 dogs and 14 cats), 18 were colonized by VRE only in the collection in which the animal entered HCV, 17 of them in the collection in which the patient was discharged and 12 in both collections, totaling 59 samples. Of these same colonized animals, 16 (five dogs and 11 cats) were healthy and were hospitalized for the castration procedure.

The antimicrobials with the lowest resistance were chloramphenicol (5.08%, n = 3), ampicillin (6.78%, n = 4), gentamicin 120mcg (11.86%, n = 7) and penicillin G (18.64%, n = 11). Among those with the highest resistance were: enrofloxacin (79.66%, n = 47), rifampicin (67.80%, n = 40), ciprofloxacin (61.02%, n = 36), teicoplamine and erythromycin 55.93%, n = 33 each). The resistance percentages of all tested antimicrobials are shown in figure 1. Of the 59 *Enterococcus* isolates (48 *E. faecalis*, five *E. faecium* and six *E. gallinarum* groups), 84.75% (n = 50) were considered multiresistant (MDR), that is, they showed resistance to three or more antimicrobial classes. All *E. faecium* and *E. gallinarum* group were MDR. Seven *Enterococcus* (five *E. faecalis*, one *E. faecium* and one *E. gallinarum* group) in addition to resistance to vancomycin were also resistant to high doses of aminoglycosides (HLAR) (gentamicin 120mcg).

Regarding the detection of vancomycin resistance genes, 52.54% (n = 31) samples were isolated with the presence of the *vanA* gene, 23.73% (n = 14) with the presence of the *vanB* gene, 20.34% (n = 12) samples presented the *vanC* gene and 3.39% (n = 2) samples the *vanE* gene, as described in table 6. The *vanD* and *vanG* genes were not detected.

According to the identification of the species of *Enterococcus* and the presence of the gene that confers resistance to vancomycin, it was possible to distribute the isolates in seven groups (Table 7): a) *E. gallinarum* group with the presence of the *vanC* gene, which was identified in six isolates from five different animals (one animal was possible to isolate the same *Enterococcus* in both collections); b) *E. faecium* with the *vanB* gene identified in only one animal; c) *E. faecium* with the presence of the *vanA* gene identified in four different animals and with distinct antimicrobial susceptibility profiles; d) *E. faecalis* with the *vanE* gene, present in two samples and both belonging to the same animal, but with different resistance profiles; e)

E. faecalis with the presence of the *vanC* gene present in four different animals, and in one of them it was possible to isolate the same microorganism at the hospital admission, three days after admission and at the time of patient's departure; f) *E. faecalis* with the *vanB* gene, this profile was present in 12 different animals, and in one of them the same microorganism was isolated in both collections with the same antimicrobial susceptibility profile, and; g) *E. faecalis* with the *vanA* gene, a profile found in 27 samples from 22 different animals.

5.5 DISCUSSION

There are currently several studies worldwide showing the occurrence of VREs isolated from animal and human faeces and there is a discrepancy between the occurrence of the main *Enterococcus* species and the presence of resistance genes (LOPEZ, TENORIO e TORRES, 2011). However, in Brazil, most of these studies are related to the isolation of VRE in production animals, food and in humans, and we are not aware of previous studies showing the isolation of VRE in small hospitalized animals and their profile of antimicrobial susceptibility.

VRE_{fs} was the most isolated species in the faeces of dogs and cats (35.85%) in this study, a result that is much higher than that found by Ossiprandi et al. (2008) and Bertelloni et al. (2017) in Italy and Hungary respectively, where no found VRE in dog feces. The number of animals colonized by this microorganism found in this study is alarming since they serve as potential disseminators of one of the major pathogens responsible for hospital infections in humans.

Another very important finding was that 34.78% (n = 16) of the animals that presented VRE colonization were healthy animals that performed castration procedures; however, the CAV-UDESC HCV is a school hospital and these animals are hospitalized for more time for students to practice hospital procedures which facilitates the dissemination of the microorganism and the colonization of other animals. This is aggravated by the fact that in Brazilian veterinary hospitals the presence of a Hospital Infection Control Commission is not mandatory, which makes it difficult to detect multiresistant microorganisms and their control.

In the present study, 36.96% (n = 17) of the animals were only able to identify VRE samples at hospital discharge, suggesting that colonization occurred within the hospital. According to Verwilghen and Singh (2015), the longer an animal is hospitalized the greater the chance of colonization by multiresistant microorganisms present in the environment or even to spread these bacteria if the animal has already been colonized, even more in a veterinary hospital where patients, in most cases, are separated only by cages.

The *E. gallinarum* and *E. casseliflavus/flavescens* species are part of the *E. gallinarum* group (SVEC and DEVRIESE, 2015) and are intrinsically resistant to vancomycin, where the *vanC* gene responsible for a low level of antimicrobial resistance, but with sensitivity to teicoplanine (SCHOUTEN et al, 1999). However, the *vanC* gene is not restricted to this group of *Enterococcus* and has already been described by Schwaiger et al (2012) in *E. faecalis* isolated in Germany, a fact that was also observed in our study, which identified the *vanC* gene in all samples of the group of *E. gallinarum* (6) and in 10,17% (n = 6) of *E. faecalis*. Other vancomycin resistance genes in addition to the *vanC* gene (*vanA* and *vanB* genes) have also been identified in these microorganisms (ESHAGHI et al., 2015), however, none of our *E. gallinarum* isolates presented any other gene than *vanC*.

According to Adhikari (2010), meningitis, endocarditis and other important infections caused by *Enterococcus* in immunosuppressed patients are treated with vancomycin associated with aminoglycosides, among them gentamicina, however, when the microorganism has high levels of resistance to aminoglycosides (HLAR) treatment becomes ineffective. Bertelloni et al. (2017) found 6.7% of *Enterococcus* HLAR, a value below that found by this study, 11.86%, which not only showed resistance to aminoglycosides but also vancomycin.

The colonization of VRE and *Enterococcus* HLAR in small animals is a worrying factor for the population, since these animals are constantly in contact with humans and the fact that these microorganisms colonize healthy animals increases the concern of their dissemination in the environment. In a veterinary hospital the non-existence of a Hospital Infection Control Commission makes it difficult to identify multiresistant microorganisms and predisposes the hospitalized animals to infections, in addition to exposing health professionals to contact with these agents that are also responsible for nosocomial infections in humans.

Acknowledgements

We thank the Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) and the Instituto Adolfo Lutz for providing the reference strains.

Funding: This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina - FAPESC.

Conflict of Interest Statement

Conflicts of interest: none.

Ethical approval

This study was approved by the ethical committee of Universidade do Estado de Santa Catarina (2042290617), Brazil.

5.6 REFERENCES

ADHIKARI, L. High-level Aminoglycoside Resistance and Reduced Susceptibility to Vancomycin in Nosocomial Enterococci. **J Glob Infect Dis.**, v.2, n.3, p.231-235, 2010.

ARIAS, C.A.; MURRAY, B.E. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v.10, p.266-278, 2012.

BEN BELGACEM, Z.; ABRIQUEL, H.; BEN OMAR, N.; et al. Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic Enterococcus faecium from artesanal Tunisian fermented meat. **Journal of Food Protection**, v.21, p.462-470, 2010.

BERTELLONI, F.; SALVADORI, C.; LOTTI, G., et al. Antimicrobial resistance in Enterococcus strains isolated from healthy domestic dogs. **Acta Microbiol Immunol Hung.**, v.64, n.3, p. 301-312, 2015.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 28th ed. CLSI Supplement M100. Wayne, Pennsylvania, USA. CLSI, 2018.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for Antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals. 5th ed. CLSI standard VET01. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2018.

DEPARDIEU, F.; PERICHON, B.; COURVALIN, P. Detection of the van Alphabet and Identification of Enterococci and Staphylococci at the Species Level by Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.12, p. 5857-5860, 2004.

ESHAGHI, A.; SHAHINAS, D.; LI, A. et al. Characterization of an Enterococcus gallinarum isolate carrying a dual vanA and vanB cassette. **J Clin Microbiol**, v.53, p.2225-2229, 2015.

ESPINOSA-GONGORA, C.; SHAH, S.Q.A.; JESSEN, L.R.; et al. Quantitative assessment of faecal shedding of *b*-lactam-resistant *Escherichia coli* and enterococci in dogs. **Veterinary Microbiology**, v.181, p.298–302, 2015.

GUZMAN PRIETO, A.M.; VAN SCHAIK, W.; ROGERS, M.R.C., et al. Global emergence and dissemination of enterococci as nosocomial pathogens: attack of the clones? **Front Microbiol.**, v.7, p.788, 2016.

HOLLENBECK, B.L.; RICE, L.B. Intrinsic and acquired resistance mechanisms in enterococcus. **Virulence**, v.3, p.421-433, 2012.

KHAN, H.A.; AHMA, A.; MEHBOOB, R. Nosocomial infections and their control strategies. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.5, p.509-514, 2015.

KIM, D.H.; CHUNG, Y.S.; PARK, Y.K., et al. Antimicrobial resistance and virulence profiles of *Enterococcus spp.* isolated from horses in Korea. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.**, v.48, p.6-13, 2016.

LEBRETON, F.; DEPARDIEU, F.; BOURDON, N.; et al. D-Ala-D-Ser VanN-type transferable vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.55, n.10, p.4606-4612, 2011.

LOPEZ, M.; TENORIO, C.; TORRES, C. Study of vancomycin resistance in faecal enterococci from healthy humans and dogs in Spain a decade after the avoparcin ban in Europe. **Zoonoses Public Health**, v.60, p. 160-167, 2011.

MARCADE, G.; MICOL, J.B.; JACQUIER, H.; et al. Outbreak in a haematology unit involving an unusual strain of glycopeptideresistant *Enterococcus faecium* carrying both vanA and vanB genes. **J Antimicrob Chemother.**, v.69, n.2, p.500-505, 2014.

NISHIYAMA, M.; OGURA, Y.; HAYASHI, T.; SUZUKI, Y. Antibiotic resistance profiling and genotyping of vancomycin-resistant enterococci collected from an urban river basin in the provincial city of Miyazaki, Japan. **Water** v.9, p.79, 2017.

O'DRISCOLL, T.; CRANK, C.W. Vancomycin-resistant enterococcal infections: epidemiology clinical manifestations, and optimal management. **Infect. Drug Resist.**, v.8, p.217–230, 2015.

OSSIPRANDI, M.C.; BOTTARELLI, E.; CATTABIANI, F.; BIANCHI, E. Susceptibility to vancomycin and other antibiotics of 165 Enterococcus strains isolated from dogs in Italy. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v.31, p. 1-9, 2008.

PARUSSOLO, L.; SFACIOTTE, R.A.P.; DALMINA, K.A., et al. Detection of virulence genes and antimicrobial resistance profiles of Escherichia coli isolates from raw milk and artisanal cheese in Southern Brazil. **Semina: ciências agrárias**, v.40, n.1, p. 163-179, 2019.

SCHOUTEN, M.A.; VOSS, A.; HOOGKAMP-KORSTANJE, J.A.A. Antimicrobial susceptibility patterns of enterococci causing infections in Europe. **Antimicrob Agents Chemother**, v.43, p. 2542-2546, 1999.

SCHWAIGER, K.; BAUER, J.; HORMANSDORFER, S. et al. Presence of the resistance genes vanC1 and pbp5 in phenotypically vancomycin and ampicillin susceptible Enterococcus faecalis. **Microp Drug Resist**, v.18, p. 434-439, 2012.

VERWILGHEN, D.; SINGH, A. Fighting Surgical Site Infections in Small Animals: Are We Getting Anywhere? **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. v.45, n.2, p. 243-276, 2015.

TABELAS

Tabela 5: Espécie de *Enterococcus* vancomicina resistente isolados de cães e gatos

Animais	Nº de amostras	Nº (%) VRE negativos	VREfs		VREfm		VREgg	
			Nº (%) doentes positivos	Nº (%) sadios positivos	Nº (%) doentes positivos	Nº (%) sadios positivos	Nº (%) doentes positivos	Nº (%) sadios positivos
Cães	81	49 (60,5)	21 (25,9)	4 (4,9)	5 (6,2)	0	3 (3,7)	1 (1,2)
Gatos	25	11 (44)	3 (12)	10 (40)	0	0	0	1 (4)
Total	106	60 (56,6)	24 (22,6)	14 (13,2)	5 (4,7)	0	3 (2,8)	2 (1,9)

Tabela 6: Principais genes de resistência a vancomicina identificados nas espécies de *Enterococcus*

Espécie de <i>Enterococcus</i>	<i>vanA</i> (%)	<i>vanB</i> (%)	<i>vanC</i> (%)	<i>vanE</i> (%)	Total
<i>E. faecalis</i>	27 (45,76%)	13 (22,03%)	6 (10,17%)	2 (3,39%)	48 (81,36%)
<i>E. faecium</i>	4 (6,78%)	1 (1,7)	0	0	5 (8,47%)
<i>E. gallinarum group</i>	0	0	6 (10,17)	0	6 (10,17%)
TOTAL	31 (52,54%)	14 (23,73%)	12 (20,34%)	2 (3,39%)	59 (100%)

Tabela 7: Caracterização das cepas de *Enterococcus* isoladas de animais hospitalizados no HCV.

Isolado	Animal	Especie	Classe de antimicrobiano resistente	Van gene
1	Canino	<i>E. faecalis</i>	GLI / FQ / TET / RIF / NIT	A
2	Felino	<i>E. faecalis</i>	GLI / FQ / TET / ML / NIT	A
3	Felino	<i>E. faecalis</i>	GLI / FQ / NIT	A
4	Canino	<i>E. faecalis</i>	GLI / FQ / ML / RIF	A
5	Canino	<i>E. faecalis</i>	GLI / FQ / RIF / NIT	A
6	Canino	<i>E. faecalis</i>	GLI / HLAR / FQ / TET / ML / RIF	A
7	Canino	<i>E. faecalis</i>	GLI / HLAR / FQ / TET / ML / RIF	A
8	Canino	<i>E. faecalis</i>	GLI / FQ / TET / ML	A
9	Felino	<i>E. faecalis</i>	GLI / TET / ML / NIT	A
10	Felino	<i>E. faecalis</i>	CLI / PEN / AMP / RIF	A
11	Canino	<i>E. faecalis</i>	GLI / FQ / ML / RIF / NIT	A
12	Felino	<i>E. faecalis</i>	GLI / PEN / HLAR / FQ / TET / ML / RIF	A
13	Canino	<i>E. faecalis</i>	GLI / AMP / FQ / TET / ML / RIF	A
14	Canino	<i>E. faecalis</i>	GLI / FQ / RIF / NIT	A
15	Canino	<i>E. faecalis</i>	GLI / TET	A
16	Felino	<i>E. faecalis</i>	GLI / TET	A
17	Felino	<i>E. faecalis</i>	GLI / FQ	A
18	Canino	<i>E. faecalis</i>	GLI / FQ / ML / RIF / NIT	A
19	Felino	<i>E. faecalis</i>	GLI / PEN / FQ / TET / RIF / NIT	A
20	Canino	<i>E. faecalis</i>	GLI / FQ / RIF / NIT	A
21	Canino	<i>E. faecalis</i>	GLI / FQ / RIF / NIT	A
22	Felino	<i>E. faecalis</i>	GLI / FQ	A
23	Felino	<i>E. faecalis</i>	GLI / FQ	A
24	Felino	<i>E. faecalis</i>	GLI	A
25	Felino	<i>E. faecalis</i>	GLI	A
26	Canino	<i>E. faecalis</i>	GLI / NIT	A
27	Canino	<i>E. faecalis</i>	GLI / NIT	A
28	Felino	<i>E. faecalis</i>	GLI / FQ / ML / RIF	B
29	Canino	<i>E. faecalis</i>	GLI / FQ / TET / ML	B

30	Canino	E. faecalis	GLI / FQ / ML / RIF	B
31	Canino	E. faecalis	GLI / FQ / ML / RIF	B
32	Canino	E. faecalis	GLI / PEN / FQ / TET	B
33	Canino	E. faecalis	GLI / FQ / ML / RIF	B
34	Canino	E. faecalis	GLI / PEN / HLAR / FQ / TET / ML / RIF	B
35	Canino	E. faecalis	GLI / HLAR / FQ / TET / ML / RIF	B
36	Felino	E. faecalis	GLI / PEN / FQ / TET / RIF	B
37	Canino	E. faecalis	GLI / PEN / HLAR / FQ / TET / ML / RIF	B
38	Felino	E. faecalis	GLI / FQ / ML / RIF	B
39	Felino	E. faecalis	GLI / FQ / ML / RIF	B
40	Canino	E. faecalis	GLI / FQ / ML / RIF	B
41	Canino	E. faecalis	GLI / FQ / TET / ML / RIF	C
42	Canino	E. faecalis	GLI / FQ / TET / ML / RIF / CLO	C
43	Canino	E. faecalis	GLI / FQ / TET / ML / RIF	C
44	Canino	E. faecalis	GLI / FQ / ML / RIF	C
45	Canino	E. faecalis	GLI / FQ / TET	C
46	Canino	E. faecalis	GLI / FQ / TET / ML / RIF	C
47	Canino	E. faecalis	GLI / FQ / NIT	E
48	Canino	E. faecalis	GLI / FQ / TET	E
49	Canino	E. faecium	GLI / HLAR / FQ / TET / ML / RIF	A
50	Canino	E. faecium	GLI / PEN / TET / ML / NIT / CLO	A
51	Canino	E. faecium	GLI / PEN / AMP / FQ / TET / ML / RIF / NIT	A
52	Canino	E. faecium	GLI / PEN / AMP / FQ / TET / ML / RIF	A
53	Canino	E. faecium	GLI / PEN / FQ / TET / ML / RIF / CLO	B
54	Canino	E. gallinarum group	GLI / FQ / RIF / NIT	C
55	Canino	E. gallinarum group	GLI / FQ / RIF / NIT	C
56	Felino	E. gallinarum group	GLI / FQ / TET / RIF	C
57	Canino	E. gallinarum group	GLI / TET / RIF / CLO	C
58	Canino	E. gallinarum group	GLI / FQ / ML / RIF	C
59	Canino	E. gallinarum group	GLI / HLAR / FQ / TET / ML / RIF	C

GLI = glicopeptídeo; FQ = fluoroquinolona; PEN = Penicilina G; AMP = ampicilina; TET = tetraciclinas;
 HLAR = alto nível de resistência aos aminoglicosídeos; ML = macrolídeo; RIF = rifampicinas; NIT = nitrofurantoína; CLO = cloranfenicol

6 ARTIGO 3

Detecção de *Staphylococcus meticilina resistente em animais hospitalizados, no ambiente e nos funcionários de um hospital veterinário escola do Brasil.*

6.1 RESUMO

A presença dos MRS não está restrita aos humanos e animais doentes, mas podem também colonizar animais saudáveis, profissionais que trabalham no hospital veterinário bem como o ambiente hospitalar. O objetivo do presente estudo foi investigar a presença de MRS em animais hospitalizados, em funcionários e alunos de um hospital veterinário universitário e no ambiente hospitalar, além de identificar as principais espécies de *Staphylococcus* presentes e seu perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos. Foram coletados swabs nasais de 81 cães e 25 gatos no momento da internação no HCV e outro swab após a alta dos pacientes do hospital veterinário. Do ambiente, foram coletados pools de acordo com cada ambiente do hospital. Foram coletados 20 swabs nasais de funcionários (2), médicos veterinários (5), professores (3) e alunos de graduação e pós-graduação (10) envolvidos na rotina do HCV. As cepas identificadas como MRS foram testadas quanto ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos. Para identificação das espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva foi realizada a técnica de multiplex PCR. Dos 81 cães e 25 gatos (n=106), 49,38% (n=40) e 44% (n=11) respectivamente estavam colonizados por MRS, totalizando 51 animais (48,11%). Foram isoladas das 76 amostras de MRS a partir dos animais colonizados sendo que 52,63% (n=40) foram identificadas como MRSA, 40,76% (n=31) como MRSP e 6,58% (n=5) como MRSS. Em relação à identificação genotípica dos genes de resistência para os beta-lactâmicos, todos os MRS fenotipicamente identificados apresentaram o gene *mecA*. Micro-organismos MRS foram isolados em 81,92% dos pools coletados de 39 ambientes diferentes. Já em relação às pessoas, 90% (n=18) estavam colonizadas por MRS, sendo 66,66% (n=12) por MRSA e 33,33% (n=6) por MRSP. A presença de MRSA, MRSP e MRSS no ambiente, nos funcionários e nos animais evidenciam a grande disseminação desses patógenos dentro de um hospital veterinário. A negligência que se evidencia em muitos hospitais veterinários no Brasil quanto à higienização, fluxo de pessoas, lavagem de mãos e protocolos de limpeza e desinfecção contribuem para a disseminação de micro-organismos multirresistentes.

