



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE RESIDÊNCIA EM ÁREA PROFISSIONAL DE SAÚDE EM
MEDICINA VETERINÁRIA**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE RESIDÊNCIA

Área de Concentração: Medicina Veterinária Preventiva – Bacterioses

LEONARDO BRUNO SAMPAIO DE OLIVERA

Recife, 2022

Leonardo Bruno Sampaio de Oliveira

Isolamento e detecção de bactérias produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) oriundos de infecção do trato urinário em cães e gatos atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco

Relatório apresentado ao Programa de Residência em Área Profissional da Saúde em Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito parcial para obtenção do título de Especialista em Medicina Veterinária Preventiva - Bacterioses.

Tutor: Dra. Erika Fernanda Torres Samico Fernandes Cavalcanti

Preceptor: Dr. Rinaldo Aparecido Mota

Recife, 2022

Lista de figuras

Figura 1: Prova da catalase positiva	14
Figura 2: Prova da Bile Esculina	15
Figura 3: Teste de tolerância ao sal	16
Figura 4: Ágar tríplice açúcar ferro	17
Figura 5: Ágar Citrato de Simmons	18
Figura 6: Ágar sulfeto Indol Motilidade	19
Figura 7: Fenilalanina desaminase.....	21
Figura 8: Caldo Ureia	21
Figura 9: Microscópico de campo escuro	25
Figura 10: Microscopia de <i>Mucor</i> spp.	26
Figura 11: Placa "contaminada" com <i>Aspergillus</i> spp com sua respectiva microscopia	26
Figura 12: Crescimento de <i>Candida</i> spp de amostra urinária	27
Figura 13: Imprint de lesão positivo para <i>Sporothrix</i> spp	28
Figura 14: Antibiograma preliminar	35
Figura 15: Teste confirmatório para ESBL, observar a deformidade dos halos (setas).	36

Lista de tabelas

Tabela 1: Perfil quantitativo dos exames realizados no Laboratório de Doenças Infecciosas dos Animais Domésticos entre março de 2020 e fevereiro de 2022.	12
Tabela 2: Cepas controle utilizadas	23
Tabela 3: Perfil de sensibilidade dos isolados ESBL positivos.....	38

Sumário

CAPÍTULO I	7
1. Introdução.....	9
2. Atividades desenvolvidas.....	11
2.1 Disciplinas.....	11
2.2 Atividades Práticas	11
2.2.1 Cultura e isolamento bacteriano	12
2.2.2 Coloração de Gram.....	13
2.2.3 Prova da catalase	14
2.2.4 Provas bioquímicas para Cocos Gram Positivos Catalase Negativa.....	15
2.2.5 Provas bioquímicas para Bacilos Gram negativos.....	16
2.2.6 Antibiograma.....	22
2.2.7 Pesquisa de <i>Leptospira</i> spp.....	24
2.2.8 Cultura fúngica.....	25
2.2.9 Imprint de lesão	27
2.2.10 Direto de pelo	28
2.3 Vivência no Serviço de Saúde Pública	28
2.3.1 Vigilância ambiental	29
2.3.2 Vigilância epidemiológica.....	29
CAPÍTULO II	31

Introdução	33
Material e métodos.....	34
Isolamento e identificação do microrganismo	34
Resultados	36
Discussão.....	36
Conclusão	39
Referências	40

CAPÍTULO I
RELATÓRIO DE ATIVIDADES - RESIDÊNCIA EM ÁREA PROFISSIONAL DE
SAÚDE EM MEDICINA VETERINÁRIA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal Rural de Pernambuco
Sistema Integrado de Bibliotecas
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- 048i Oliveira, Leonardo Bruno Sampaio de
Isolamento e detecção de bactérias produtoras de Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) oriundos de infecção do trato urinário em cães e gatos atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco / Leonardo Bruno Sampaio de Oliveira. - 2022.
43 f.
- Orientadora: Erika Fernanda Torres Samico Fernandes Cavalcanti.
Coorientador: Rinaldo Aparecido Mota.
Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Residência) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Residência em Área Profissional de Saúde em Medicina Veterinária, Recife, 2022.
1. Multirresistência. 2. Zona Fantasma. 3. Resistência bacteriana. I. Cavalcanti, Erika Fernanda Torres Samico Fernandes, orient. II. Mota, Rinaldo Aparecido, coorient. III. Título



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE RESIDÊNCIA EM ÁREA PROFISSIONAL DA SAÚDE - MEDICINA VETERINÁRIA

108ª REUNIÃO PARA DEFESA DE MONOGRAFIA DO PROGRAMA DE RESIDÊNCIA EM ÁREA PROFISSIONAL DA SAÚDE - MEDICINA VETERINÁRIA DO DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA DA UFRPE, 2022.