Palavras chave: MRS, colonização, MRSP, multirresistentes, pequenos animais.

6.2 INTRODUÇÃO

O gênero *Staphylococcus* está presente na pele e na microbiota de humanos e animais, sendo responsáveis por causar infecções oportunistas. Até hoje, sete espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva foram identificadas: *Staphylococcus aureus*, *S. schleiferi* subsp. *coagulans*, *S. hyicus*, *S. lutrae* e o grupo *Staphylococcus intermedius*, composto pelas espécies: *S. intermedius*, *S. delphini*, and *S. pseudintermedius* (DEVRIESE et al., 2005; SASAKI et al., 2007). Em cães, o *S. pseudintermedius* é o patógeno mais frequentemente isolado, principalmente em infecções de pele e otites, tanto em infecções comunitárias como em infecções hospitalares (WEESE e VAN DUIJKEREN, 2010).

Nos últimos anos tem se observado um aumento significativo da resistência antimicrobiana em pequenos animais, principalmente os *Staphylococcus* resistentes aos antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos (SFACIOTTE et al., 2015). Tal resistência a essas drogas pode ocorrer por dois mecanismos: a) produção excessiva de uma enzima chamada betalactamase, codificada pelo gene *blaZ* (LOWY, 2003); b) produção de uma proteína adicional de ligação a penicilina (PBP2a) que possui baixa afinidade ao anel beta-lactâmico, principal estrutura da classe desses antimicrobianos, codificada pelos genes *mecA* ou *mecC* (CASTELLANO-GONZALEZ et al., 2009; ITO et al., 2012). A presença do gene *mecA* ou *mecC* confere resistência a todos os antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos, com exceção das cefalosporinas de quinta geração, e os isolados de *Staphylococcus* com sua presença são chamados de *Staphylococcus* meticilina resistente (MRS).

Em cães e gatos, infecções por *Staphylococcus pseudintermedius* resistente a meticilina (MRSP) são mais frequentes do que aquelas causadas por *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA), já em humanos é diferente, pois MRSP raramente causa infecções (LOZANO et al., 2017, ROBB et al. 2017; BI et al., 2018). Muitos MRS são resistentes a outras classes de antimicrobianos além dos beta-lactâmicos, o que facilita sua sobrevivência no ambiente, principalmente em um hospital veterinário, onde sua disseminação é facilitada pela excreção e transportes por animais doentes, pelos profissionais da saúde, além da grande utilização de antimicrobianos de diversas classes vários antimicrobianos são utilizados (FEßLER et al., 2018).

A presença dos MRS não está restrita aos humanos e animais doentes, mas podem também colonizar animais sadios, a equipe veterinária e profissionais que trabalham no hospital veterinário (WEIß et al., 2013; WALTER et al., 2016), bem como o ambiente hospitalar, o que facilita a disseminação desse patógeno em ambos os sentidos entre humanos e animais. Por isso é de suma importância rastrear os MRS não só nos animais hospitalizados, mas também no

ambiente e nas pessoas que frequentam comumente o hospital veterinário afim de estabelecer possíveis rotas de transmissão e impedir a disseminação desses micro-organismos (FEßLER et al., 2018).

O objetivo do presente estudo foi investigar a presença de MRS em animais hospitalizados, em funcionários e alunos de um hospital veterinário universitário, bem como no ambiente hospitalar, além de identificar as principais espécies de *Staphylococcus* presentes e seu perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.

6.3 MATERIAIS E MÉTODOS

O Hospital de Clínica Veterinária (HCV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) está localizado na cidade Lages e atende em média cinco mil animais por ano. São responsáveis pelo atendimento do HCV professores e médicos veterinários, além de residentes de clínica e cirurgia de pequenos animais auxiliados por alunos do curso de medicina veterinária e enfermeiros. Na sua estrutura, o HCV é composto pela recepção, ambulatórios, sala de emergência, canil, solário, gatil, consultório para atendimento de felinos, sala de vacinas, sala de Raio X, sala de laudos, pós operatório, pré operatório e tricotomia, salas de fisioterapia, esterilização, centros cirúrgicos, sala de técnica operatória, sala de anestesia, vestiário masculino e feminino, banheiro feminino e masculino, laboratório de análises clínicas e corredores

6.3.1 Amostras dos animais

Durante o período de setembro a dezembro de 2017, foram coletados *swabs* nasais de 81 cães e 25 gatos selecionados aleatoriamente no momento da internação no HCV e outro *swab* após a alta dos pacientes do hospital veterinário. Os *swabs* foram previamente umidificados com solução salina 0,85% estéril para realização das coletas. Foram utilizadas nesse estudo apenas as amostras de animais que permaneceram por mais de três dias hospitalizados.

6.3.2 Amostras do ambiente

A coleta foi realizada no mês de setembro de 2017, em um único dia, sendo as amostras coletadas em *pool* de acordo com cada ambiente do hospital. Em determinados ambientes, mais de um *pool* foi coletado, o que foi definido levando em consideração o tamanho do ambiente e o fluxo de animais e pessoas do local. Os *pools* compreenderam: amostras de superfícies (mesa

de procedimento, chão, armários, balança), instrumentos (estetoscópios, otoscópio, termômetros, traqueotubos), maçanetas, pias, entre outros (pote de ração e água, coleiras, focinheiras, colar elisabetano, gaiolas) de acordo com cada ambiente. No total foram coletados 94 *pools* de 39 ambientes distintos do HCV.

6.3.3 Amostra das pessoas

As amostras humanas foram fornecidas voluntariamente após o consentimento informado de cada voluntário seguida de uma breve instrução de forma aleatória conforme o dia de trabalho. Ao todo, foram coletados 20 *swabs* nasais (o mesmo para as duas narinas) de funcionários (2), médicos veterinários (5), professores (3) e alunos de graduação e pós-graduação (10) envolvidos na rotina do HCV.

6.3.4 Identificação fenotípica de MRS

Após a coleta os *swabs* foram depositados em tubos contendo 2 mL de caldo BHI suplementado com 7,5% de NaCl e levados até o Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA) do CAV-UDESC, onde foram incubados a 37°C por 24h. Após incubação, as amostras foram semeadas em ágar Mueller Hinton contendo 4% de NaCl e 6 mg/L de oxacilina e incubadas novamente a 37°C por 24h. As amostras que apresentaram crescimento foram submetidas ao teste de disco difusão com oxacilina (1 µg) e cefoxitina (30 µg), sendo que as amostras que apresentaram resistência a pelo menos um dos discos de antimicrobiano testados seguiram para coloração de Gram e testes bioquímicos para identificação fenotípica das principais espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva: catalase, oxidase, coagulase com plasma de coelho, uréase, teste de Voges-Proskauer (VP), fermentação da sacarose e trealose e resistência a polimixina B.

6.3.5 Teste de susceptibilidade antimicrobiana

As cepas identificadas como MRS foram testadas quanto ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos através da técnica de disco difusão utilizando os seguintes discos: Beta-lactâmico: penicilina G (10U); Aminoglicosídeo: gentamicina (10 µg), amicacina (30 µg) e tobramicina (10 µg); Macrolídeo: eritromicina (15 µg); Lincosamida: clindamicina (2 µg); Ansamicina: rifampicina (5 µg); Fenicóis: cloranfenicol (30 µg); Nitrofurantoína: nitrofurantoína (10 mcg); Fluoroquinolona: enrofloxacina (5 µg), norfloxacina (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), marbofloxacina (5 µg) e levofloxacina (5 µg); Tetraciclinas: tetraciclina (30 µg) e doxiciclina (30 µg); Inibidor do ácido fólico: trimethoprim-sulfamethoxazole (25 µg).

Foi realizado através da técnica de concentração inibitória mínima com fita de E-test de vancomicina a identificação de *Staphylococcus* vancomicina resistente (VRS). O halo de inibição ao redor de cada disco de antibiótico foi mensurado e interpretado usando critérios estabelecidos pelo CLSI animal (2018) e humano (2019). A cepa de referência *Escherichia coli* ATCC 25922 foi usada como controle de qualidade para determinação da susceptibilidade aos agentes antimicrobianos.

6.3.6 Extração do DNA bacteriano

Foi realizada a extração de DNA de todas as amostras fenotipicamente sugestivas de MRS isoladas dos animais, das pessoas e do ambiente através do protocolo descrito por Parussolo et al (2019) para identificação da espécie de *Staphylococcus* coagulase positiva e para detecção do gene que confere resistência aos beta-lactânicos. A mensuração da concentração de DNA foi realizada pelo equipamento Nanodrop (Thermofisher, Waltham, USA). Para a técnica de PCR, a concentração de DNA foi ajustada para 15-100 ng.

*6.3.7 Confirmação molecular de *Staphylococcus coagulase* positiva e detecção dos genes de resistência aos beta-lactânicos*

Para identificação das espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva foi realizada a técnica de multiplex PCR conforme descrito por Sasaki et al (2010). Já para identificação dos genes *blaZ*, *mecA* e *mecC*, foi seguido o protocolo de Nakadomari et al (2019). Os fragmentos amplificados foram submetidos a técnica de eletroforese com gel de agarose 2% (100V, 300mA) por 1 h, utilizando GelRedTM e, a visualização em transilluminator. A cepa padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 43300) foi usada como controle positive (Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz) e a cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 foi usada como controle negativo.

6.4 RESULTADO E DISCUSSÃO

6.4.1 Amostras dos animais

Dos 81 cães e 25 gatos (n=106), 49,38% (n=40) e 44% (n=11) respectivamente estavam colonizados por MRS, totalizando 51 animais (48,11%), indicando uma prevalência alta nos animais do HCV. Desses animais 60,79% (n=31) chegaram ao hospital veterinário de ensino de Lages (Brasil) colonizados por MRS, sendo que nenhum deles apresentava uma infecção ativa por MRS, alguns eram saudáveis (n=19) ou tinham doenças (n=32) não relacionadas com o MRS. Essa taxa de colonização foi superior a encontrada em estudos realizados em hospitais

veterinários de ensino em Ohio - EUA (Hoet et al,2013) e na Bélgica (Vanderhaeghen et al., 2011) , os quais evidenciaram taxas de 5,7% e 1,7%, respectivamente, dos animais colonizados por MRS assim que deram entrada no hospital. Segundo Loeffler et al. (2010) e Morris et al. (2012), a colonização de cães por MRS pode ser transitória e o micro-organismo pode não ser isolado novamente em amostragens seguintes, corroborando com o evidenciado nesse estudo em 21,57% casos.

Como houveram momentos distintos de coleta, sendo esta realizada em todos os animais no momento de entrada e saída do hospital e em alguns casos também foram realizadas coletas durante o período de hospitalização (> 5 dias), foram isoladas amostras de MRS dos 51 animais colonizados, sendo que em 39,21% (n=20) a colonização por MRS foi identificada somente após três dias de hospitalização, mesmo sem esse patógeno estar correlacionado com infecção hospitalar.

Segundo Lehner et al. (2014), quanto maior o tempo de hospitalização de um animal, maiores são as chances de colonização e até mesmo de uma infecção hospitalar por MRS. Gronthal et al (2014) afirma ainda que em situações de surtos por patógenos multirresistentes em infecções hospitalares o número de pacientes colonizados é superior que os infectados devido aos fatores de risco do ambiente hospitalar, o que corrobora com o observado nesse estudo.

Foram isoladas 76 amostras de MRS a partir dos animais colonizados, sendo que 52,63% (n=40) foram identificadas como *Staphylococcus aureus* (MRSA), 40,76% (n=31) como *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) e 6,58% (n=5) como *Staphylococcus schleiferi* (MRSS). Apesar do MRSP ser mais frequente em cães e gatos do que o MRSA (LOZANO et al., 2016; BI et al., 2018), no presente estudo foi evidenciado uma maior taxa de colonização por MRSA.Uma possível explicação para esse fato pode ser a utilização do parâmetro de ponto de corte de resistência a oxacilina para o *S. aureus* ($MIC > 4 \mu\text{g/mL}$), pois até o momento da coleta das amostras ainda não existia um padrão para o *S. pseudintermedius*, esse surgiu apenas no ano seguinte com um valor muito inferior ($MIC > 0,25 \mu\text{g/mL}$), e isso pode ter colaborado para uma maior quantidade de MRSA. Já em relação ao MRSS não se tem muitos relatos mostrando sua prevalência, uma vez que esse micro-organismo é menos frequente, porém, Hanselman, Kruth e Weese (2008) encontraram uma prevalência de 0,5% em cães de um hospital veterinário no Canadá, valor esse abaixo do encontrado no presente estudo, 6,56%.

Em relação a identificação genotípica dos genes de resistência para os beta-lactâmicos, todos os MRS fenotipicamente identificados apresentaram o gene *mecA*, 94,74% (n=72)

apresentaram o gene *blaZ* e nenhum isolado apresentou o gene *mecC.*, mostrando a eficiência da triagem para identificação desse micro-organismo. Uma vez apresentado o gene *mecA*, o patógeno é reportado como resistente a todos os antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos, uma das principais classes utilizadas no tratamento de infecções nos animais.

Foram utilizados 16 antimicrobianos de nove classes distintas (fora a classe dos beta-lactâmicos) para a determinação do perfil de susceptibilidade dos MRS, sendo que 89,48% (n=68) foram considerados multirresistentes, ou seja, apresentaram resistência a pelo menos um antimicrobiano de três classes diferentes. Dois MRS (2,63%), sendo um MRSP de um cão hospitalizado devido a fratura no fêmur e um MRSA de um gato que realizou uma orquiectomia, foram resistentes a todas as classes de antimicrobianos testadas. No Brasil não se tem relatos sobre o perfil de resistência de isolados MRS na veterinária, porém, índices elevados de resistência aos antimicrobianos não beta-lactâmicos (macrolídeos, lincosamidas, fluorquinolonas e tetraciclínas) já foram reportados em diversas partes do mundo (KADLEC et al., 2010; PERRETN et al., 2010; KAWAKAMI et al., 2010).

As menores taxas de resistência antimicrobiana foram referentes a vancomicina (0,9%, n=1), teicoplanina (6,58%, n=5), cloranfenicol (6,58%, n=5), rifampicina (25%, n=19) e amicacina (34,51%, n=26), que segundo Bond e Loeffler (2012) e Wang et al. (2012) são os principais antimicrobianos aos quais os MRS são sensíveis, porém, apesar de estarem entre as menores, a rifampicina e a amicacina ainda apresentaram uma resistência relativamente alta.

Já os antimicrobianos que os MRS apresentaram maiores resistências foram: clindamicina (86,84%, n=66), eritromicina (84,21%, n=64), sulfazotrim (68,42%, n=52), enrofloxacina (67,11%, n=51) e ciprofloxacina (60,53%, n=46). Altos índices de resistência em isolados de MRS dificultam o tratamento de possíveis infecções causadas por esses micro-organismos, sendo que na veterinária, devido ao sofrimento e ao bem-estar animal, os animais afetados correm o risco de serem eutanasiados. (PERRETN et al., 2010; VAN DUIJKEREN et al., 2011).

De acordo com Monchique (2013), na medicina veterinária ainda não se tem relatos de *Staphylococcus aureus* vancomicina resistente (VRSA) causando infecções nos animais. No presente trabalho, apenas um isolado apresentou resistência intermediária à vancomicina (MIC = 6 µg/mL), porém o micro-organismo em questão é um MRSP e ainda não existe um padrão de referência para a determinação ou não da resistência, necessitando de maiores estudos em relação a esse isolado.

6.4.2 Amostras do ambiente

Micro-organismos MRS foram isolados em 77 (81,92%) dos 94 *pools* coletados de 39 ambientes diferentes, sendo a sala dos professores que atendem no hospital veterinário, o único local onde não foi encontrado os micro-organismos em questão. Dos 77 isolados de MRS, foi possível identificar 85,71% (n=66) como MRSP e 14,29% (n=11) como MRSA. Bactérias oportunistas associadas a infecções hospitalares em humanos e animais, incluindo o MRS (Wieler et al., 2014), acumulam fatores que conferem resistência aos antimicrobianos, o que possibilita a sua adaptação no ambiente hospitalar (Walther et al., 2014). Detectar esses micro-organismos no ambiente representa um grande problema em saúde pública, pois põe em risco os pacientes hospitalizados e a segurança do local de trabalho de médicos veterinários e estudantes de medicina veterinária que possuem uma rotina e estão constantemente expostos a esses micro-organismos.

O HVC da UDESC é considerado um hospital de referência na região serrana de Santa Catarina e atende animais da cidade de Lages e de cidades vizinhas, esse fator aumenta ainda mais a diversidade bacteriana presente no ambiente hospitalar e consequentemente a troca de material genético entre os micro-organismos, além de possibilitar uma maior disseminação de MRS para a comunidade, se não forem tomadas medidas necessárias para identificação e eliminação desses agentes do ambiente.

O presente estudo não teve como objetivo identificar casos de infecção hospitalar na medicina veterinária, porém, segundo Stull e Weese (2015) o assunto vem ganhando grande importância no cenário mundial, principalmente com o aumento da expectativa de vida dos animais e da sua proximidade com o ser humano. Além desses fatores, o progresso médico e os avanços nas técnicas de diagnóstico na veterinária vêm crescendo constantemente, o que levou ao aumento da hospitalização dos animais, do número de animais que recebem implantes cirúrgicos e da detecção de doenças crônicas e imunossupressoras (WIELER et al., 2014). Por todos esses motivos, a detecção de micro-organismos como os MRS no ambiente é de extrema importância para a elaboração de medidas que evitem a sua disseminação no ambiente hospitalar.

Assim como nas amostras dos animais, todos os MRS isolados do ambiente apresentaram o gene *mecA*, 33,17% (n=24) apresentaram o gene *blaZ* e nenhum isolado possuía o gene *mecC*.

As duas classes de antimicrobianos que os MRS apresentaram maior resistência foram os macrolídeos (88,31%, n=68) e as fluorquinolonas (75,32%, n=58). Esses resultados são similares aos encontrados por Feßler et al. (2018) na Alemanha, porém detectando genes de

resistência para essas classes. Multirresistência foi verificada em 89,61% (n=69) dos MRS, sendo que um MRSA foi sensível apenas à vancomicina, o qual foi isolado no solário, área destinada a banho de sol dos animais.

Uma das grandes preocupações observadas nesse trabalho é que os MRS foram isolados não apenas nos locais com grande circulação de animais, mas também em ambientes que deveriam conter o mínimo de contaminação, como os centros cirúrgicos e a sala de técnica operatória, indicando que os protocolos de limpeza e desinfecção dessas áreas e/ou a restrição da entrada de pessoas não estão sendo seguidas corretamente. Dados distintos foram observados por Feßler et al. (2018), na Alemanha, que não detectaram MRS nesses ambientes. Além dos centros cirúrgicos, também foram isolados MRS em banheiros e na cozinha do hospital mostrando a grande disseminação de micro-organismos multirresistentes dentro do hospital veterinário e a negligência com a higienização pelos profissionais de saúde.

6.4.3 Amostras das pessoas

Já em relação as pessoas, 90% (n=18) estavam colonizadas por MRS, sendo 66,66% (n=12) por MRSA e 33,33% (n=6) por MRSP. Segundo Walther et al. (2017), as pessoas que trabalham no hospital veterinário possuem grande potencial para adquirir doenças de pacientes animais (zoonoses), além de sofrerem colonização por micro-organismos multirresistentes. No Brasil isso está muito mais sujeito a acontecer uma vez que um hospital veterinário não tem a obrigatoriedade de possuir uma Comissão de Controle de Infecção Hospitalar que teria como objetivo além de prevenir a disseminação de micro-organismos multirresistentes entre os animais, mas também monitorar e impedir a disseminação desses patógenos no ambiente e nas pessoas que fazem parte da rotina do hospital.

Todos os isolados de MRS apresentavam o gene *mecA* e nenhum o *mecC*. Essa prevalência de 90% de colonização nos funcionários e alunos do hospital veterinário está muito acima das encontradas por Feßler et al. (2018) na Alemanha, por Sasaki et al. (2007), no Japão, Heller et al. (2009), na Escócia e Loeffler et al. (2005) no Reino Unido (9,6%, 10%, 3,1% e 19,9%, respectivamente).

Dez dos 18 (55,55%) MRS isolados das pessoas foram considerados multirresistentes, sendo as classes que apresentaram maiores índices foram os macrolídeos (n=14) e as fluorquinolonas (n=10). Os dados observados nesse estudo mostram a disseminação de MRS multirresistente no hospital veterinário bem como a preocupação da colonização de animais e pessoas que são potenciais reservatórios para esses patógenos, servindo como fonte de disseminação na comunidade.