Às 10h (dez horas) do dia 24 de fevereiro de 2022 reuniu-se via Plataforma Meet, a Banca Examinadora presidida pelo (a) tutor (a) para apresentação da monografia de conclusão de residência na área de **Medicina Veterinária Preventiva – Bacterioses** de autoria do (a) aluno (a) **Leonardo Bruno Sampaio de Oliveira**. O (a) Presidente da Banca Examinadora, dando início aos trabalhos, concedeu a palavra ao (a) aluno (a) para breve apresentação da sua Monografia. Em seguida, concedeu a palavra, por ordem, à Banca Examinadora assegurando ao (a) aluno (a) o direito de resposta. Terminada a arguição a Banca Examinadora, passou aos trabalhos de julgamento, tendo considerado o trabalho APROVADO.

Recife, 24 de fevereiro de 2022.

Profa. Dra. Erika F. T. Samico Fernandes Cavalcanti (Presidente) _____

Dr. Denny Parente de Sá Barreto Maia Leite (Membro Titular) _____

Dr. Pedro Paulo F. de Albuquerque (Membro Titular) _____

Em tempo:

1. Introdução

A Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) introduziu, no ano de 2014, o Programa de Residência em Área Profissional de Saúde em Medicina Veterinária que contempla 11 áreas de atuação: Anestesiologia Veterinária; Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais; Clínica Médica de Pequenos Animais; Clínica Médica, Cirúrgica e da Reprodução de Grandes Animais; Diagnóstico por Imagem; Patologia; Patologia Clínica Veterinária; Medicina Veterinária Preventiva – Bacterioses; Medicina Veterinária Preventiva – Doenças Parasitárias; Medicina Veterinária Preventiva – Saúde Pública e Medicina Veterinária Preventiva – Víruses. Atualmente o programa é composto por 36 residentes atuando nessas áreas, sendo 18 no primeiro ano de residência e os demais no segundo ano.

O programa de residência possui duração de 24 meses e carga horária mínima de 5.760 horas (cinco mil setecentos e sessenta horas), das quais 1.152 horas (mil cento e cinquenta e duas horas – 20%) foram destinadas às atividades teóricas (teórico-práticas) e o restante, 4.608 horas (quatro mil seiscentos e oito horas – 80%) às atividades práticas. Além das atividades teóricas (teórico-práticas) e práticas específicas de cada uma de áreas de concentração, há uma carga horária mínima de 960 horas de atividades em saúde pública distribuídas nas áreas de Vigilância em Saúde e Atenção Básica em Saúde (NASF-AB).

A residência foi executada na área de Medicina Veterinária Preventiva (Bacterioses), no Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE, no laboratório de Doenças Infectocontagiosas dos Animais Domésticos (LDIC) do HOVET-UFRPE, durante o período de 02 de março de 2020 até 28 de fevereiro de 2022., sob tutoria da professora Dra. Érika Fernanda Torres Samico Fernandes Cavalcanti e preceptoria do professor Dr. Rinaldo Aparecido Mota.

Em decorrência das medidas de proteção à saúde da população durante a pandemia do SARS-CoV-2 (atual pandemia do COVID-19), as atividades no HOVET-UFRPE foram suspensas e, conseqüentemente, as atividades no LDIC foram iniciadas, somente a partir de dezembro de 2020. Em resposta a essa alteração no cronograma, as práticas em saúde pública estenderam-se por sete meses, de junho a novembro de 2021 no Distrito Sanitário II em Recife-PE. Dessa forma, objetivou-se descrever no capítulo I as atividades realizadas durante os dois anos do programa de residência e no capítulo II o artigo intitulado “Isolamento e detecção de bactérias

produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) oriundas de infecção do trato urinário em cães e gatos atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco”.

2. Atividades desenvolvidas

2.1 Disciplinas

O programa de residência apresenta uma parte teórica, para o desenvolvimento inicial do residente, que são compostas tanto por disciplinas do núcleo comum obrigatório quanto da área específica de atuação.

As disciplinas referentes ao núcleo comum são realizadas durante o primeiro mês de residência e na modalidade presencial, no entanto, por conta da suspensão das atividades acadêmicas presenciais em 2020, somente a disciplina de Bioestatística foi ofertada nesse modelo. As restantes, Políticas Públicas de Saúde, Metodologia Científica, Medicina Veterinária Preventiva e Integração, Ensino e Serviço foram desenvolvidas remotamente.