6.5 CONCLUSÃO

O presente trabalho identificou o MRSA como principal espécie de *Staphylococcus* colonizando cães e gatos em um hospital veterinário escola no Brasil, além de ser o principal isolado dos funcionários. Já no ambiente, o MRSP foi o mais prevalente. Os MRS não só possuem resistência frente aos beta-lactâmicos como também apresentaram alta resistência a outras classes de antimicrobianos, sendo identificados muitos MRS multirresistentes. A presença de MRSA, MRSP e MRSS nos animais, nos funcionários e no ambiente evidenciam a grande disseminação desses patógenos dentro de um hospital veterinário. A negligência que se evidencia em muitos hospitais veterinários no Brasil quanto a higienização, fluxo de pessoas, lavagem de mãos e protocolos de limpeza e desinfecção contribuem para a disseminação do MRS e outros micro-organismos multirresistentes. A falta de uma Comissão de Controle de Infecção Hospitalar também dificulta a identificação desses patógenos e a maior chance de sua disseminação, o que deixa os animais internados, os tutores desses animais, os médicos veterinários, residentes, alunos e funcionários expostos a micro-organismos capazes de causar infecções hospitalares também nos humanos, ou seja, acaba se estabelecendo um grande problema em saúde pública

6.6 REFERENCIAS

- BENDER, J.B.; SCHIFFMAN, E.; HIBER, L.; et al. 2012. Recovery of staphylococci from computer keyboards in a veterinary medical centre and the effect of routine cleaning. **Vet Record.** 170(16):414–416
- BI, Z., SUN, C., BÖRJESSON, S., et al. 2018. Identical genotypes of community-associated MRSA (ST59) and livestock-associated MRSA (ST9) in humans and pigs in rural China. **Zoonoses Public Health.** 65:367-371.
- BOND, R.; LOEFFLER, A. 2012. What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. **J Small Anim Pract** 53(3):147–54.
- CASTELLANO-GONZALEZ, M. J.; PEROZO-MENA, A. J.; VIVAS-VEJA, R. L., et al. 2009. Molecular and phenotypical typification of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains in a university hospital. **Rev Chilena de Infec.** 26(1):39-48.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018. Performance standards for Antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals. 5th ed. CLSI standard VET01. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2019. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 29th ed. CLSI Supplement M100. Wayne, Pennsylvania, USA. CLSI.

DEVRIESE, L.A.; VANCANNEYT, M.; BAELE, M., et al. 2005. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 55:1569-1573.

FEßLER, A.T.; SCHUNEMANN, R.; KADLEC, K., et al. 2018. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) among employees and in the environment of a small animal hospital, **Veterinary Microbiology**, 221:153-158.

GHOSH, A.; KUKANICH, K.S.; BROWN, C.E.; et al. 2012. Resident cats in small animal veterinary hospitals carry multidrug resistant enterococci and are likely involved in crosscontamination of the hospital environment. **Frontiers in Microbiol.**, 3:1-14.

GRONTHAL, T., MOODLEY, A., NYKASENOJA, S., et al. 2014. Large outbreak caused by methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71 in a Finnish Veterinary Teaching Hospital—from outbreak control to outbreak prevention. **PLoS One** 9:e110084.

HANSELMAN, B.A.; KRUTH, S.; WEESE, J.S. 2008. Methicillin-resistant staphylococcal colonization in dogs entering a veterinary teaching hospital. **Vet Microbiol** 126:277–81.

HELLER, J., ARMSTRONG, S.K., GIRVAN, E.K., et al. 2009. Prevalence and distribution of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* within the environment and staff of a university veterinary clinic. **J Small Anim Pract.** 50:168-173.

HOET, A.E., VAN BALEN, J., NAVA-HOET, R.C., et al. 2013. Epidemiological Profiling of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* -Positive Dogs Arriving at a Veterinary Teaching Hospital. **Vector borne and zoonotic diseases**, 13(6):1089.

ITO, T.; HIRAMATSU, K.; TOMASZ, A., et al. 2012. Guidelines for reporting novel meca gene homologues. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 56(10):4997-4999.

KADLEC, K.; SCHWARZ, S.; PERRETER, V., et al. 2010. Molecular analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* of feline origin from different European countries and North America. **J Antimicrob Chemother** 65:1826–37.

KAWAKAMI, T.; SHIBATA, S.; MURAYAMA, N, et al. 2010. Antimicrobial susceptibility and methicillin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolated from dogs with pyoderma in Japan. **J Vet Med Sci** 72:1615–9.

LEHNER, G., LINEK, M., BOND, R., et al. 2014. Case-control risk factor study of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) infection in dogs and cats in Germany. **Vet. Microbiol.** 168:154–160.

LOEFFLER, A., BOAG, A.K., SUNG, J., et al. 2005. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK. **J Antimicrob Chemother.** 56:692-697.

LOEFFLER, A.; PFEIFFER, D.U.; LINDSAY, J.A., et al. 2010. Lack of transmission of methicillinresistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) between apparently healthy dogs in a rescue kennel. **Vet Microbiol** 141:178–81.

LOWY, F. D. 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Investigation** 111(9):1265-1273.

LOZANO, C., GHARSA, H., BEN SLAMA, K., et al. 2016. *Staphylococcus aureus* in animals and food: methicillin resistance, prevalence and population structure. **African Continent. Microorganisms.** 4(1).

LOZANO, C., REZUSTA, A., FERRER, I., et al. 2017. *Staphylococcus pseudintermedius* human infection cases in Spain: dog-tohuman transmission. **Vector Borne Zoonotic Dis.** 17:268-270.

MONCHIQUE, C. R. O. Evolução da resistência aos antibióticos em *staphylococcus* spp. -1999 a 2006. 2013. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, Lisboa.

MORRIS, D.O.; LAUTENBACH, E.; ZAOUTIS, T., et al. 2012. Potential for pet animals to harbour methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* when residing with human MRSA patients. **Zoonoses Public Health** 59:286–93.

NAKADOMARI, G.H.; CHARALO, A.C.; PAVAN, A.C.L., et al. 2019. Multiplex-PCR for detection of beta-lactam resistance in *Staphylococcus* spp. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, IN PRESS.

PARUSSOLO, L.; SFACIOTTE, R.A.P.; DALMINA, K.A., et al. 2019. Detection of virulence genes and antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* isolates from raw milk and artisanal cheese in Southern Brazil. **Semina: ciências agrárias**, 40(1):163-179.

PERRETTEN, V.; KADLEC, K.; SCHWARZ, S., et al. 2010. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. **J Antimicrob Chemother** 65:1145–54.

ROBB, A.R., WRIGHT, E.D., FOSTER, A.M.E., et al. 2017. Skin infection caused by a novel strain of *Staphylococcus pseudintermedius* in a Siberian husky dog owner. **JMM Case Rep.** 4(3):005087.

SASAKI, T., TSUBAKISHITA, S., TANAKA, Y., et al. 2010. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. **J Clin Microbiol** 48:765-769.

SASAKI, T.; KIKUCHI, K.; TANAKA, Y., et al. 2007. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. **J. Clin. Microbiol.** 45:2770-2778.

- SFACIOTTE, R.A.P.; CORONEL, L.G.; OSAKI, S.C., et al. 2015. Gram-positive bacterial resistant strains of interest in animal and public health. **Semina: Ciências Agrárias** 36(4):2693-2712.
- STULL, J.W.; WEESE, J.S. 2015. Hospital-Associated Infections in Small Animal Practice. **Vet Clin Small Anim.**, 45:217–233.
- VAN DUIKEREN, E., MOLEMAN, M., VAN OLDRIUTENBORGH-OOSTERBAAN, M.M.S., et al. 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in horses and horse personnel: an investigation of several outbreaks. **Vet. Microbiol.** 141:96–102.
- VANDERHAEGHEN, W.; VAN DE VELDE, E.; CROMBE, F., et al. 2011. Screening for methicillinresistant staphylococci in dogs admitted to a veterinary teaching hospital. **Res Vet Sci** 93(1):133–6.
- WALTER, J.; ESPELAGE, W.; CUNY, C., et al. 2016. Veterinarians visiting swine farms are at high risk for colonization with livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Clin Infect Dis.** 62:126-128.
- WALTHER, B., HERMES, J., CUNY, C., et al. 2012. Sharing more than friendship--nasal colonization with coagulase-positive staphylococci (CPS) and co-habitation aspects of dogs and their owners. **PLoS One.** 7:e35197.
- WALTHER, B., LUEBKE-BECKER, A., STAMM, I., et al. 2014. Suspected nosocomial infections with multi-drug resistant *E. coli* including extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strains, in an equine clinic. **Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.** 127:421–427.
- WALTHER, B.; TEDIN, K.; LÜBKE-BECKER, A. 2017. Multidrug-resistant opportunistic pathogens challenging veterinary infection control, **Vet. Microbiol.** 71–78.
- WANG, Y.; YANG, J.; LOGUE, C.M., et al. 2012. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from canine pyoderma in North China. **J Appl Microbiol** 112:623–30.
- WEESE, J.S.; VAN DUIKEREN, E. 2010. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. **Vet Microbiol.** 140:418–429.
- WEIß, S., KADLEC, K., FEßLER, A.T., SCHWARZ, S. 2013. Identification and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus* and *Staphylococcus pettenkoferi* from a small animal clinic. **Vet Microbiol.** 167:680-685.
- WIELER, L.H., WALTHER, B., VINCZE, S., et al. 2014. Infections with multidrug-resistant bacteria: has the post-antibiotic era arrived in companion animals? In: Sing, A. (Ed.), **Zoonoses – Infections Affecting Humans and Animals: Focus on Public Health Aspects**. Springer, Oberschleißheim, pp. 433ff.

7 ARTIGO 4

Detecção de micro-organismos produtores de carbapenemases e beta-lactamase do tipo ampC isolados de animais em um hospital veterinário escola no Brasil.

7.1 RESUMO

A detecção de micro-organismos produtores de carbapenemases na clínica de pequenos animais é recente, sendo que os carbapenêmicos tem seu uso limitado na clínica de cães e gatos. O objetivo do presente estudo foi detectar micro-organismos produtores de carbapenemases e/ou betalactamase do tipo ampC (CP) em cães e gatos hospitalizados em um hospital veterinário de ensino no Brasil. Foram coletados swabs retais de 81 cães e 25 gatos selecionados aleatoriamente no momento da internação no HCV e outro swab após a alta dos pacientes do hospital veterinário. Para a identificação dos micro-organismos foi utilizado o sistema Bactray e posteriormente o MALDI-TOF. A confirmação de Enterobactérias produtoras de carbapenemases foi realizada segundo a Nota Técnica nº 01/2013 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Para micro-organismos não pertencentes à família *Enterobacteriaceae* foi realizado o teste de sensibilidade aos antimicrobianos com meropenem, ertapenem e imipenem. As cepas identificadas como CP foram testadas quanto ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos. Os isolados foram submetidos a técnicas de multiplex PCR para detecção dos genes GES, IMP, VIM, KPC, OXA-48, SPM, NDM e a detecção dos genes ampC (FOX, MOX, ACC, CMY, DHA, LAT, CIT e EBC). Foi possível identificar micro-organismos CP em 13,21% (n=14, sendo 13 cães e um gato). Em quatro animais a colonização por CP foi identificada somente após três dias de hospitalização, mesmo sem esse patógeno estar correlacionado com infecção hospitalar. Apenas um animal colonizado foi hospitalizado sem apresentar uma doença aparente. Foram detectados os genes KPC (3), NDM (7), SPM (3), OXA-48 (3) e os genes FOX (3), ACC (4) e ACT (3). Esse estudo cria um alerta para maiores investigações epidemiológicas frente a esses micro-organismos pois a sua detecção em animais hospitalizados é um risco não só para os outros animais, mas também para as pessoas que circulam no hospital veterinário, uma vez que eles são responsáveis por causar infecções hospitalares em humanos.

Palavras-chave: KPC, NDM, SPM, OXA-48, multirresistentes.

7.2 INTRODUÇÃO

A resistência aos beta-lactâmicos em bacilos Gram negativos e sua disseminação vem se tornando um problema emergente em todo mundo nos últimos anos, principalmente em casos de infecções hospitalares, levando ao aumento da mortalidade de pacientes e aumento dos custos com hospitalizações (GENC, AKSU e GULCAN, 2016). Os carbapenêmicos são antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos e são considerados a última escolha para tratamentos, usados inclusive em micro-organismos produtores de ESBL, sendo frequentemente utilizados para tratamento de infecções hospitalares humanas (SPELLBERG, 2011; WHO, 2011).

Vários tipos de carbapenemases já foram descritos em Enterobactérias, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (CANTON et al., 2012; NORDMANN et al., 2012), sendo as mais importante clinicamente: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), as carbapenemases zinco dependente, também conhecidas como metallo-beta-lactamase (Verona integron – VIM, imipenemase – IMP, New Delhi – NDM) e as oxacilinases – 48 (OXA-48) (TZOUVELEKIS et al., 2012; NORDMANN, NAAS, POIREL, 2011).

Entre as enzimas capazes de conferir resistência as cefalosporinas de terceira e quarta geração encontra-se a enzima *ampC*, levando a uma hiperprodução de beta-lactamase (RUMI et al., 2019). Apesar de não ser considerada uma carbapenemase, a enzima *ampC* pode apresentar resistência aos carbapenêmicos quando associada com sistema de efluxo ou alteração na permeabilidade da membrana externa (LIVERMORE; WOODFORD, 2006), sendo a CMY e a FOX, as principais *ampC* com resistência aos carbapenêmicos (JACOB, 2009).

Recentemente, vários estudos têm reportado a detecção de carbapenemases em micro-organismos isolados de alimentos e de animais de produção (CHABOU et al., 2018; FISCHER et al., 2017), porém são escassos os estudos em pequenos animais (CUI et al., 2018), o que dificulta estabelecer um panorama global a respeito da resistência bacteriana nesses animais (MELO et al., 2018). A detecção de micro-organismos produtores de carbapenemases na clínica de pequenos animais é recente, somente em 2013 foram reportados os primeiros casos de cães e gatos infectados por *E. coli* produtoras da enzima NDM (SHAHEEN et al., 2013), mesmo ano que ocorreu o primeiro relado de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras da enzima OXA-48 em cães na Alemanha (STOLLE et al., 2013).

Diferentemente do que acontece com as cefalosporinas de terceira e quarta geração, os carbapenêmicos tem seu uso limitado na clínica de cães e gatos, dificultando o estabelecimento de um cenário epidemiológico da resistência a esses antimicrobianos e subestimando a sua detecção nesses animais (POIREL et al., 2014). Assim, o objetivo do presente estudo foi

detectar micro-organismos produtores de carbapenemases e/ou betalactamase do tipo ampC em cães e gatos hospitalizados em um hospital veterinário de ensino no Brasil.

7.3 MATERIAIS E METODOS

7.3.1 Amostras

O Hospital de Clínica Veterinária (HCV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) está localizado na cidade Lages e atende em média cinco mil animais por ano, sendo um hospital de referência em toda a região. Durante o período de setembro a dezembro de 2017, foram coletados *swabs* retais de 81 cães e 25 gatos selecionados aleatoriamente no momento da internação no HCV e outro *swab* após a alta dos pacientes do hospital veterinário. Os *swabs* foram previamente umidificados com solução salina 0,85% estéril para realização das coletas. Foram utilizadas nesse estudo apenas amostras de animais que permaneceram por mais de três dias hospitalizados não levando em consideração o motivo do internamento.

7.3.2 Detecção fenotípica de micro-organismos produtores de carbapenemase e/ou ampC

Para detecção de micro-organismos produtores de carbapenemases e/ou ampC com resistência aos carbapenêmicos (CP), os *swabs* coletados foram colocados em 10 mL de Caldo BHI com discos de ertapenem e ampicilina e levados até o Centro de Diagnóstico Microbiológico Animal (CEDIMA) da UDESC e incubados a 37°C por 12-16h. Depois as amostras foram estriadas em ágar MacConkey onde foram colocados discos de ertapenem no início e fim das estrias e incubadas a 37°C por 24h. Testes bioquímicos foram realizados com as colônias que crescerem dentro do halo de ertapenem menor ou igual a 27 mm para identificação do micro-organismo com auxílio do sistema de identificação Bactray e posteriormente por MALDI-TOF. Para confirmação de Enterobactérias produtoras de carbapenemases foram realizados testes de acordo com a Nota Técnica nº 01/2013 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2013). Para micro-organismos não pertencentes à família *Enterobacteriaceae* foi realizado o teste de sensibilidade aos antimicrobianos com os principais discos da classe dos carbapenêmicos (meropenem, ertapenem e imipenem). As cepas de referência CCBH5991 *Klebsiella pneumoniae* (KPC), CCBH23559 *Klebsiella pneumoniae* (OXA-48), CCBH15948 *Klebsiella pneumoniae* (NDM) e CCBH23579 *Pseudomonas aeruginosa* (SPM), cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) foram utilizadas como controle positivo para detecção fenotípica das carbapenemases.

7.3.3 Teste de susceptibilidade antimicrobiana

As cepas identificadas como produtoras de carbapenemases e/ou ampC foram testadas quanto ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos através da técnica de disco difusão utilizando os seguintes discos: Beta-lactâmicos: ticarcilina (75 µg); Aminoglicosídeos: gentamicina (10 µg), amikacina (30 µg) e tobramicina (10 µg); Fenicóis: cloranfenicol (30 µg); Nitrofurantoína: nitrofurantoína (10 mcg); Fluoroquinolona: enrofloxacina (5 µg), norfloxacina (10 µg), ciprofloxacina (5 µg), marbofloxacina (5 µg) e levofloxacina (5 µg); Tetraciclina: tetraciclina (30 µg) e doxiciclina (30 µg); Inibidores do ácido fólico: trimethoprim-sulfamethoxazole (25 µg). O halo de inibição ao redor de cada disco de antibiótico foi mensurado e interpretado usando critérios estabelecidos pelo CLSI animal (2018) e humano (2019). A cepa de referência *Escherichia coli* ATCC 25922 foi usada como controle de qualidade para determinação da susceptibilidade aos agentes antimicrobianos.

7.3.4 Extração do DNA bacteriano

Foi realizada a extração de DNA de todas as amostras fenotipicamente sugestivas da presença de carbapenemase através do protocolo descrito por Parussolo et al (2019) para identificação dos principais genes produtores de carbapenemase. A mensuração da concentração de DNA foi realizada pelo equipamento Nanodrop (Thermofisher, Waltham, USA). Para a técnica de PCR, a concentração de DNA foi ajustada para 15-100 ng.

7.3.5 Detecção dos genes de resistência ampC e carbapenemases

Os isolados sugestivos de produção de carbapenemase foram submetidos a técnicas de multiplex PCR para detecção dos genes GES, IMP, VIM, KPC e OXA-48 segundo Dallene et al. (2010), assim como para detecção do gene SPM segundo Sader et al. (2005) e do gene NDM de acordo com Yong et al., (2009). Além disso, foi realizada a detecção dos genes ampC (FOX, MOX, ACC, CMY, DHA, LAT, CIT e EBC) segundo Dallene et al. (2010). Os primers utilizados estão dispostos no Tabela 8. Os fragmentos amplificados foram submetidos a técnica de eletroforese com gel de agarose 2% (100V, 300mA) por 1 h, utilizando GelRedTM e, a visualização em transilluminator. As cepas padrão CCBH5991 *Klebsiella pneumoniae* (KPC), CCBH23559 *Klebsiella pneumoniae* (OXA-48), CCBH15948 *Klebsiella pneumoniae* (NDM) and CCBH23579 *Pseudomonas aeruginosa* (SPM) foram usadas como controle positivo para detecção (Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz) e a cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 foi usada como controle negativo.

6.4 RESULTADOS

Dos 106 animais que foram coletados *swabs* retais, foi possível identificar micro-organismos produtores de carbapenemase e/ou beta-lactamase do tipo *ampC* em 13,21% (n=14, sendo 13 cães e um gato). Desses animais, seis chegaram ao hospital veterinário de ensino de Lages colonizados por esses patógenos, sendo que nenhum deles apresentava uma infecção ativa por CP. Como houveram momentos distintos de coleta, sendo esta realizada em todos os animais no momento de entrada e saída do hospital, em quatro animais a colonização por CP foi identificada somente após três dias de hospitalização, mesmo sem esse patógeno estar correlacionado com infecção hospitalar. Os outros quatro animais foram possíveis isolar CP tanto na coleta da entrada do hospital como na alta do paciente, onde apenas um deles apresentou crescimento distinto de micro-organismos. Apenas um animal colonizado fora hospitalizado sem apresentar uma doença aparente, apenas realizou o procedimento de orquiectomia (castração) eletiva. A identificação dos micro-organismos produtores de carbapenemase e/ou *ampC* e a detecção dos genes de resistência atribuídos a eles, estão dispostos na Tabela 9.

Os índices de resistência antimicrobiana para cada droga testada nos 18 isolados estão dispostos no gráfico 1, assim como o perfil de susceptibilidade de cada um dos isolados pode ser encontrado na Tabela 9.

7.5 DISCUSSÃO

Segundo Loeffler et al. (2010) e Morris et al. (2012), a colonização de cães por *Staphylococcus* meticilina resistente (MRS) pode ser transitória e o micro-organismo pode não ser isolado novamente em amostragens seguintes, apesar do presente estudo objetivar o isolamento de bactérias Gram negativas produtoras de carbapenemase e não de MRS, a colonização dos animais por micro-organismos multirresistentes acabam tendo características semelhantes, fato esse comprovado no presente estudo, onde alguns animais apresentaram CP apenas na coleta de admissão do paciente no HCV e confirmando com o animal que foi isolado o *Proteus mirabilis* produtor de carbapenemase na chegada ao HCV e depois de três dias o isolamento de uma *Klebsiella pneumoniae*.

Na medicina veterinária, os antibióticos β-lactâmicos são os mais utilizados para infecções bacterianas (RUBIN e PITOUT, 2014). Nos cães, as cefalosporinas de primeira geração e a amoxicilina / ácido clavulânico estão entre as mais comumente prescritas (MURPHY et al., 2012). O isolamento de micro-organismos produtores de carbapenemase colonizando animais gera um alerta nos profissionais da saúde, pois esses animais não só servem

como fonte de infecção para outros animais que estão hospitalizados, mas também para médicos veterinários, proprietários e no caso do HCV que é um hospital escola, para alunos e professores que fazem parte da rotina hospitalar. O contato com esses micro-organismos sem a sua devida detecção aumenta as chances da disseminação desses patógenos dentro do hospital e para comunidade.

González-Torralba et al. (2016) coletaram 160 amostras de *swab* retal de cães atendidos em um hospital veterinário na Espanha e apenas um (0,62%) dos animais estava colonizado por uma *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (VIM-1), assim como Melo et al. (2016) que isolou apenas uma *E. coli* (de 393 amostras) produtora do gene *blaOXA-48*, valor muito abaixo do encontrado no nosso estudo, o qual 13,21% (n=14) dos animais estavam colonizados. Segundo Stolle et al. (2013), patógenos CP são extremamente raras em animais de companhia, porém acreditam que a sua prevalência seja subestimada, conforme foi provado por esse estudo.

No presente estudo foi detectado três micro-organismos com a presença do gene *blaOXA-48*, uma *Klebsiella pneumoniae*, uma *E. coli* e uma *Pseudomonas aeruginosa*, sendo que até hoje, a presença desse gene em Enterobactérias isoladas de cães, foi detectada apenas na Alemanha (PULSS et al., 2018; SCHMIEDEL et al., 2014), França (MELO et al., 2017), USA (LIU et al., 2016) e Argélia (YOUSFI et al., 2017).

No Brasil, a São Paulo metallo-beta-lactamase (SPM) é a carbapenemase mais comum detectada em cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de humanos, sendo uma enzima até então restrita a esse micro-organismo (MARTINS et al., 2018; ESCANDÓN-VARGAS et al., 2017), porém, na medicina veterinária não existe relatos da detecção desse patógeno, sendo nosso estudo o primeiro a relatar a identificação de *Pseudomonas aeruginosa* com a presença do gene *blaSPM* colonizando pequenos animais em um hospital veterinário.

Na medicina veterinária, o gene KPC-2 foi reportado pela primeira vez no Brasil em uma cepa de *E. coli* causando uma infecção em cão (SELLERA et al., 2018), porém não se tem estudos mostrando a detecção desse gene em micro-organismos colonizando os animais. Três animais desse estudo estavam colonizados por micro-organismos produtores de KPC (duas *Klebsiella pneumoniae* e uma *Pseudomonas aeruginosa*), corroborando com Madec et al. (2017) que dizem que “a detecção de carbapenemases em bactérias isoladas de animais pode representar um novo desafio para a medicina veterinária e uma potencial ameaça à saúde pública”, principalmente quando esse micro-organismo não causam uma infecção, pois dificulta ainda mais sua detecção aumentando as chances de propagação.

Poucos estudos têm mostrado a detecção de NDM em pequenos animais, um estudo recente reportou pela primeira vez a variante NDM-5 em um isolado de *E. coli* de um cão na Argélia (YOUSFI et al., 2016) e, nos USA, outro estudo detectou a variante NDM-1 também em *E. coli* (SHAHEEN et al., 2013). No presente estudo, sete animais estavam colonizados com micro-organismos produtores de carbapenamse do tipo NDM, sendo dois *Proteus mirabilis*, dois *Enterobacter cloacae*, uma *E. coli*, uma *Klebsiella pneumoniae* e uma *Pseudomonas aeruginosa*. Pelo nosso conhecimento esse é o primeiro estudo mostrando a detecção de NDM em animais hospitalizados no Brasil.

As bactérias produtoras de *ampC* podem apresentar resistência aos carbapenêmicos quando associada com a perda de porina bacteriana, principalmente as *ampC* do tipo ACC e ACT (BIDET et al., 2005; BRADFORD et al., 1997) o que pode explicar o fato nesse estudo de três animais apresentaram o gene ACC e a resistência aos carbapenêmicos. Em relação a *ampC* do tipo FOX, geralmente o mesmo plasmídeo carregam também genes de resistência às fluorquinolonas (MARTINEZ-MARTINEZ et al., 1998), apesar de não ter pesquisado esses genes, esse fato foi observado em dois dos animais desse estudo.

O fato de um dos animais do estudo chegar ao HCV saudável, porém colonizado por uma CP e ser hospitalizado para a realização de um procedimento minimamente invasivo (orquiectomia) levanta várias suspeitas a respeito de onde pode ter ocorrido a colonização, podendo ter sido da alimentação do animal, do proprietário ou até mesmo do ambiente em que ele vive. Essas dúvidas fazem com que tenhamos cautela com esses micro-organismos, principalmente com os pequenos animais, e mostram a necessidade de mais estudos para entendermos melhor essa via de transmissão entre animais, seres humanos, alimentos e o meio ambiente.

A falta de uma comissão de controle de infecção hospitalar (CCIH) e a falta de conhecimento a respeito desses micro-organismos multirresistentes na medicina veterinária, principalmente no Brasil, dificultam a detecção desses patógenos e facilita a sua disseminação para comunidade de forma silenciosa. Hoje, no Brasil, são poucos os hospitais que possuem uma CCHI e os que possuem são aqueles que certamente já sofreram com o problema em algum período. Apesar de ser um primeiro passo, o estabelecimento de uma CCHI não resolve o problema, pois na medicina veterinária a negligência com os protocolos de higienização das mãos, limpeza e desinfecção dos ambientes e controle do fluxo de pessoas dentro de um hospital, são enormes, dificultando a ação de medidas preventivas.

7.6 CONCLUSÃO

Esse é o primeiro estudo no Brasil mostrando a colonização de cães e gatos hospitalizados por bactérias (e não somente *E. coli*) produtoras de carbapenemases (KPC, NDM, SPM e OXA-48) bem como os genes *ampC*, o que mostra como esses dados são subestimadas na medicina veterinária. Além disso, esse estudo cria um alerta para maiores investigações epidemiológicas frente a esses micro-organismos pois a sua detecção em animais hospitalizados é um risco não só para os outros animais, mas também para as pessoas que circulam no hospital veterinário, uma vez que eles são responsáveis por causar infecções hospitalares em humanos.

7.7 REFERÊNCIAS

- BIDET, P., BURGHOFFER, B., GAUTIER, V., et al. 2005. In vivo transfer of plasmid-encoded ACC-1 AmpC from Klebsiella pneumoniae to Escherichia coli in an infant and selection of impermeability to imipenem in K. pneumoniae. **Antimicrob Agents Chemother** 49(8):3562-3565.
- BRADFORD, P.A., URBAN, C., MARIANO, N., et al. 1997. Imipenem resistance in Klebsiella pneumoniae is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the foss of an outer membrane protein. **Antimicrob Agents Chemother** 41(3):563-569.
- CANTON, R., AKOVA, M., CARMELI, Y., et al., 2012. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. **Clin Microbiol Infect** 18:413-431.
- CHABOU, S., LEULMI, H., DAVOUST, B., et al. 2018. Prevalence of extended-spectrum β-lactamase- and carbapenemase-encoding genes in poultry faeces from Algeria and Marseille, France. **Journal of Global Antimicrobial Resistance** 13:28-32.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018. Performance standards for Antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals. 5th ed. CLSI standard VET01. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2019. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 29th ed. CLSI Supplement M100. Wayne, Pennsylvania, USA. CLSI.
- CUI, L., LEI, L., LV, Y., et al. 2018. blaNDM-1-producing multidrug-resistant Escherichia coli isolated from a companion dog in China. **J Glob Antimicrob Resist**. 13:24-27.
- DALLENNÉ, C., DA COSTA, A., DECRÉ, D., et al. 2010. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. **J Antimicrob Chemother**. 65(3):490-5.

- ESCANDÓN-VARGAS, K., REYES, S., GUTIÉRREZ, S., VILLEGAS, M.V. 2017. The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. **Expert Rev Anti Infect Ther** 15:277-97.
- FISCHER, J.; SAN JOSÉ M.; ROSCHANSKI, N., et al. 2017. Spread and persistence of VIM-1 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in three German swine farms in 2011 and 2012. **Vet Microbiol** 200:118–23.
- GENC, O.; AKSU, E.; GULCAN, A. 2016. The identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae by using molecular assay and phenotyping confirmation tests. **Journal of Microbiological Methods**, 125:8–11.
- GONZÁLEZ-TORRALBA, A., OTEO, J., ASENJO, A., et al. 2016. Survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in companion dogs in Madrid, Spain. **Antimicrob Agents Chemother** 60:2499–501.
- JACOB, G.A. 2009. AmpC beta-Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, 22(1):161–182.
- LIU, X., THUNGRAT, K., BOOTHE, D.M. 2016. Occurrence of OXA-48 carbapenemase and other β-Lactamase genes in ESBL-producing multidrug resistant Escherichia coli from dogs and cats in the United States, 2009–2013. **Front Microbiol** 7:1057.
- LIVERMORE, D.M., WOODFORD, N. 2006. The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. **Trends in Microbiology**, 14(9):413-420.
- LOEFFLER, A.; PFEIFFER, D.U.; LINDSAY, J.A., et al. 2010. Lack of transmission of methicillinresistant Staphylococcus aureus (MRSA) between apparently healthy dogs in a rescue kennel. **Vet Microbiol** 141:178–81.
- MADEC, J.Y.; HAENNI, M.; NORDMANN, P.; POIREL, L. 2017. Extended-spectrum β-lactamase/AmpC and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in animals: a threat for humans? **Clin Microbiol Infect** 23:826–33.
- MARTINEZ-MARTINEZ, L., PASCUAL, A., JACOBY, G.A. 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. **Lancet** 351(9105):797-799.
- MARTINS, W. M. B. S., NARCISO, A. C., CAYÔ, R., et al. 2018. SPM-1-producing Pseudomonas aeruginosa ST277 clone recovered from microbiota of migratory birds. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 90(3):221–227.
- MELO, L.C., ORESCO, C., LEIGUE, L., et al. 2018. Prevalence and molecular features of ESBL/pAmpC-producing Enterobacteriaceae in healthy and diseased companion animals in Brazil. **Vet Microbiol**. 221:59-66.
- MELO, L.C.; BOISSON, M.N.G.; SARAS, E., et al. 2017. OXA-48 producing ST372 Escherichia coli in a French dog. **J Antimicrob Chemother** 72:1256–8.
- MORRIS, D.O.; LAUTENBACH, E.; ZAOUTIS, T.; et al. 2012. Potential for pet animals to harbour methicillin-resistant Staphylococcus aureus when residing with human MRSA patients. **Zoonoses Public Health** 59:286–293.

MURPHY, C.P., REID-SMITH, R.J., BOERLIN, P., et al. 2012. Out-patient antimicrobial drug use in dogs and cats for new disease events from community companion animal practices in Ontario. **Can Vet J** 53:291-298.

NORDMANN, P.; GNIADKOWSKI, M.; GISKE, C.G.; et al. 2012. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Clin Microbiol Infect.**, 18:432–38.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. 2011. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Emerg. Infect. Dis.** 17:1791–1798.

PARUSSOLO, L.; SFACIOTTE, R.A.P.; DALMINA, K.A., et al. 2019. Detection of virulence genes and antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* isolates from raw milk and artisanal cheese in Southern Brazil. **Semina: ciências agrárias**, 40(1):163-179.

POIREL, L.; STEPHAN, R.; PERRETER, V.; NORDMANN, P. 2014. The carbapenemase threat in the animal world: the wrong culprit. **J Antimicrob Chemother** 69:2007–8.

PULSS, S., STOLLE, I., STAMM, I., et al. 2018. Multispecies and clonal dissemination of OXA-48 carbapenemase in Enterobacteriaceae from companion animals in Germany, 2009—2016. **Front. Microbiol.** 9:1265.

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

SADER, H.S.; REIS, A.O.; SILBERT, S.; GALES, A.C., 2005. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo- β -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a brazilian hospital. **Clin. Microbiol. Infect.** 11(1):73-76.

SCHMIEDEL, J., FALGENHAUER, L., DOMANN, E., et al. 2014. Multiresistant extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae from humans, companion animals and horses in central Hesse, Germany. **BMC Microbiol** 14:187.

SELLERA, F. P., FERNANDES, M. R., RUIZ, R., et al. 2018. Identification of KPC-2-producing *Escherichia coli* in a companion animal: a new challenge for veterinary clinicians. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 73(8):2259-2261.

SHAHEEN, B.W., NAYAK, R., BOOTHE, D.M. 2013. Emergence of a New Delhi metallo- β -lactamase (NDM-1)-encoding gene in clinical *Escherichia coli* isolates recovered from companion animals in the United States. **Antimicrob Agents Chemother** 57:2902–3.

SPELLBERG, B.; BLASER, M.; GUIDOS, R.J.; et al. 2011 Combating antimicrobial resistance: policy recommendations to save lives. **Clin Infect Dis.** 52:397–428.

STOLLE, I.; PRENGER-BERNINGHOFF, E.; STAMM, I.; et al. 2013. Emergence of OXA-48 carbapenemase-producing *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* in dogs. **J. Antimicrob. Chemother.** 68:2802–2808.

TZOUVELEKIS, L.S.; MARKOGIANNAKIS, A.; PSICHOGIOU, M.; et al. 2012. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. **Clin. Microbiol. Rev.**, 25(4):682–707.

WHO, 2011. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data 3rd Revision.

YONG, D., TOLEMAN, M. A., GISKE, C. G., et al. (2009). Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, bla NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrob. Agents Chemother.** 53:5046–5054.

YOUSFI, M.; TOUATI, A.; MAIRI, A., et al. 2016. Emergence of carbapenemase-producing *Escherichia coli* isolated from companion animals in Algeria. **Microb Drug Resist Larchmt** 22:342–6.

YOUSFI, M.; TOUATI, A.; MUGGEO, A., et al. 2017. Clonal dissemination of OXA-48 producing *Enterobacter cloacae* isolated from companion animals in Algeria. **J Glob Antimicrob Resist S2213–7165(17):30194–7.**

TABELAS

Tabela 8: Primers utilizados para as reações de PCR e multiplex-PCR na detecção de carbapenemases e beta-lactamase do tipo ampC.

Gene	Primer	Sequência de Oligonucleotídeos (5' – 3')	Tamanho do produto amplificado (pb)
<i>NDM</i>	1 – Forward	GGGCAGTCGCTTCCAACGGT	456pb
	1 – Reverse	GTA GTGCTCAGTGT CGGCAT	
<i>SPM</i>	1 – Forward	CCTACAATCTAACGGCGACC	650pb
	1 – Reverse	TCGCCGTGTCCAGGTATAAC	
<i>IMP</i>	1 – Forward	TTGACACTCCATTACDG ^b	139pb
	1 – Reverse	GATYGAGAATTAAGGCCACYCT ^b	
<i>VIM</i>	2 – Forward	GATGGTGTGTTGGTCGCATA	390pb
	2 – Reverse	CGAATGCGCAGCACCAAG	
<i>KPC</i>	3 – Forward	CATTCAAGGGCTTCTTGCTGC	538pb
	3 – Reverse	ACGACGGCATAGTCATTGC	
<i>GES</i>	1 – Forward	AGTCGGCTAGACCGGAAAG	399pb
	1 – Reverse	TTTGTCCGTGCTCAGGAT	
<i>OXA-48</i>	2 – Forward	GCTTGATGCCCTCGATT	281pb
	2 – Reverse	GATTGCTCCGTGGCCGAAA	
<i>PER</i>	3 – Forward	GCTCCGATAATGAAAGCGT	520pb
	3 – Reverse	TTCGGCTTGACTCGGCTGA	
<i>ACC</i>	1 – Forward	CACCTCCAGCGACTTGTAC	346pb
	1 – Reverse	GTTAGCCAGCATCACGATCC	
<i>FOX</i>	2 – Forward	CTACAGTGC GG GTGGTT	162pb
	2 – Reverse	CTATTGCGGCCAGGTGA	
<i>MOX</i>	3 – Forward	GCAACAAACGACAATCCATCCT	895pb
	3 – Reverse	GGGATAGGC GTA ACTCTCCCAA	
<i>DHA</i>	4 – Forward	TGATGGCACAGCAGGATATT	977pb
	4 – Reverse	GCTTTGACTCTTCGGTATT	
<i>LAT</i>	5 – Forward	CGAAGAGGCAATGACCAGAC	538pb
	5 – Reverse	ACGGACAGGGTTAGGATAGY ^b	
<i>ACT e MIR</i>	6 – Forward	CGGTAAAGCCGATGTTGCG	683pb
	6 – Reverse	AGCCTAACCCCTGATACA	

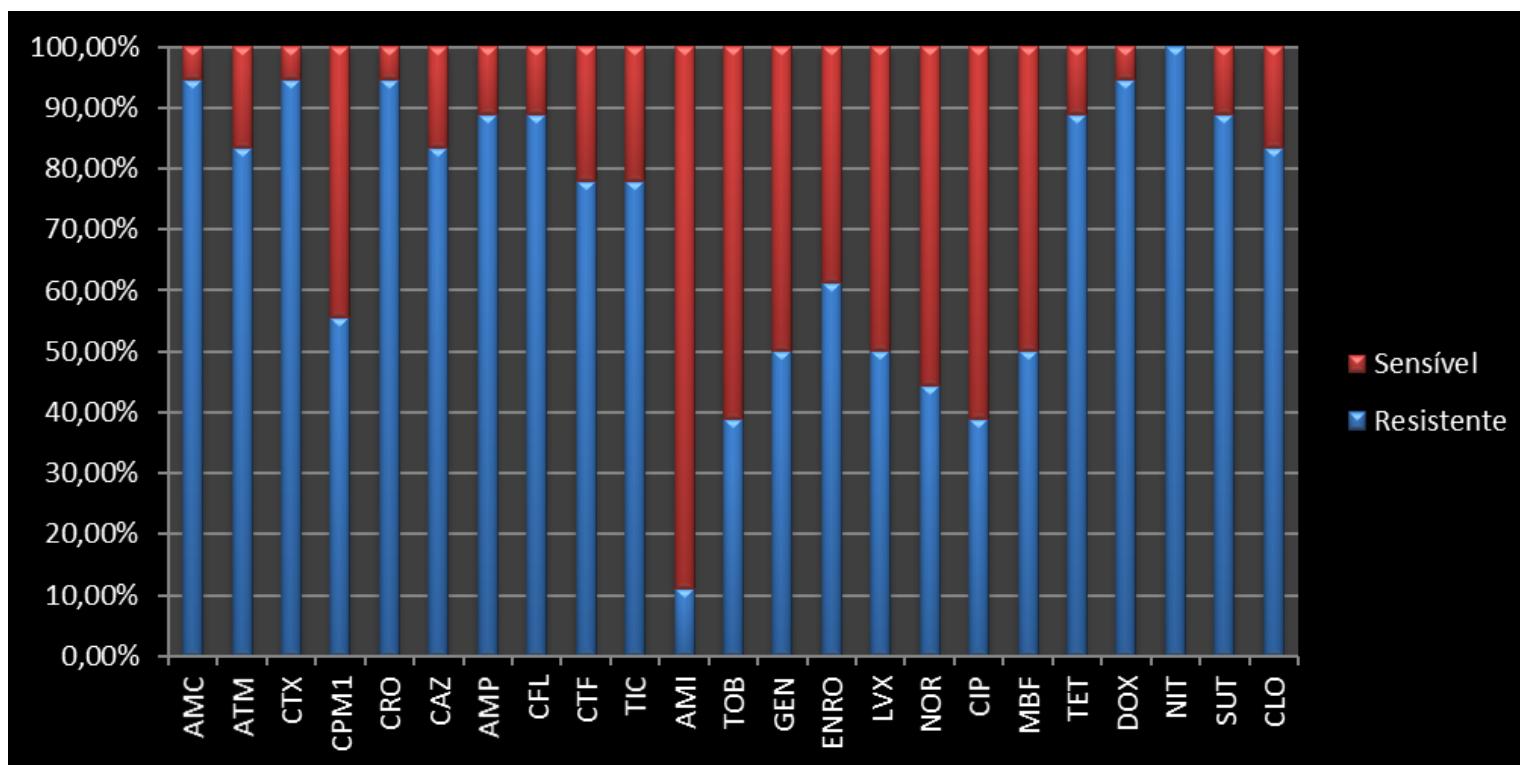
Tabela 9: Caracterização dos 18 micro-organismos produtores de carbapenemase e/ou ampC isolados dos animais hospitalizados no HCV.