A disciplina do núcleo específico foi Procedimentos de Coleta de Material para Diagnóstico de Doenças em Animais e ainda foi disponibilizada a disciplina de Nefrologia e Urologia de Pequenos Animais de modo optativo para a área de bacterioses.

2.2 Atividades Práticas

As atividades foram realizadas no Laboratório de doenças Infectocontagiosas dos animais domésticos (LDIC) situado no Hospital Veterinário (HOVET), do Departamento de Medicina Veterinária, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (HOVET-DMV/UFRPE).

As amostras analisadas eram enviadas de outros setores presentes no HOVET e, obrigatoriamente, eram acompanhadas das respectivas requisições para os exames solicitados. Salienta-se que as requisições precisavam conter dados básicos do paciente (nome, raça, sexo e idade); do tutor (nome completo, telefone e endereço); do veterinário requisitante (nome e CRMV) e informações adicionais sobre a suspeita clínica e do uso recente de fármacos, para auxiliarem e possibilitarem os diagnósticos corretos e emissões de laudos mais robustos.

Os exames microbiológicos realizados eram cultura bacteriana com antibiograma, cultura fúngica, microscopia de campo escuro para diagnóstico sugestivo de leptospirose e exame direto para dermatofitose e esporotricose, sendo as culturas o maior número de exames no laboratório.

Também eram executadas atividades para a manutenção do laboratório, como descontaminação e esterilização de materiais, preparo de meios de cultura e provas bioquímicas.

Durante os dois anos de residência foram realizados um total de 709 exames de diferentes naturezas, como descritos na tabela 1.

Tabela 1: Perfil quantitativo dos exames realizados no Laboratório de Doenças Infecciosas dos Animais Domésticos entre março de 2020 e fevereiro de 2022.

Exame	Quantidade
Cultura bacteriana	261
Antibiograma	254
Exame direto de campo escuro	9
Cultura fúngica	152
Exames diretos (fungos)	33
TOTAL	709

Fonte: autor, (2022)

2.2.1 Cultura e isolamento bacteriano

As informações das requisições eram transcritas no livro de controle interno de amostras, em seguida a amostra era direcionada a cultura. O método de cultura diferia de acordo com a suspeita clínica do animal e da amostra recebida.

As amostras de urina eram semeadas utilizando dois meios de cultura, o ágar Cistina Lactose Eletrólito Deficiente (CLED) e o ágar MacConkey. Esses meios eram utilizados devido a origem do material e em resposta à grande parte das infecções do trato urinário serem decorrentes de bactérias entéricas. Dessa forma, o CLED foi utilizado devido a sua capacidade de inibir o véu do *Proteus* spp., microrganismo que, em cultura mista, pode se misturar com outras colônias bacterianas, enquanto o emprego do MacConkey foi com a finalidade de inibir

grande parte das cepas Gram positivas e acelerar o diagnóstico.

As amostras de líquido cavitário, cefalorraquidiano, otológica, punção nodular ou amostras de leite eram semeadas em ágar enriquecido contendo 5% de sangue de ovino desfibrinado (AS). Já espécimes clínicos de necropsia ou fragmentos de órgãos eram submetidos a um pré-enriquecimento por 24 horas em caldo infusão de cérebro e coração (BHI), posteriormente semeados em AS.

Todas as amostras eram semeadas, próximo ao bico de Bunsen, através de alça bacteriológica estéril e fria e, em seguida, realizava-se a incubação em estufa bacteriológica a 35 °C ($\pm 2^\circ\text{C}$) em condição aeróbica. Contudo, as amostras suspeitas de *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp. eram incubadas em microaerofilia utilizando o método da vela em jarra.

As amostras eram analisadas após 24hs do semeio original e, após a leitura para verificar o crescimento bacteriano, as colônias eram selecionadas e submetidas às técnicas de coloração de Gram e catalase. Contudo, nas situações de resultados negativos para crescimento microbiano, as amostras retornavam para estufa e eram analisadas com 48 e 72 horas. Transcorrido esse tempo, se o resultado permanecesse, as amostras eram consideradas como sem crescimento bacteriano na cultura e descartadas adequadamente.