Animal	Estado de Saúde	Micro-organismo	Classe de antimicrobianos*										Genes de resistência		
			BL	AG	FQ	TET	NIT	FNC	IAF	NDM	SPM	KPC	OXA-48	ampC	Outros
Cão	Doente	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	S	S	R	R	R	R	+	-	-	-	ACT	-
Cão	Doente	<i>Proteus mirabilis</i>	R	S	S	R	R	R	R	+	-	-	-	-	-
Cão	Saudável	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	S	S	R	R	R	R	-	-	-	-	ACC	-
Cão	Doente	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	R	R	R	R	R	R	-	+	-	-	FOX	-
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	S	R	R	R	R	R	-	+	-	-	FOX	-
Cão	Doente	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	S	R	R	R	R	R	+	-	+	-	FOX	-
Cão	Doente	<i>Proteus mirabilis</i>	R	R	R	R	R	R	R	+	-	-	-	-	-
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	S	R	R	S	S	+	-	-	+	-	-
Cão	Doente	<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R	R	R	R	R	+	-	-	-	ACC	-
		<i>Enterobacter cloacae</i>	R	R	R	R	R	R	R	+	-	-	-	ACC	-
Cão	Doente	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	R	R	R	R	R	R	-	-	+	-	-	-
Cão	Doente	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	R	S	S	S	R	S	S	+	-	+	-	-	-
Gato	Doente	<i>E. coli</i>	R	R	S	R	R	R	R	+	-	-	-	-	-
Cão	Doente	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	S	R	-	-	-	-	ACC	-
Cão	Doente	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	+	ACT	-
Cão	Doente	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	R	S	R	R	R	R	R	-	+	-	+	ACT	PER
		<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	-	ACC	-
Cão	Doente	<i>E. coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	-	ACC	-

* Foi considerado resistente a classe de antimicrobiano quando o isolado apresentou resistência a pelo menos uma das drogas testadas

BL = beta-lactâmicos; AG = aminoglicosídeos; FQ = fluorquinolonas; TET = tetraciclinas; NIT = nitrofurantoína; FNC = fenicóis; IAF = inibidores do ácido fólico; R = resistente; S = sensível.

Gráfico 49: Perfil de susceptibilidade antimicrobiana dos micro-organismos produtores de carbapenemase e/ou ampC isolados dos animais hospitalizados no HCV no período entre setembro e dezembro de 2017.



AMC = amoxicilina com clavulanato; ATM = azetreonam; CTX = cefotaxima; CPM = cefepime; CRO = ceftriaxona; CAZ = ceftazidima; AMP = ampicilina; CFL = cefalotina; CTF = ceftiofur; TIC = ticarcilina com clavulanato; AMI = amicacina; TOB = tobramicina; GEN = gentamicina; ENRO = enrofloxacina; LVX = levofloxacina; NOR = norfloxacina; CIP = ciprofloxacina; MBF = marbofloxacina; TET = tetraciclina; DOX = doxacilina; NIT = nitrofurantoína; SUT = trimethoprim-sulfamethoxazole; CLO = cloranfenicol.

8 ARTIGO 5

Detecção dos principais micro-organismos responsáveis por infecções hospitalares no ambiente em um hospital veterinário de ensino no Brasil

8.1 RESUMO

A contaminação do ambiente hospitalar veterinário com patógenos multirresistentes coloca em risco não apenas os animais hospitalizados, mas também a segurança do local de trabalho de médicos veterinários e enfermeiros, os tutores dos animais e, quando se tratando de um hospital escola, estudantes de medicina veterinária coletadas com swabs. Foram coletadas amostras o qual compreenderam um *pool* de acordo com cada ambiente do hospital. Em determinados ambientes, mais de um pool foi coletado. Todas as amostras foram coletadas em quadruplicadas para o isolamento seletivo dos principais micro-organismos responsáveis por IH: *Staphylococcus meticilina resistente* (MRS), *Enterococcus vancomicina resistente* (VRE), bactérias Gram negativas produtoras de beta lactamase de espectro estendido (ESBL) e produtoras de Carbapenemase (CP). Foi realizado multiplex-PCR para detecção dos principais genes para cada micro-organismo. Após o isolamento dos micro-organismos multirresistentes, foi realizado o teste de sensibilidade aos antimicrobianos com os antibióticos utilizados para cada grupo de micro-organismo de acordo com o CLSI animal e o CLSI humano. Dos 39 locais do HCV que foram realizados coleta do ambiente, todos (100%) apresentaram ao menos um dos micro-organismos pesquisados (MRS, VRE, ESBL ou carbapenemase), sendo que 17,95% (n=7) dos locais foram possíveis isolar os quatro patógenos, Dos 94 pools coletados, foi possível isolar MRS em 81,91% (n=77), VRE em 12,77% (n=12), ESBL em 62,77% (n=59) e CP em 24,47% (n=23). Em relação aos MRS, o gene *mecA* foi detectado em todos os isolados fenotipicamente identificados (n=77). Todos os VRE isolados (n=12) foram identificados como *E. faecalis* e todos apresentaram o gene *vanA*. Em relação as ESBL, 89,83% (n=53) dos isolados apresentaram o gene *blaTEM*, 57,63% (n=34) o gene *blaOXA-1*, 37,29% (n=22) o gene *blaCTX-M* de algum grupo e 20,34% (n=12) o gene *blaSHV*. Foi possível identificar os principais micro-organismos responsáveis por causar infecções hospitalares em seres humanos (VRE, MRS, ESBL e CP) no ambiente hospitalar veterinário, sugerindo uma fonte de infecção para profissionais da área e estudantes de medicina veterinária, atribuindo um grande risco para saúde pública.

Palavras-chave: carbapenemase, MRS, VRE, ESBL, hospital veterinário.

8.2 INTRODUÇÃO

O uso dos agentes antimicrobianos é essencial para o tratamento de infecções bacterianas na medicina humana e veterinária, sendo o uso muitas vezes imprudente na medicina veterinária um fator de risco a mais para a pressão seletiva e o surgimento de micro-organismos multirresistentes. Muitos patógenos animais multirresistentes podem colonizar e/ou infectar humanos através do contato direto, principalmente com o cão e o gato, ou indiretamente através do ambiente (DA COSTA, LOUREIRO e MATOS, 2013). Tendo em vista isso, a Organização Mundial da Saúde reconhece a multirresistência bacteriana aos antimicrobianos como um assunto essencial e de importância em saúde pública, uma vez que a saúde humana está intimamente ligada a saúde dos animais e do ambiente ao qual ele vive (ROBINSON et al., 2016).

As infecções hospitalares (IH) são aquelas adquiridas pelo paciente durante o período de hospitalização, seja o paciente animal ou humano. Na medicina humana já se tem muitos dados a respeito das IH com uma estimativa de 5% de pacientes desenvolvendo uma IH a cada ano, porém, na veterinária, esses dados são escassos (STULL e WEESE, 2015; KLEVENS et al., 2007). Para Stull e Weese (2015), os maiores desafios das IH em animais estão associados com a higiene do paciente, o ato de lamber feridas e um menor estabelecimento de programas para controle das infecções.

Na medicina veterinária, apesar de haver alguns estudos que descrevem a contaminação ambiental associada a infecções hospitalares, ainda não se tem muita informação em relação a essa ligação, uma vez que não se tem dados efetivos sobre essas infecções (DALLAP et al., 2010; EKIRI et al., 2010).

Alguns pontos críticos de contaminação são: maçanetas, interruptores de luz, computadores, celulares (GIRLING e FRASER, 2009; BENDER et al., 2012), portas de gaiola, estetoscópios, termômetros, mordaças (GHOSH et al., 2012) e, principalmente, as mãos de médicos e funcionários, que, quando ocorre falha na higienização e desinfecção, aumentam as chances de infecções hospitalares (WEESE, 2012).

A contaminação do ambiente hospitalar veterinário com patógenos multirresistentes coloca em risco não apenas os animais hospitalizados, mas também a segurança do local de trabalho de médicos veterinários e enfermeiros, os tutores dos animais e, quando se tratando de um hospital escola, estudantes de medicina veterinária (WALTHER et al., 2014), pois segundo Wieler et al. (2014), esses patógenos são transmissíveis entre animais e humanos.

Como na medicina humana, os principais patógenos associados as IH na medicina veterinária são os *Staphylococcus* meticilina resistente (MRS), *Enterococcus* vancomicina resistente (VRE), assim como as Enterobactérias, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* produtores de betalactamase de espectro estendido (ESBL) e produtores de carbapenemases (CP) (STULL and WEESE, 2015; MÜLLER et al., 2014; WIELER et al., 2014). Assim, o objetivo desse estudo foi mapear os principais pontos de contaminação bacteriana de um hospital veterinário de ensino no Brasil, identificando os micro-organismos responsáveis por IH e seus genes de resistência antimicrobianos.

8.3 MATERIAIS E MÉTODOS

O Hospital de Clínica Veterinária (HCV) da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC) está localizado na cidade Lages e atende em média cinco mil animais por ano. São responsáveis pelo atendimento do HCV professores e médicos veterinários, além de residentes de clínica e cirurgia de pequenos animais auxiliados por estagiários, bolsistas e enfermeiros. Na sua estrutura, o HCV é composto pela recepção, ambulatórios, sala de emergência, canil, solário, gatil, consultório para atendimento de felinos, sala de vacinas, sala de Raio X, sala de laudos, pós operatório, pré operatório e tricotomia, salas de fisioterapia, esterilização, centros cirúrgicos, sala de técnica operatória, sala de anestesia, vestiário masculino e feminino, banheiro feminino e masculino, laboratório de análises clínicas e corredores.

8.3.1 Caracterização das amostras

A coleta foi realizada no mês de setembro de 2017, em um único dia, sendo as amostras coletadas com *swabs* umidificados em água destilada estéril. Cada amostra compreendeu um *pool* de acordo com cada ambiente do hospital. Em determinados ambientes, mais de um *pool* foi coletado, o que foi definido levando em consideração o tamanho do ambiente e o fluxo de animais e pessoas do local. Os *pools* compreenderam: amostras de superfícies (mesa de procedimento, chão, armários, balança), instrumentos (estetoscópios, otoscópio, termômetros, traqueotubos), maçanetas, pias, entre outros (pote de ração e água, coleiras, focinheiras, colar elisabetano, gaiolas) de acordo com cada ambiente. No total foram coletados 94 *pools* de 39 ambientes distintos do HCV. Todas as amostras foram coletadas em quadruplicadas para o isolamento seletivo dos principais micro-organismos responsáveis por IH: *Staphylococcus* meticilina resistente (MRS), *Enterococcus* vancomicina resistente (VRE), bactérias Gram

negativas produtoras de beta lactamase de espectro estendido (ESBL) e produtoras de Carbapenemase.

8.3.2 *Staphylococcus meticilina resistente*

Um dos *swabs* das amostras do ambiente foram colocados em um tubo contendo 2 mL de BHI com 7,5% de NaCl e incubados a 37°C por 24h. Após incubação, as amostras foram semeadas em ágar Mueller Hinton contendo 4% de NaCl e 6 mg/L de oxacilina e incubadas novamente a 37°C por 24h. As amostras que apresentaram crescimento foram submetidas ao teste de disco difusão com oxacilina e cefoxitina, sendo que as amostras que apresentaram resistência a pelo menos um dos discos de antimicrobiano testado seguiram para coloração de Gram e testes bioquímicos para identificação fenotípica das principais espécies, sendo eles: catalase, oxidase, coagulase com plasma de coelho, uréase, teste de Voges-Proskauer (VP), fermentação da sacarose e trealose e resistência a polimixina B. Para confirmação da identificação das espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva foi realizada a técnica de multiplex PCR conforme descrito por Sasaki et al (2010).

Para detecção dos genes de resistência aos beta-lactâmicos (*mecA*, *mecC* e *blaZ*) presentes em isolados de MRS, foi realizada a técnica de Multiplex PCR segundo Nakadomari et al. (2019).

As amostras confirmadas como MRS foram submetidas ao teste de resistência a vancomicina com a utilização da fita de Etest para possível identificação de *Staphylococcus* vancomicina resistente (VRS) ou *Staphylococcus* com resistência intermediária à vancomicina (VIS).

8.3.3 *Enterococcus Vancomicina Resistente*

Um dos *swab* coletados do ambiente foram colocados em Caldo *Enterococcosel* com 6 ug/mL de vancomicina e incubados a 37°C por 48h. Após o período de incubação, a amostra foi estriada em ágar Sangue contendo discos de vancomicina nas extremidades das estrias e incubadas overnight a 35°C. As colônias que apresentarem crescimento dentro do halo de inibição foram selecionadas para realização de Gram e teste da catalase para confirmação do Isolamento de *Enterococcus*. Foram realizadas duas técnicas de Multiplex PCR descritas por Depardieu, Perichon e Courvalin (2004), uma para identificação das duas principais espécies de *Enterococcus* (*E. faecium* e *E. faecalis*) e outra para detecção dos genes de resistência à vancomicina (*vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE* e *vanG*).

8.3.4 Bactérias Gram negativas produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL)

Outro *swab* coletado do ambiente foi colocado em 15 mL de Caldo BHI contendo disco de ceftriaxona (30 mcg) e incubados a 37°C por 24h. Logo após as amostras foram estriadas em ágar MacConkey e incubadas a 37°C por 24h. As amostras que apresentarem crescimento foram submetidas a coloração de Gram e testes bioquímicos para identificação bacteriana através do sistema Bactray.

Após identificação do micro-organismo foi realizado teste de sensibilidade antimicrobiana através da técnica de sinergismo entre o disco de amoxacilina com ácido clavulânico e os discos de cefepime, ceftriaxona, cefotaxima, aztreonam e ceftazidima, para detecção de micro-organismos produtores ESBL. Os isolados positivos para o teste de ESBL foram submetidos a investigação da presença dos principais genes através de duas técnicas de multiplex PCR: uma para detecção dos genes *blATEM*, *blasHV* e *blaOXA-1*; e uma para os genes *blaCTX-M* dos grupos 1, 2 e 9. Além disso, uma PCR convencional foi realizada para identificação do gene *blaCTX-M* do grupo 8 e 25. Todas as reações foram de acordo com os protocolos de Dallene et al. (2010).

8.3.5 Bactérias Gram negativas produtoras de Carbapenemases

Para detecção de carbapenemases, os *swabs* coletados do ambiente foram colocados em 10 mL de Caldo BHI com discos de ertapenem e ampicilina e incubados a 37°C por 12-16h. Depois as amostras foram estriadas em ágar MacConkey onde foram colocados discos de ertapenem no início e fim das estrias e incubadas a 37°C por 24h. Testes bioquímicos foram realizados com as colônias que crescerem dentro do halo de ertapenem menor ou igual a 27 mm para identificação do micro-organismo. Para confirmação de Enterobactérias produtoras de carbapenemases foram realizados testes de acordo com a Nota Técnica nº 01/2013 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2013). Para micro-organismos não pertencentes à família *Enterobacteriaceae* foi realizado o teste de sensibilidade aos antimicrobianos com os principais discos da classe dos carbapenêmicos (meropenem, ertapenem e imipenem).

Os isolados sugestivos de produção de carbapenemase foram submetidos a técnicas de multiplex PCR para detecção dos genes GES, IMP, VIM, KPC e OXA-48 segundo Dallene et al. (2010), assim como para detecção do gene SPM segundo Sader et al. (2005) e do gene NDM de acordo com Yong et al. (2009). Além disso, foi realizada a detecção dos genes *ampC* (FOX, MOX, ACC, CMY, DHA, LAT, CIT e EBC) segundo Dallene et al. (2010).

8.3.6 Perfil de resistência

Após o isolamento dos micro-organismos multirresistentes, foi realizado o teste de sensibilidade aos antimicrobianos com os antibióticos utilizados para cada grupo de micro-organismo de acordo com o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) animal (2018) e o CLSI humano (2019) para estabelecer o perfil de resistência de cada um deles. *Escherichia coli* ATCC 25922 reference strain was used as quality control to determine susceptibility to antimicrobial agents.

8.4 RESULTADOS

Dos 39 locais do HCV que foram realizados coleta do ambiente, todos (100%) apresentaram ao menos um dos micro-organismos pesquisados (MRS, VRE, ESBL e carbapenemase), sendo que 17,95% (n=7) dos locais foram possíveis isolar os quatro patógenos, assim como mostra a Tabela 10. Apenas quatro lugares foram identificados apenas um micro-organismos: sala dos professores (ESBL), ambulatório 3 (MRS), centro cirúrgico 1 (MRS) e o corredor do centro cirúrgico 1 (MRS).

Dos 94 *pools* coletados, foi possível isolar MRS em 81,91% (n=77), VRE em 12,77% (n=12), ESBL em 62,77% (n=59) e CP em 24,47% (n=23). A identificação dos micro-organismos está disposta na Tabela 11.

Em relação aos MRS, o gene *mecA* foi detectado em todos os isolados fenotipicamente identificados (n=77) e em 31,17% (n=24) o gene *blaZ* (três MRSA e 21 MRSP). O gene *mecC* não foi identificado em nenhum isolado. Os antimicrobianos nitrofurantoína (10,39%, n=8), cloranfenicol (11,36, n=9), amicacina (15,58%, n=12), doxiciclina (19,48%, n=15) e rifampicina (20,78%, n=16) foram os que apresentaram menores índices de resistência frente aos MRS, ao contrário da eritromicina (88,31%, n=68), norfloxacina (66,23%, n=51), sulfazotrim (63,64%, n=49), enrofloxacina (62,34%, n=48) e ciprofloxacina (61,04%, n=47) que apresentaram os maiores índices. Dois isolados de MRSP apresentaram fenotipicamente resistência induzida a clindamicina com a formação do halo em “D” junto a eritromicina. Nenhuma isola de MRS apresentou resistência a vancomicina pelo Etest.

Todos os VRE isolados (n=12) foram identificados como *E. faecalis* e todos apresentaram o gene *vanA*. Um dos isolados, detectado no “canil 2”, apresentou resistência a todos os antimicrobianos testados (n=16), inclusive a alta concentração de gentamicina, sendo identificado como HLAR. A classe das fluorquinolonas foi a que apresentou maior índice de

resistência frente aos VRE (entre 50 e 66,67%), já a penicilina G e a ampicilina foram os antimicrobianos com menores índices (8,33%, n=1).

Em relação as ESBL, 89,83% (n=53) dos isolados apresentaram o gene *blaTEM*, 57,63% (n=34) o gene *blaOXA-1*, 37,29% (n=22) o gene *blaCTX-M* de algum grupo e 20,34% (n=12) o gene *blaSHV*. Nenhum isolado de *Pseudomonas aeruginosa* e *E. coli* apresentou o gene *blaSHV*. A identificação dos isolados de ESBL e seus respectivos genes encontram-se na Tabela 12.

As amostras positivas para carbapenemase estão dispostas na Tabela 12 de acordo com a identificação bacteriana, o local que o micro-organismo foi identificado, os genes de resistência detectado e as classes de antimicrobianos ao qual o patógeno apresentou resistência.

8.5 DISCUSSÃO

Devido a proximidade muito grande do cão e do gato com os seres humanos, os cuidados para com esses animais aumentaram significativamente elevando a expectativa e a qualidade de vida deles. Com essa proximidade, esses animais acabam se tornando importantes fontes de transmissão de genes de resistência antimicrobiana para os seres humanos (DE BRIYNE et al., 2014; HORDIJK et al., 2013), seja de forma direta ou até mesmo de forma indireta através do ambiente (SCHAWS, 2018).

O ambiente pode ter ligação com casos de infecção hospitalar, porém, na medicina veterinária, ainda não se tem muita informação em relação a essa ligação mesmo sabendo que ela existe (DALLAP et al., 2010; EKIRI et al., 2010). Apesar desse estudo também não mostrar a relação entre ambiente e infecções hospitalares, a identificação dos principais micro-organismos responsáveis por essas infecções em todo o ambiente hospitalar veterinário do presente estudo ascende um alerta em relação a disseminação desses patógenos para os seres humanos.

O fluxo de pessoas dentro de um hospital é muito grande e a rotina diária faz com que a rotatividade de pacientes seja frequente o que favorece uma contaminação heterogênea do ambiente. Em um hospital veterinário escola ainda há dois outros agravantes que contribuem para essa heterogenicidade de patógenos a) o paciente sempre vem acompanhado do seu tutor, que, devido ao apego emocional com o animal, está acompanhado de outros membros da família e b) por ser um hospital escola, a troca e a rotatividade de alunos (de várias regiões do estado e até mesmo do país) é regular. A presença de diferentes micro-organismos com diferentes genes de resistência antimicrobianos identificados no ambiente desse estudo pode sugerir essa contaminação heterogênea vindo de diferentes fontes.

O influxo de micro-organismos multirresistentes dentro de um hospital veterinário varia significativamente de acordo com a sua localização, tamanho, variedade de serviços oferecidos e grupo de pacientes admitidos (DONKER et al., 2012), ou seja, hospitais de referências, como no caso do HCV possuem maior risco de contaminação por esses patógenos resistentes.

De acordo com a Tabela 4, se observarmos os *pools* aos quais foram identificados os micro-organismos produtores de carbapenemase, a maioria deles foram isolados de maçanetas de portas, puxadores de armários e interruptores de luz, locais esses tidos como pontos críticos de contaminação segundo Bender et al. (2012), e que sugerem uma contaminação através das mãos das pessoas. Segundo Weese (2012), quando não há uma higienização e desinfecção adequada das mãos dos profissionais da saúde (e nesse caso dos alunos e proprietários também) aumentam as chances de contaminação do ambiente e de possíveis infecções hospitalares. A detecção de micro-organismos multirresistentes nesse estudo

O ambiente hospitalar veterinário não serve apenas como uma fonte de risco para contaminar os animais ali hospitalizados, mas também como uma fonte de infecção para médicos veterinários, funcionários, alunos e tutores dos animais, sendo um grande problema em saúde pública. Segundo Walther et al. (2016), as pessoas que trabalham no hospital veterinário possuem grande potencial para adquirir doenças de pacientes animais (zoonoses), além de sofrerem colonização por micro-organismos multirresistentes presentes no ambiente.

Schaufler et al. (2015), detectaram cepas de *E. coli* produtoras de ESBL em fezes de cães clinicamente infectados nas imediações do hospital, o que mostra a contaminação do ambiente e possíveis fatores de risco para contaminação de outros pacientes. Apesar desse estudo não relacionar esses patógenos ambientes com animais clinicamente infectado, o isolamento de não só de ESBL, mas também de MRS, VRE e CP evidenciam a preocupação com a limpeza e desinfecção do ambiente hospitalar. No Brasil, hospitais veterinários, ao contrário de hospitais humanos, não possuem a obrigatoriedade de uma comissão de controle de infecção hospitalar, que teria como uma das funções, detectar esses patógenos no ambiente e elaborar um protocolo de desinfecção adequado.

Os MRSP e a *E. coli* produtora de ESBL são os principais micro-organismos multirresistentes frequentemente isolados na medicina veterinária (PERRETTEN et al., 2010; RUBIN e PITOUT, 2014), porém patógenos como *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus* (RAPICH, 2013), assim como MRSA (VINCZE et al., 2014), enterobactérias produtoras de carbapenemase (ABRAHAN et al., 2014) e *Acinetobacter baumannii* (ENDIMIANI et al., 2011) estão emergindo como importantes causadores de infecção hospitalar também na veterinária. No presente estudo, todos esses micro-organismos foram detectados no ambiente

hospitalar, seja em ambientes com grande fluxo de animais doentes ou até mesmo em locais onde os animais não têm acesso, sugerindo uma disseminação desses patógenos dentro do próprio hospital.

Geralmente as bactérias envolvidas em infecções hospitalares apresentam multirresistência aos antimicrobianos, principalmente aqueles mais utilizados no hospital em questão, o que dificulta ainda mais o tratamento e a melhora do paciente aumentando as chances de procedimentos como a eutanásia no animal (STULL e WEESE, 2015). Além disso, problemas em saúde pública aumentam essa preocupação em relação a esses micro-organismos pelo fato da transmissão para os seres humanos e pelo uso crescente de antimicrobianos em animais que são restritos ao uso humano, como o caso dos carbapenêmicos (GUARDABASSI e PRESCOTT, 2015). O isolamento de micro-organismos produtores de carbapenemase em 48,72% (n=19) dos ambientes do HCV e em 24,47% de todas as amostras coletadas evidenciam essa preocupação da disseminação desses patógenos para os seres humanos ali expostos e a possível transmissão deles para a comunidade.

O alto consumo de antimicrobianos das classes dos beta-lactâmicos e fluorquinolonas estabelecem uma pressão seletiva nos micro-organismos, principalmente nos MRSA, MRSP e ESBL (DAMBORG et al., 2011; GUARDABASSI et al., 2012), porém esses antimicrobianos são indispensáveis para o tratamento de infecções urinárias e de pele nos animais (HILLIER et al., 2014). No presente estudo, todos os grupos de micro-organismos (MRS, VRE, ESBL e CP), os antimicrobianos da classe das fluorquinolonas foram uns dos mais resistentes, corroborando com o exposto anteriormente.

Apesar da necessidade de outros estudos de investigação da contaminação ambiental de hospitais veterinários no Brasil, o presente estudo sugere a contaminação intrínseca com uma diversidade de micro-organismos multirresistentes nesse tipo de ambiente. Segundo Stull e Weese (2015), a variedade de espécie animal atendida dentro de um hospital veterinário é grande, sendo que cada espécie possui uma microbiota específica e riscos de contaminação distintos, o que aumenta a heterogenicidade de micro-organismos contaminando o ambiente.

Portanto, é essencial o estabelecimento de procedimentos para evitar a disseminação de micro-organismos multirresistentes no ambiente hospitalar, tais procedimentos incluem: um protocolo de desinfecção eficaz, mas que respeite o bem estar dos animais (BURGESS e MOLEY, 2015), triagem de pacientes para colonização de patógenos multirresistentes, descolonização de médicos veterinários, professores e alunos e testes de vigilância epidemiológica do ambiente. De acordo com esse estudo, a falta desses protocolos associados

com a falta de conhecimento sobre o assunto, negligenciam a disseminação de genes de resistência antimicrobiana e dificultam o controle dessas bactérias.

8.6 CONCLUSÃO

Foi possível identificar os principais micro-organismos responsáveis por causar infecções hospitalares em seres humanos (VRE, MRS, ESBL e CP) no ambiente hospitalar veterinário, sugerindo uma fonte de infecção para profissionais da área e estudantes de medicina veterinária, atribuindo um grande risco para saúde pública. O micro-organismo mais isolado foi o MRS, seguido de ESBL, CP e VRE. Todos os ambientes do hospital apresentavam ao menos um MDR, mostrando a dificuldade de controlar a disseminação desses patógenos no ambiente ainda mais quando se falta conhecimento e informações sobre o assunto para os profissionais da área. Assim, falta de protocolos de desinfecção voltadas para bactérias multirresistentes, facilita sua disseminação, dificulta o tratamento de animais infectados e favorecem a colonização de seres humanos e sua propagação para comunidade.

8.7 REFERÊNCIAS

ABRAHAM, S., WONG, H.S., TURNIDGE, J., et al. 2014. Carbapenemaseproducing bacteria in companion animals: a public health concern on the horizon. **J. Antimicrob. Chemother.** 69:1155–1157.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018. Performance standards for Antimicrobial disk and dilution susceptibility test for bacteria isolated from animals. 5th ed. CLSI standard VET01. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.

CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. 2019. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 29th ed. CLSI Supplement M100. Wayne, Pennsylvania, USA. CLSI.

DA COSTA, P.M.; LOUREIRO, L.; MATOS, A.J. 2013. Transfer of multidrug-resistant bacteria between intermingled ecological niches: The interface between humans, animals and the environment. **Int. J. Environ. Res. Public Health** 10:278–294.

DALLAP, S.B.L.; ACETO, H.; RANKIN, S.C. 2010. Outbreak of salmonellosis caused by *Salmonella enterica* serovar Newport MDR-AmpC in a large animal veterinary teaching hospital. **J. Vet. Intern. Med.**, 24:1138–1146.

DALLENNE, C., DA COSTA, A., DECRÉ, D., et al. 2010. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. **J Antimicrob Chemother.** 65(3):490-5.

- DAMBORG, P., GAUSTAD, I.B., OLSEN, J.E., et al. 2011. Selection of CMY-2 producing Escherichia coli in the faecal flora of dogs treated with cephalaxin. **Vet Microbiol** 151:404–8.
- DE BRIYNE, N.; ATKINSON, J.; POKLUDOVA, L.; et al. 2014. Antibiotics used most commonly to treat animals in Europe. **Vet. Rec.**, 175:325.
- DEPARDIEU, F.; PERICHON, B.; COURVALIN, P. 2004. Detection of the van Alphabet and Identification of Enterococci and Staphylococci at the Species Level by Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, 42(12):5857-5860.
- DONKER, T., WALLINGA, J., SLACK, R., et al. 2012. Hospital networks and the dispersal of hospital-acquired pathogens by patient transfer. **PLoS One** 7:e35002.
- EKIRI, A.B.; MORTON, A.J.; LONG, M.T.; et al. 2010. Review of the epidemiology of and infection control aspects of nosocomial Salmonella infections in hospitalized horses. **Equine Vet Educ.**, 22(12)/631–41.
- ENDIMIANI, A., HUJER, K.M., HUJER, A.M., et al. 2011. Acinetobacter baumannii isolates from pets and horses in Switzerland: molecular characterization and clinical data. **J Antimicrob Chemother** 66:2248–54.
- GIRLING, S.J.; FRASER, M.A. 2009. Bacterial carriage of computer keyboards in veterinary practices in Scotland. **Vet Record.**, 165(1):26–7, 2009.
- GUARDABASSI, L., LARSEN, J., WEESE, J.S., et al. 2012. Public health impact and antimicrobial selection of methicillin-resistant staphylococci in animals. **J Glob Antimicrob Resist** 1:55–62.
- GUARDABASSI, L., PRESCOTT, J.F. 2015. Antimicrobial Stewardship in Small Animal Veterinary Practice: From Theory to Practice. **Vet Clin Small Anim** 45:361–376.
- HILLIER, A., LLOYD, D.H., WEESE, S.J., et al. 2014. Guidelines for the diagnosis and antimicrobial therapy of canine superficial bacterial folliculitis (Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases). **Vet Dermatol** 25:163.e43.
- HORDIJK, J.; SCHORMANS, A.; KWAKERNAAK, M.; et al. 2013. High prevalence of fecal carriage of extended spectrum -lactamase/AmpC-producing Enterobacteriaceae in cats and dogs. **Front Microbiol.**, 4:242.
- KLEVENS, R.M.; EDWARDS, J.R.; RICHARDS, C.L.; et al. 2007. Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. **Public Health Rep.**; 122(2):160–6, 2007.
- MÜLLER, S., JANSSEN, T., WIELER, L.H., 2014. Multidrug resistant Acinetobacter baumannii in veterinary medicine—emergence of an underestimated pathogen? **Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.** 127:435–446.

NAKADOMARI, G.H.; CHARALO, A.C.; PAVAN, A.C.L., et al. 2019. Multiplex-PCR for detection of beta-lactam resistance in *Staphylococcus* spp. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, IN PRESS.

PERRETN, V.; KADLEC, K.; SCHWARZ, S.; et al. 2010. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. **J. Antimicrob. Chemother.**, 65:1145–1154.

ROBINSON, T.P.; BU, D.P.; CARRIQUE-MAS, J., et al. 2016. Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 110:377–380.

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

SADER, H.S.; REIS, A.O.; SILBERT, S.; GALES, A.C., 2005. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-β-lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a brazilian hospital. **Clin. Microbiol. Infect.** 11(1):73-76.

SASAKI, T., TSUBAKISHITA, S., TANAKA, Y., et al. 2010. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. **J Clin Microbiol** 48:765-769.

SCHAUFLER, K., BETHE, A., LUBKE-BECKER, A., et al., 2015. Putative connection between zoonotic multiresistant extendedspectrumbeta-lactamase (ESBL)-producing Escherichia coli in dog feces from a veterinary campus and clinical isolates from dogs. **Infect. Ecol. Epidemiol.** 5:25334.

STULL, J.W.; WEESE, J.S. 2015. Hospital-Associated Infections in Small Animal Practice. **Vet Clin Small Anim.**, 45:217–233.

VINCZE, S., STAMM, I., KOPP, P.A., et al. 2014. Alarming proportions of methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in wound samples from companion animals, Germany 2010–2012. **PLoS One** 9:e85656.

WALTHER, B., LUEBKE-BECKER, A., STAMM, I., et al. 2014. Suspected nosocomial infections with multi-drug resistant *E. coli* including extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strains, in an equine clinic. **Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.** 127:421–427.

WALTHER, B.; TEDIN, K.; LÜBKE-BECKER, A. 2017. Multidrug-resistant opportunistic pathogens challenging veterinary infection control, **Vet. Microbiol.** 71–78.

WEESE, J.S. Monitoring for surgical infection, p.170-179. In: TOBIAS, K.M.; JOHNSTON, S.A. (Eds), **Veterinary Surgery, Small Animals**. Elsevier Saunders, Missouri, 2012.

WIELER, L.H., WALTHER, B., VINCZE, S., et al. 2014. Infections with multidrug-resistant bacteria: has the post-antibiotic era arrived in companion animals? In: Sing, A. (Ed.), **Zoonoses – Infections Affecting Humans and Animals: Focus on Public Health Aspects**. Springer, Oberschleißheim, pp. 433ff.

Tabela 10: Ambientes do HCV que foram realizados coleta de amostras e os micro-organismos isolados em cada um deles.

Local	MRS	VRE	ESBL	CP
Canil 1	+	+	+	+
Canil 2	+	+	+	+
Corredor do canil	+	N.E	+	+
Maternidade	+	N.E	+	N.E
Sala de Fisioterapia	+	N.E	+	N.E
Sala de pós-operatório	+	N.E	+	+
Sala de medicação	+	N.E	+	N.E
Gatil 1 (consultório)	+	+	+	+
Gatil 2 (internamento)	+	+	+	+
Solário	+	+	N.E	N.E
Sala de retirada de pontos	+	N.E	+	N.E
Cozinha	+	+	+	+
Banheiro feminino	+	N.E	+	+
Banheiro Masculino	+	N.E	+	+
Corredor da recepção	+	+	+	N.E
Corredor salas dos professores	N.E	N.E	+	N.E
Sala de vacina	+	N.E	+	N.E
Vestiário feminino	+	N.E	+	N.E
Vestiário Masculino	+	N.E	+	N.E
Corredor da Patologia Clínica	+	N.E	+	+
Sala do pré-operatório	+	+	+	+
Corredor sala de esterilização	+	N.E	+	N.E
Consultório de emergência	+	N.E	+	+
Ambulatório 1	+	N.E	+	+
Ambulatório 2	+	+	+	N.E
Ambulatório 3	+	N.E	N.E	N.E
Ambulatório 4	+	N.E	+	+
Corredor dos ambulatórios	+	N.E	+	+
Técnica Cirúrgica	+	N.E	+	+
Sala de Raio-X	+	N.E	+	N.E
Sala de laudo do raio-x	+	N.E	+	N.E
Sala de anestesiologia	+	N.E	+	N.E
Sala de esterilização	+	N.E	+	+
Centro cirúrgico 1	+	N.E	N.E	N.E
Centro cirúrgico 2	+	N.E	+	+
Centro cirúrgico 3	+	N.E	+	N.E
Corredor do centro cirúrgico 1	+	N.E	N.E	N.E
Corredor do centro cirúrgico 3	+	N.E	+	N.E
Recepção	+	+	+	+
TOTAL	38	10	35	19

MRS - *Staphylococcus meticilina resistente*; VRE – *Enterococcus vancomicina resistente*; ESBL – betalactamase de espectro estendido; CP – carbapenemase; N.E – micro-organismo não encontrado; + - micro-organismo encontrado.

Tabela 11: Identificação dos micro-organismos isolados dos ambientes do HCV.

MDR	Micro-organismo	Locais (%) – n = 39	Amostras (%) – n = 94
MRS	<i>S. pseudintermedius</i>	11 (28,20%)	11 (11,70%)
	<i>S. aureus</i>	37 (94,87%)	66 (70,21%)
	Total	38 (97,44%)	77 (81,91%)
VRE	<i>E. faecalis</i>	10 (25,64%)	12 (12,77%)
	Total	10 (25,64%)	12 (12,77%)
ESBL	<i>Acinetobacter baumannii</i>	8 (25,31%)	10 (10,64%)
	<i>E. coli</i>	5 (12,82%)	5 (5,32%)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17 (43,59%)	18 (19,15%)
	<i>Serratia sp</i>	18 (46,15%)	26 (27,66%)
	Total	35 (89,74%)	59 (62,77%)
CP	<i>Acinetobacter baumannii</i>	14 (35,90%)	15 (15,96%)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5 (12,82%)	5 (5,32%)
	<i>Serratia sp</i>	3 (7,69%)	3 (3,19%)
	Total	19 (48,72%)	23 (24,47%)

MDR – multidrug resistente; MRS - Staphylococcus meticilina resistente; VRE – Enterococcus vancomicina resistente; ESBL – betalactamase de espectro estendido; CP – carbapenemase

Tabela 12: Identificação de micro-organismos produtores de carbapenemase no ambiente hospitalar veterinário associado com perfil de susceptibilidade antimicrobiana e detecção de genes de resistência frente aos carbapenêmicos.