2.2.2 Coloração de Gram

Havendo crescimento bacteriano, era adicionada sobre uma lâmina de microscopia, previamente limpa e seca e com o auxílio de uma alça bacteriológica, uma gota de solução salina estéril (NaCl; 0,85% p/v) ou água destilada. Em seguida, era retirada uma pequena quantidade da colônia bacteriana obtida, com movimentos rotatórios. O material era homogeneizado sobre a salina, obtendo um esfregaço oval, fino e uniforme. Finalizado esse processo, o esfregaço era deixado secar sob temperatura ambiente. Após a secagem, o mesmo era fixado à lâmina pela passagem desta, pelo interior da chama do Bico de Bunsen, repetindo-se este procedimento por cerca de três vezes. Após esfriar, a lâmina era coberta pelo corante primário (cristal violeta) e aguardado um minuto. Decorrido este intervalo de tempo esta foi lavada rapidamente com água destilada e coberta novamente, com uma solução de lugol (mordente), que permaneceu sobre o esfregaço pelo mesmo período de tempo. Ao finalizar essa etapa a lâmina foi inclinada e sobre o esfregaço

foi gotejado uma solução de álcool-acetona (50,0 %; v/v) por cerca de dez segundos e em seguida a lâmina foi novamente lavada com água destilada. Após esses processos foi adicionado solução de fucsina e decorridos 30 segundos a lâmina foi lavada com água destilada e seca em temperatura ambiente.

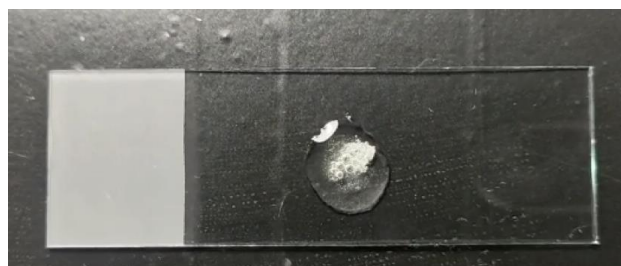
Após esse processo, a lâmina era levada ao microscópico óptico e visualizada com a objetiva de 100X, com a finalidade de visualizar se a amostra era Gram positiva (roxo), Gram negativa (rosa), coco ou bacilo, e sendo um coco era observada o arranjo bacteriano, pares, tetra, em estafilococos (cachos), ou em estreptococos (corrente), em seguida as amostras eram submetidas à prova da catalase.

2.2.3 Prova da catalase

Essa prova tem como objetivo avaliar se o microrganismo possui a enzima Catalase, utilizando uma lâmina limpa e sobre uma superfície escura era retirada uma pequena quantidade da cultura bacteriana e espalhada sobre a lâmina em movimentos circulares, após esse processo era adicionada uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% sobre o esfregaço se o mesmo apresentasse bolhas de modo instantâneo indicaria que a cepa bacteriana analisada possuía a enzima e está degradando o peróxido em hidrogênio e água, levando a formação das bolhas (figura 1).

Essa prova tinha que ser realizada com a colônia nova, não podendo ser realizada do semeio com mais de 24hs e não podendo ter sido utilizado meios seletivos, como o manitol salgado, com risco de falso negativo. Ao realizar o teste de uma placa de AS era tomado bastante cuidado para não levar meio de cultura no esfregaço, pois por conter sangue e pelo sangue possuir catalase poderia apresentar uma razão de falso positivo.

Figura 1: Prova da catalase positiva



Fonte: autor, (2022)

As amostras que se apresentavam como cocos Gram positivos, catalase negativa e com arranjo de cacho eram consideradas como pertencentes ao gênero *Staphylococcus* spp, já os cocos Gram positivos catalase negativo e bacilos Gram negativos eram submetidos a outras provas bioquímicas.

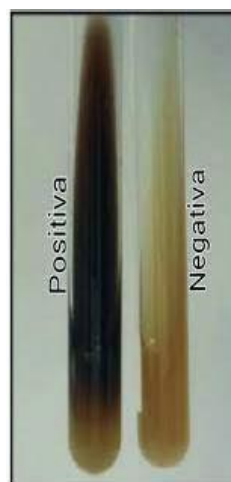
2.2.4 Provas bioquímicas para Cocos Gram Positivos e Catalase Negativa

Para esses isolados eram realizadas duas provas adicionais, o teste de tolerância ao sal e da bile esculina. Essas provas eram realizadas com o objetivo de diferenciar bactérias do gênero *Streptococcus* spp. do gênero *Enterococcus* spp.