Local	Pool	Micro-organismo	Resistência antimicrobiana	Genes
Pós operatório	Mesa, maçaneta, suporte e interruptor	<i>A. baumannii</i>	BL / AG / TET / NIT / SUL / FC	OXA-48
Pós operatório	Chão	<i>A. baumannii</i>	BL / NIT / SUL / FC	OXA-48
Gatil Internamento	Mesa, frascos e armários	<i>A. baumannii</i>	BL / AG / NIT / SUL	KPC e ampC (ACC)
Copa	Chão e puxadores	<i>A. baumannii</i>	BL / AG / NIT	OXA-48 e ampC (ACC)
Copa	Mesa, pia, geladeira e fogão	<i>A. baumannii</i>	BL / AG / FQ / TET / NIT	OXA-48 e ampC (MOX)
Corredor Patologia Clínica	Maçaneta, interruptor e armários	<i>A. baumannii</i>	BL / AG / NIT	OXA-48 e ampC (FOX)
Corredor dos Ambulatórios	Maçaneta, armários e interruptor	<i>A. baumannii</i>	BL / FQ / NIT / SUL / FC	OXA-48 e ampC (FOX)
Ambulatório 1	Mesa, maçaneta, pia e armários	<i>A. baumannii</i>	BL / NIT / FC	OXA-48 e ampC (FOX)
Canil	Gaiolas entrada	<i>A. baumannii</i>	BL / AG / FQ / NIT / SUL / FC	NDM
Banheiro masculino	Pia, maçaneta e interruptor	<i>A. baumannii</i>	BL / NIT / SUL	KPC e ampC (ACC)
Banheiro feminino	Pia, maçaneta e interruptor	<i>A. baumannii</i>	BL / AG / FQ / TET / NIT / SUL	OXA-48 e ampC (MOX)
Emergência	Mesa, pia, armário e maçaneta	<i>A. baumannii</i>	BL / AG / FQ / TET / NIT / SUL / FC	OXA-48
Ambulatório 4	Mesa e bancadas	<i>A. baumannii</i>	BL / AG / TET / NIT	OXA-48 e ampC (FOX)
Técnica cirúrgica	Mesas, pia, armários e controle de ar	<i>A. baumannii</i>	BL / FQ / NIT / SUL / FC	OXA-48
Centro cirúrgico 2	Chão	<i>A. baumannii</i>	BL / FQ / NIT / SUL / FC	OXA-48 e ampC (MOX)
Canil 2	Potes de água e ração	<i>P. aeruginosa</i>	BL / AG / FQ / TET / NIT / SUL / FC	ampC (LAT)
Corredor do Canil	Interruptor e maçaneta	<i>P. aeruginosa</i>	BL / FQ / NIT / SUL / FC	OXA-48 e ampC(MOX)
Gatil (consultório)	Mesa, pia e frascos	<i>P. aeruginosa</i>	BL / FQ / NIT / SUL / FC	KPC e ampC (ACC)
Esterilização	Pia e armários	<i>P. aeruginosa</i>	BL / FQ / NIT / SUL / FC	ampC (DHA)
Recepção	Chão	<i>P. aeruginosa</i>	BL / AG / FQ / TET / NIT / SUL / FC	KPC e ampC (ACC)
Canil 2	Mesa, puxadores de armários	<i>Serratia sp</i>	BL / AG / FQ / NIT / SUL / FC	NDM e ampC (MOX)
Corredor do canil	Chão	<i>Serratia sp</i>	BL / AG / FQ / TET / NIT / SUL / FC	NDM e ampC (MOX)
Pré-operatório	Pia, torneira, secador	<i>Serratia sp</i>	BL / AG / FQ / TET / NIT / SUL / FC	OXA-48 e ampC (AAC)

BL = beta-lactâmicos; AG = aminoglicosídeos; FQ = fluoroquinolonas; TET = tetraciclinas; NIT = nitrofurantoína; FC = fenicóis; SUL = sulfazotrim.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo revelou a presença dos principais micro-organismos responsáveis por infecções hospitalares em humanos (MRS, VRE, ESBL e CP) colonizando animais sadios e doentes além de estarem presentes também em todo o hospital veterinário. A presença desses micro-organismos cria um alerta para que os mesmos cuidados a respeito da resistência antimicrobiana tomados em um hospital humano também sejam postos em prática nos hospitais veterinários, pois sem uma comissão de controle de infecção hospitalar, a detecção e eliminação desses microrganismos são dificultadas, o que pode favorecer a sua disseminação.

Tais dados sugerem um problema de saúde pública, uma vez que esses microrganismos causam infecções em humanos e animais, podendo oferecer riscos à saúde dos profissionais de saúde e os alunos que frequentam o ambiente hospitalar, assim como apontam para a necessidade de intensificação dos controles higiênico-sanitários bem como para a implementação de medidas que permitam a vigilância epidemiológica das cepas bacterianas potencialmente patogênicas e multirresistentes no ambiente hospitalar veterinário.

A criação de uma Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) em hospitais veterinários é um passo importante para a identificação de micro-organismos multirresistentes com o objetivo de evitar a sua disseminação, sendo poucos os hospitais veterinários que contam com um CCIH. Graças a esse estudo, o hospital veterinário de ensino da cidade de Lages, em Santa Catarina, estabeleceu uma CCIH para propor medidas corretivas e preventivas afim de diminuir a contaminação por micro-organismos multirresistentes e melhorar os protocolos de limpeza e desinfecção do hospital.

Assim como ocorreu no hospital do presente estudo, apenas hospitais veterinários que passaram por problemas de infecções hospitalares e contaminação ambiental acabaram instituindo uma CCHI efetiva, porém, estudos como esse mostram a importância de se prevenir e evitar o problema antes dele se estabelecer, ficando um alerta para demais hospitais veterinários a importância de protocolos efetivos para evitar a disseminação de patógenos multirresistentes no ambiente hospitalar e na comunidade.

APÊNDICE A – Soluções e Tampões

Solução de ácido fenilborônico 40 mg/ml (AFB)

- Ácido fenilborônico ----- 240 mg
- DMSO ----- 3 ml
- Água grau reagente estéril ----- 3 ml
- Estabilidade e conservação: 3 meses a -20°C;

Solução de EDTA 0,1M

- EDTA ----- 1,86 g
- Água grau reagente ----- 40 mL

Agitar até completa dissolução do EDTA, elevando o pH para $7,5 \pm 0,1$ com NaOH 5M

- A solução de NaOH 5M pode ser preparada dissolvendo-se 20 g de hidróxido de sódio em água grau reagente, até completar o volume total, em temperatura ambiente, de 100 ml.
- Distribuir em alíquotas de 1 a 2 ml
- Esterilizar em autoclave por 10 min a 121 °C

Estabilidade e conservação: temperatura ambiente (15 a 25°C) por 1 ano. Não refrigerar ou congelar, pois pode haver precipitação da solução.

Solução de Cloxacilina (CLOXA)

- Cloxacilina sal sódico monohidratado ----- 750 mg
- Água grau reagente ----- 10 ml
- Esterilizar por filtração 0,22 µm
- Estabilidade e conservação: 3 meses a -20°C

TAE 50X

- 121g de TRIS
- 50ml de EDTA 0,5M pH 8,0
- 28,5ml de Ácido Acético Glacial
- 500ml de H₂O milli-Q

Gel de Agarose 2%

- 1g de agarose
- 50ml de TAE 1X

Diluição dos dNTPs

- Solução estoque (100mM): adicionar 100 uL de cada dNTP
- Solução de uso (10mM): 10 uL da solução estoque e 90 uL de água miliQ autoclavada

Ágar Screen Oxacilina

- Solução mãe – 6000 ug/mL

$$\text{Peso (mg)} = \text{Vol (10 mL)} \times \text{Concentração (6000 ug/mL)} / \text{Potencia (922 ug/mg)}$$

$$\text{Peso} = 65,08$$

$$65,08 \text{ mg para } 9,934 \text{ mL de água destilada autoclavada} = 6000 \text{ ug/mL}$$

- Solução uso = 1 mL solução mãe + 9 mL de água destilada autoclavada = 600 ug/mL
- Ágar Screen = 1 mL da solução uso + 99 mL de ágar = 6 ug/mL

APÊNDICE B – Lista de *Primers*

Tabela 13: Primers para identificação de genes de resistência aos beta-lactâmicos em *Staphylococcus*.

Gene	Primer	Sequência de Oligonucleotídeos (5' – 3')	Tamanho do produto amplificado (pb)
<i>blaZ</i>	1 – Forward	AAG AGA TTT GCC TAT GCT TC	516pb
	1 – Reverse	GCT TGA CCA CTT TTA TCA GC	
<i>mecA</i>	2 – Forward	GTG AAG ATA TAC CAA CTG ATT	316pb
	2 – Reverse	ATG CGC TAT AGA TTG AAA GCA	
<i>mecC</i>	3 – Forward	GAT TTA AAG TAG TAG ACG GC	138pb
	3 – Reverse	TTT CAC CGA TTC CCA AAT CT	

Tabela 14: Primers para identificação das espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva.

Gene	Primer	Sequência de Oligonucleotídeos (5' – 3')	Tamanho do produto amplificado (pb)*
<i>au-F3</i>	1 – Forward	TCGCTTGCTATGATTGTGG	359pb
	1 – Reverse	GCCAATGTTCTACCATAGC	
<i>in-F</i>	2 – Forward	CATGTCATATTATTGCGAATGA	430pb
	2 – Reverse	AGGACCATCACCAATTGACATATTGA AACC	
<i>sch-F</i>	3 – Forward	AATGGCTACAATGATAATCACTAA	526pb
	3 – Reverse	CATATCTGTCTTCGGCGCG	
<i>dea-F</i>	4 – Forward	TGAAGGCATATTGTAGAACAA	661pb
	4 – Reverse	CGRTACTTTCGTTAGGTCG	
<i>hy-F1</i>	5 – Forward	CATTATATGATTGAAACGTG	793pb
	5 – Reverse	GAATCAATATCGTAAAGTTGC	
<i>pse-F2</i>	6 – Forward	TRGGCAGTAGGATTCGTTAA	926pb
	6 – Reverse	CTTTGTGCTYCMTTTGG	
<i>deb-F</i>	7 – Forward	GGAAGRRTCGTTTTCTAGAC	1135pb
	7 – Reverse	TATGCGATTCAAGAACTGA	

Tabela 15: Primers para identificação de genes de resistência à vancomicina em Enterococcus.

Gene	Primer	Sequência de Oligonucleotídeos (5' – 3')	Tamanho do produto amplificado (pb)*
<i>vanA</i>	1 – Forward	GGG AAA ACG ACA ATT GC	732
	1 – Reverse	GTA CAA TGC GGC CGT TA	
<i>vanB</i>	2 – Forward	ACG GAA TGG GAA GCC GA	647
	2 – Reverse	TGC ACC CGA TTT CGT TC	
<i>vanC/2</i>	3 – Forward	ATG GAT TGG TAY TKG TAT	815/827
	3 – Reverse	TAG CGG GAG TGM CYM GTA A	
<i>vanD</i>	4 – Forward	TGT GGG ATG CGA TAT TCA A	500
	4 – Reverse	TGC AGC CAA GTA TCC GGT AA	
<i>vanE</i>	5 – Forward	TGT GGT ATC GGA GCT GCA G	430
	5 – Reverse	ATA GTT TAG CTG GTA AC	
<i>vanG</i>	6 – Forward	CGG CAT CCG CTG TTT TTG A	941
	6 – Reverse	GAA CGA TAG ACC AAT GCC TT	

Tabela 16: Primers para identificação das principais espécies de Enterococcus.

Gene	Primer	Oligonucleotídeos (5' – 3')	Produto amplificado (pb)
<i>ddlFaecalis</i>	1 – Forward	CACCTGAAGAACAGGC	475pb
	1 – Reverse	ATGGCTACTTCAATTTCACG	
<i>ddlFaecium</i>	2 – Forward	GAGTAAATCACTGAACGA	1091pb
	2 – Reverse	CGCTGATGGTATCGATTCAT	

Tabela 17: Primers para identificação de genes produtores de ESBL em bactérias Gram negativas.

Gene	Primer	Sequência de Oligonucleotídeos (5' – 3')	Tamanho do produto amplificado (pb)
<i>TEM</i>	1 – Forward	CATTCCGTGTCGCCCTTATT	800pb
	1 – Reverse	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	
<i>SHV</i>	2 – Forward	AGCCGCTTGAGCAAATTAAAC	713pb
	2 – Reverse	ATCCCAGATAAATCACAC	
<i>OXA-1-Like</i>	3 – Forward	GGCACCCAGATTCAACTTCAAG	564pb
	3 – Reverse	GACCCCAAGTTCCCTGTAAAGT	
<i>CTX-M grupo 1</i>	1 – Forward	TTAGGAARTGTGCCGCTGYA ^b	688pb
	1 – Reverse	CGATATCGTTGGTRCCAT ^b	
<i>CTX-M grupo 2</i>	2 – Forward	CGTTAACGGCACGATGAC	404pb
	2 – Reverse	CGATATCGTTGGTRCCAT ^b	
<i>CTX-M grupo 9</i>	3 – Forward	TCAAGCCTGCCGATCTGGT	561pb
	3 – Reverse	TGATTCTGCCGCTGAAG	
<i>CTX-M grupo 8/25</i>	1 – Forward	AACRCRCAGACGCTCTAC ^b	326pb
	1 – Reverse	TCGAGCCGGAASGTGTYAT ^b	

Tabela 18: Primers para identificação de genes de resistência aos carbapenêmicos em bactérias Gram negativas.

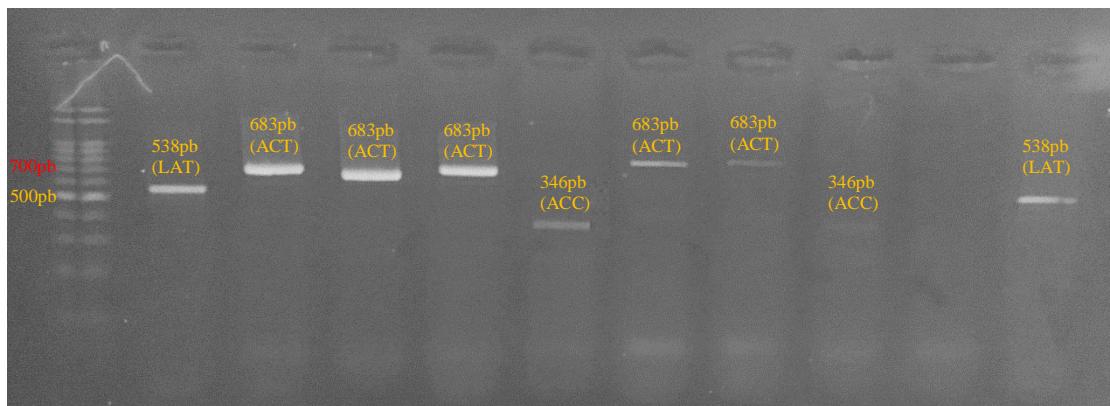
Gene	Primer	Sequência de Oligonucleotídeos (5' – 3')	Tamanho do produto amplificado (pb)
<i>NDM</i>	1 – Forward	GGGCAGTCGCTTCCAACGGT	456pb
	1 – Reverse	GTAGTGCTCAGTGTGGCAT	
<i>SPM</i>	1 – Forward	CCTACAATCTAACGGCGACC	650pb
	1 – Reverse	TCGCCGTGTCCAGGTATAAC	
<i>IMP</i>	1 – Forward	TTGACACTCCATTACDG ^b	139pb
	1 – Reverse	GATYGAGAATTAAGCCACYCT ^b	
<i>VIM</i>	2 – Forward	GATGGTGTGTCGCATA	390pb
	2 – Reverse	CGAATGCGCAGCACCAG	
<i>KPC</i>	3 – Forward	CATTCAAGGGCTTCTTGCTGC	538pb
	3 – Reverse	ACGACGGCATAGTCATTGC	
<i>GES</i>	1 – Forward	AGTCGGCTAGACCGGAAAG	399pb
	1 – Reverse	TTTGTCCGTGCTCAGGAT	
<i>OXA-48</i>	2 – Forward	GCTTGATGCCCTCGATT	281pb
	2 – Reverse	GATTGCTCCGTGGCCGAAA	
<i>PER</i>	3 – Forward	GCTCCGATAATGAAAGCGT	520pb
	3 – Reverse	TTCGGCTTGACTCGGCTGA	

Tabela 19: Primers para identificação de beta-lactamases do tipo ampC em bactérias Gram negativas.

Gene	Primer	Sequência de Oligonucleotídeos (5' – 3')	Tamanho do produto amplificado (pb)
<i>ACC</i>	1 – <i>Forward</i>	CACCTCCAGCGACTTGTAC	346pb
	1 – <i>Reverse</i>	GTTAGCCAGCATCACGATCC	
<i>FOX</i>	2 – <i>Forward</i>	CTACAGTGCGGGTGGTTT	162pb
	2 – <i>Reverse</i>	CTATTGCGGCCAGGTGA	
<i>MOX</i>	3 – <i>Forward</i>	GCAACAACGACAATCCATCCT	895pb
	3 – <i>Reverse</i>	GGGATAGGCGTAACTCTCCCAA	
<i>DHA</i>	4 – <i>Forward</i>	TGATGGCACAGCAGGATATTCT	977pb
	4 – <i>Reverse</i>	GCTTTGACTCTTCGGTATTCTG	
<i>LAT</i>	5 – <i>Forward</i>	CGAAGAGGCAATGACCAGAC	538pb
	5 – <i>Reverse</i>	ACGGACAGGGTTAGGATAGY ^b	
<i>ACT e MIR</i>	6 – <i>Forward</i>	CGGTAAAGCCGATGTTGCG	683pb
	6 – <i>Reverse</i>	AGCCTAACCCCTGATACA	

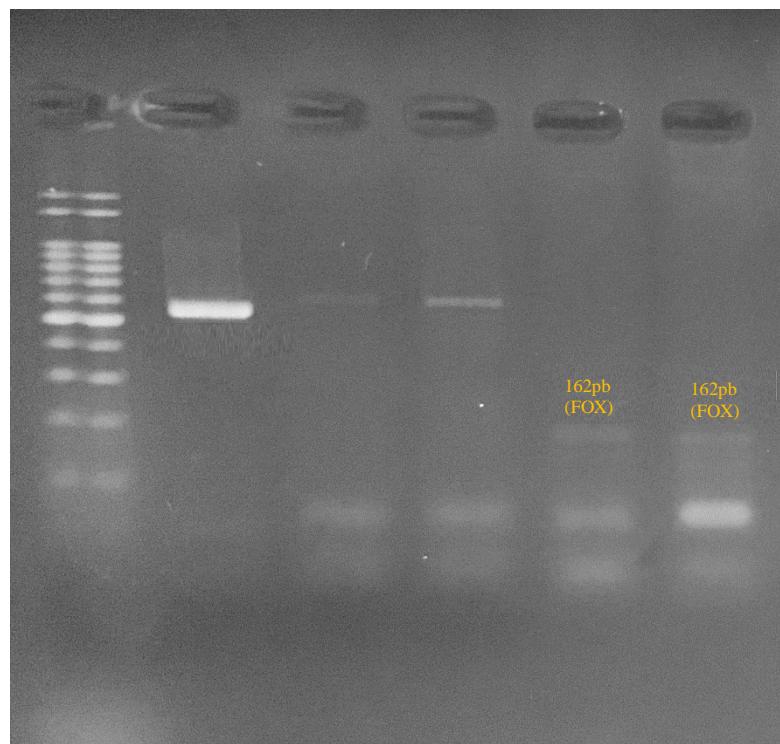
APÊNDICE C – Fotos

Figura 161: Multiplex-PCR para detecção de beta-lactamase do tipo ampC em bactérias Gram negativas.



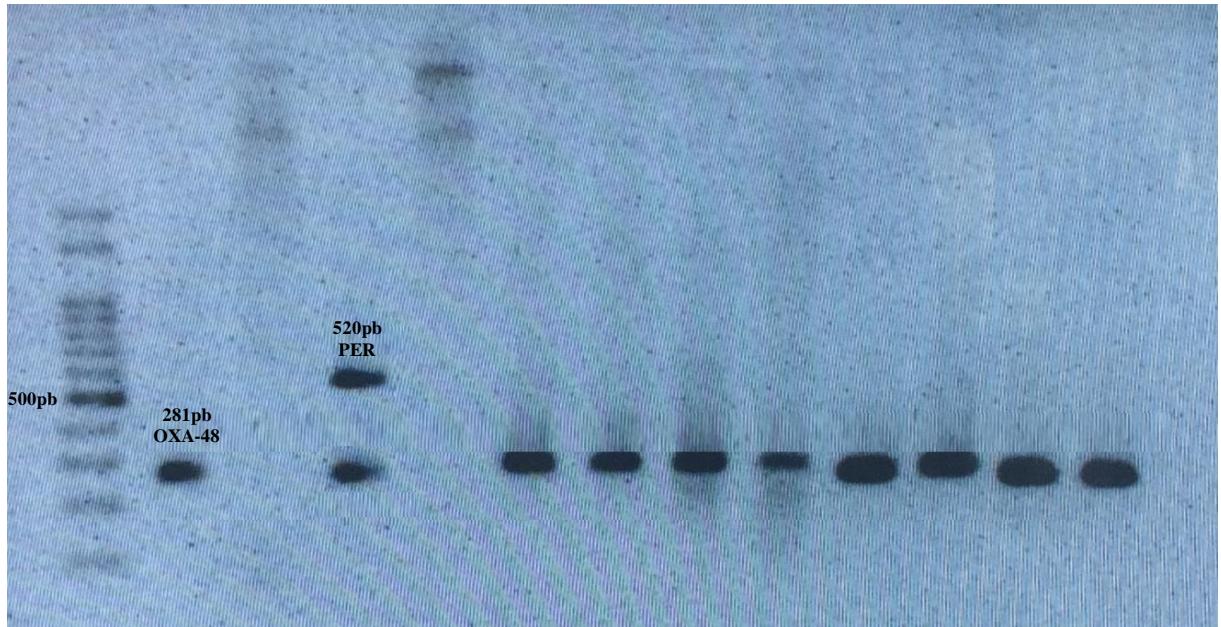
Fonte: Próprio autor, 2019

Figura 273: Multiplex-PCR para detecção de beta-lactamase do tipo ampC em bactérias Gram negativas.



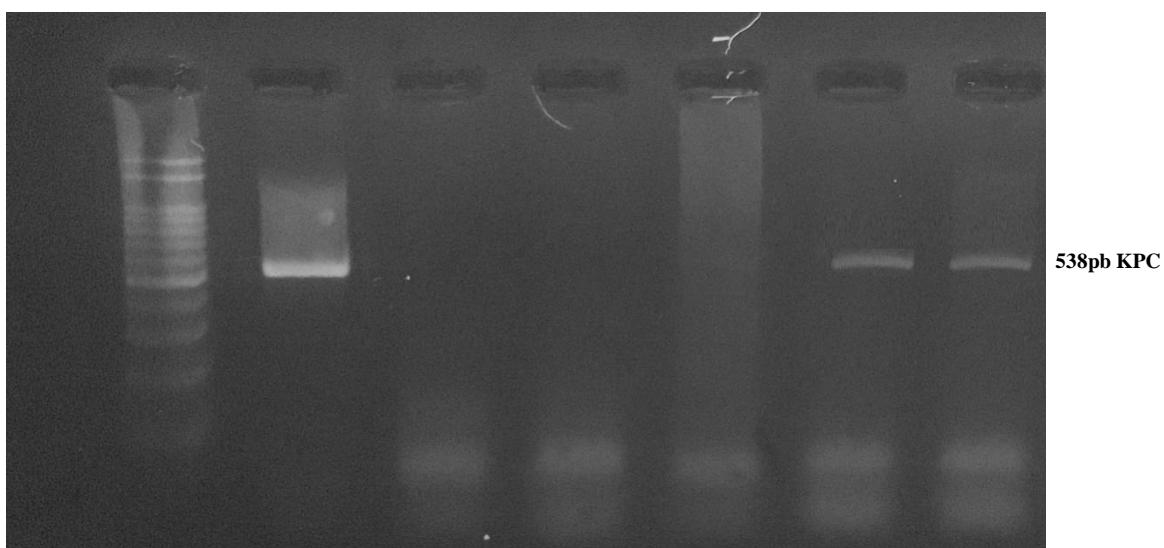
Fonte: Próprio autor, 2019

Figura 385: Multiplex-PCR para detecção de carbapenemase do tipo OXA-48 em bactérias Gram negativas.



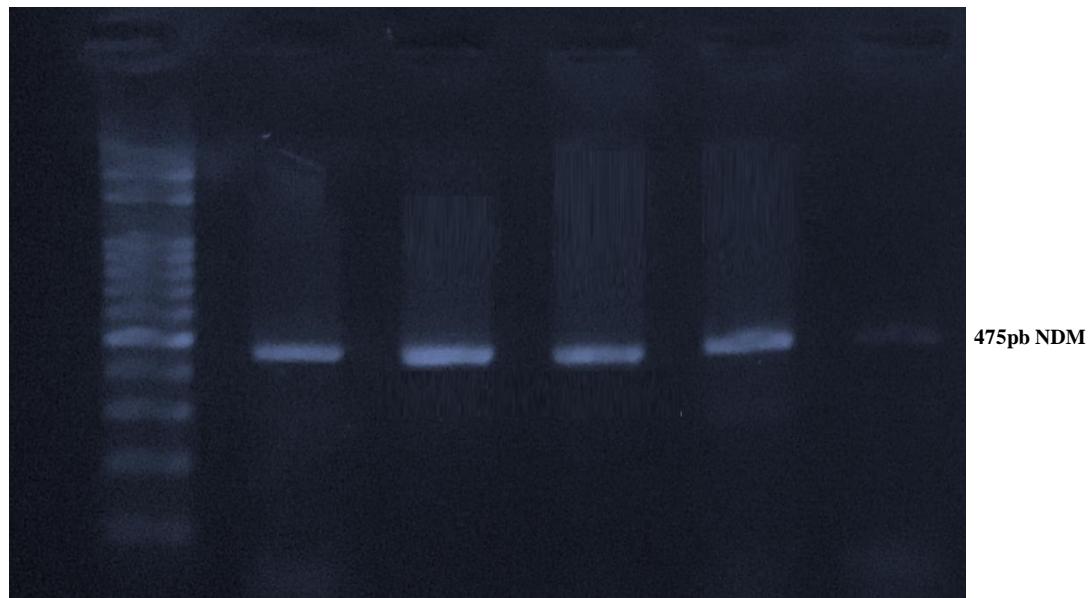
Fonte: Próprio autor, 2018

Figura 497: Multiplex-PCR para detecção de carbapenemase do tipo KPC em bactérias Gram negativas.



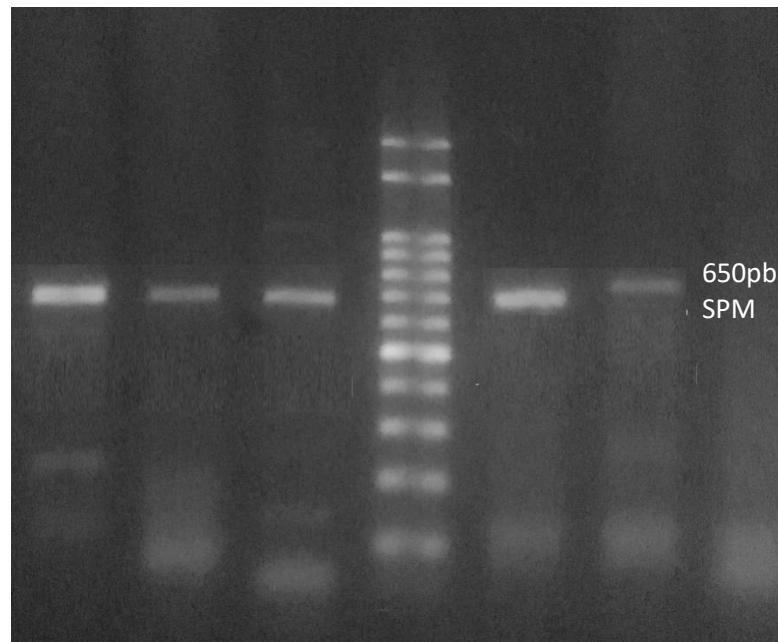
Fonte: Próprio autor, 2018

Figura 609: Detecção de carbapenemase do tipo NDM em bactérias Gram negativas



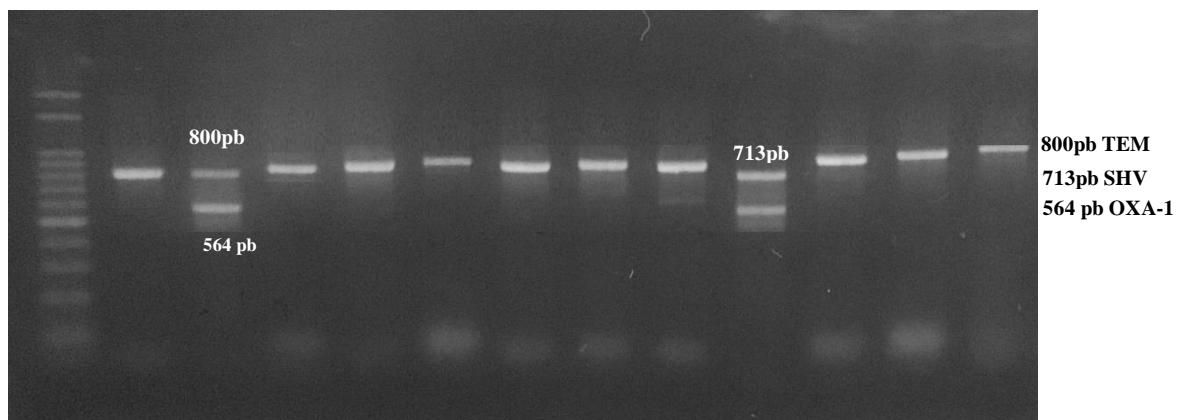
Fonte: Próprio autor, 2018

Figura 721: PCR para detecção do gene SPM.



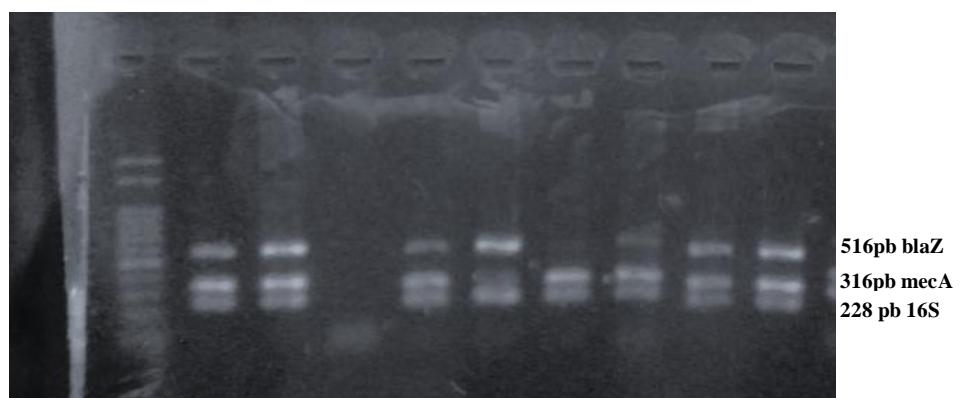
Fonte: Próprio autor, 2018

Figura 833: Multiplex-PCR para detecção de gene de beta-lactamase de espectro estendido em bactérias Gram negativas.



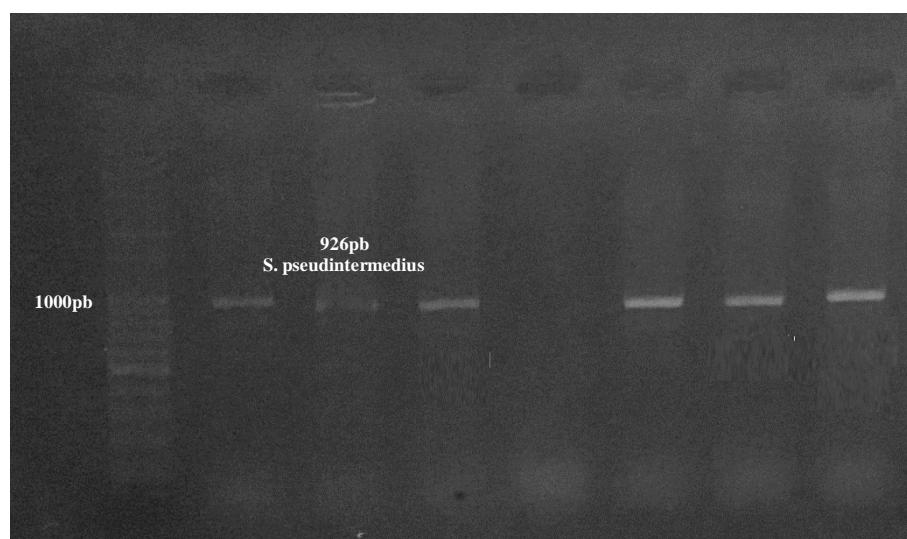
Fonte: Próprio autor, 2018

Figura 945: Detecção de genes de resistência aos beta-lactâmicos em *Staphylococcus*.



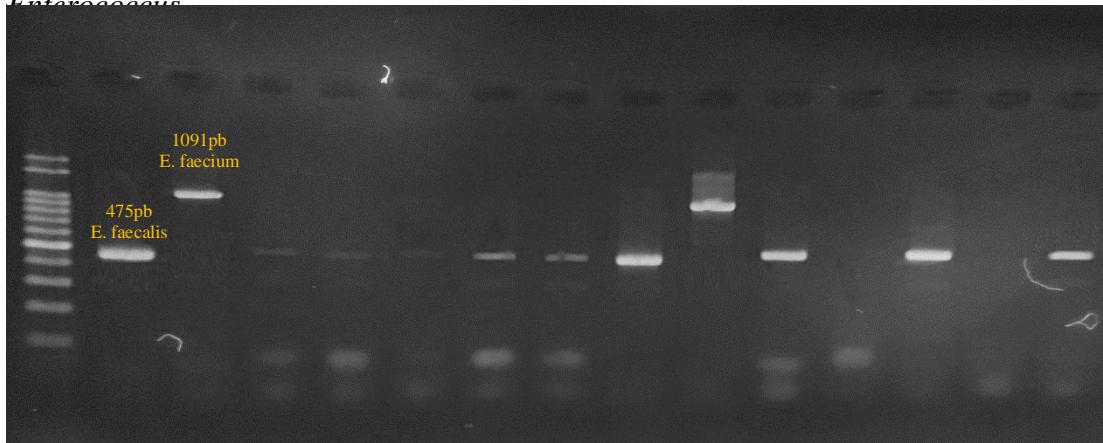
Fonte: Próprio autor, 2017

Figura 1057: Identificação das espécies de *Staphylococcus* coagulase positiva.



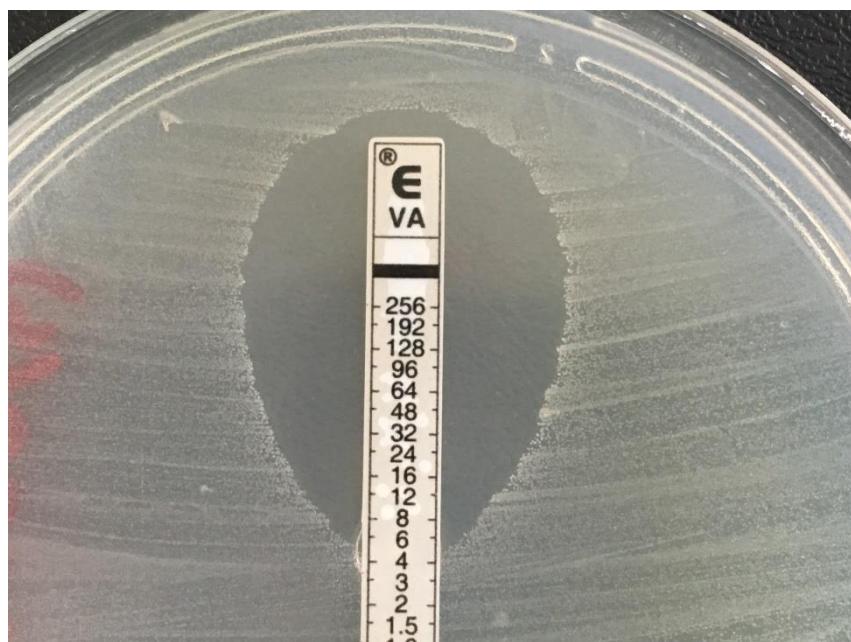
Fonte: Próprio autor, 2018

Figura 1169: Multiplex PCR para identificação das principais espécies de *Enterococcus*.



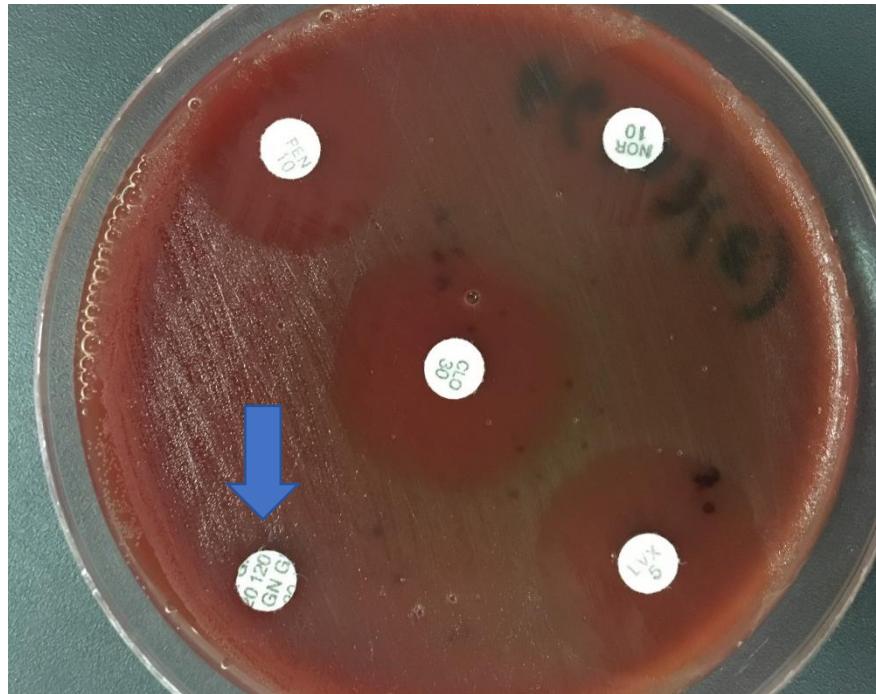
Fonte: Próprio autor, 2019

Figura 1281: Concentração inibitória mínima para vancomicina através da fita de Etest em um isolado de *Staphylococcus pseudintermedius*.



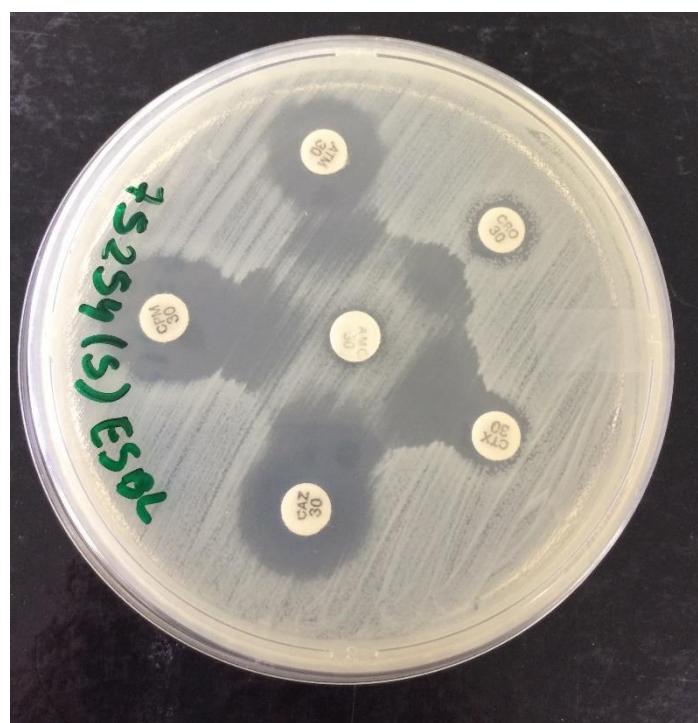
Fonte: Próprio autor, 2018

Figura 1473: Teste de sensibilidade antimicrobiana em isolado de *Enterococcus*. A flecha em azul sinaliza a resistência a altas doses de Gentamicina (120 ug), sugerindo a identificação de *Enterococcus* HLAR.



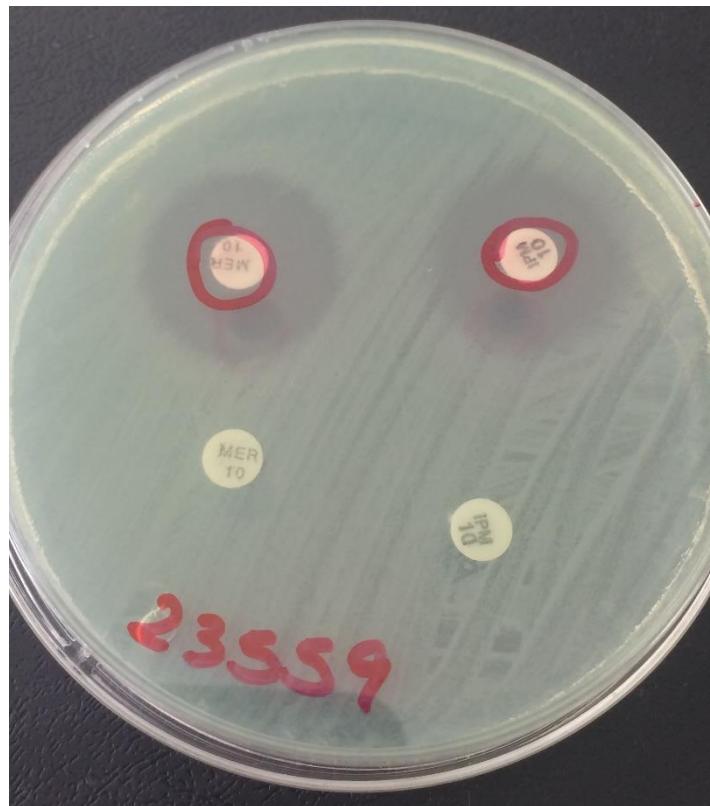
Fonte: Próprio autor, 2017

Figura 1585: Detecção fenotípica de ESBL com a presença do halo fantasma entre o disco de amoxicilina com clavulanato e os discos de cefalosporinas de 3^a e 4^a geração



Fonte: Próprio autor, 2017

Figura 1648: Teste fenotípico para identificação de bactérias produtoras de carbapenemase do tipo metalo-beta-lactamase utilizando discos de meropenem e imipenem puros e com adição de EDTA (discos dentro do círculo vermelho).



Fonte: Próprio autor, 2017