2.2.4.1 Teste da bile esculina

O teste da bile esculina avalia a capacidade dos microrganismos crescerem na presença de sais biliares e de hidrolisarem a esculina em esculetina, que irá reagir com o citrato férrico presente no meio, formando um precipitado negro. Essa prova é utilizada para diferenciar as bactérias do gênero *Streptococcus* spp. e *Enterococcus* spp., contudo, algumas espécies de gênero *Streptococcus* podem hidrolisar a esculina, sendo assim, a prova precisa ser executada concomitantemente ao teste de crescimento em 6,5% de NaCl.

Figura 2: Prova da Bile Esculina



Legenda: A direita um microrganismo positivo evidenciando a mudança do meio de âmbar para preto, e a esquerda uma reação negativa, mantendo a cor original do meio.

Fonte: <https://bityli.com/zBfJL>

2.2.4.2 Teste de tolerância ao sal.

Como a prova anterior, esse bioquímico visa diferenciar *Streptococcus* spp. de *Enterococcus* spp. Esse meio consiste em um BHI com sua concentração de NaCl ajustada a 6,5% e o indicador de pH púrpura de bromocresol. Se o microrganismo consegue se desenvolver na presença de 6,5% de NaCl, irá acidificar o meio e essa mudança de pH é perceptível pela variação de uma coloração azul para uma tonalidade mais amarelada. Entretanto, essa prova também não pode ser realizada sozinha, visto que alguns *Streptococcus* conseguem se desenvolver na presença do sal. Dessa forma, se o microrganismo for positivo somente em uma das provas ele é considerado pertencente ao gênero *Streptococcus* spp. e caso seja positivo para ambas, é do gênero *Enterococcus* spp..

Figura 3: Teste de tolerância ao sal



Fonte: Autor, (2022)

2.2.5 Provas bioquímicas para Bacilos Gram negativos

2.2.5.1 Ágar tríplice açúcar ferro (TSI)

A fermentação dos açúcares glicose, lactose e/ou sacarose, assim como

a produção de ácido sulfídrico (H₂S) e a formação de gás eram avaliadas através da utilização do meio TSI.

Com a agulha microbiológica previamente flambada e fria, próximo ao bico Bunsen e utilizando todas as manobras assépticas, retirou-se uma porção da massa bacteriana e semeou-se no TSI, perfurando a sua base e estriando a parte inclinada, sendo estas incubadas em estufa bacteriológica a 35 °C ± 2.

A presença de uma coloração amarelada no TSI é decorrente de uma acidificação do pH, evidenciada pela mudança da cor do indicador de pH (vermelho de fenol), devido a produção de ácidos pela fermentação dos açúcares analisados. procedendo-se a leitura tanto da base do tubo quanto no seu ápice. A coloração amarela na base demonstra que a amostra fermentou glicose, enquanto a presença desta coloração no ápice, denota a fermentação da sacarose e/ou lactose. Se a base do TSI apresentar pequenas rachaduras ou bolhas de ar, atesta-se uma produção de gás por parte da bactéria. Por fim, se a amostra produzir ácido sulfídrico (H₂S), a base desse meio se encontraria enegrecida, em decorrência da reação deste ácido com o tiosulfato de sódio contido no meio (GARY et al., 2018).

Figura 4: Ágar tríplice açúcar ferro



Legenda: Variações de padrões fermentativos em TSI

Fonte: Autor, (2022)

2.2.5.2 Ágar Citrato de Simmons (CIT)

Para a detecção da utilização do citrato de sódio como uma única fonte de carbono foi utilizado o ágar Citrato de Simmons. Os isolados microbianos foram

semeadas por meio de estrias sobre a superfície do ágar, e o mesmo incubado por um período de 24hs. Decorrido este intervalo, foi realizada a leitura dos tubos para verificar a alteração da cor do indicador azul de bromotimol, de verde (neutro) para o azul (alcalino).

sendo que, se a amostra conseguir utilizar o citrato de sódio, como sua única fonte de carbono, devido a presença da enzima citrase, que converte o citrato em moléculas de piruvato e dióxido de carbono (CO_2). Estes produtos ao se combinarem com sais inorgânicos de amônia, presentes no meio de cultivo formariam bicarbonato de sódio (NaHCO_3) e amoníaco (NH_3), que eleva o pH do meio de cultura e produziriam uma reação alcalina, evidenciada por uma alteração da cor do indicador azul de bromotimol, de verde (neutro) para o azul (alcalino) (GARY et al., 2018).

Figura 5: Ágar Citrato de Simmons



Legenda: Tubo da esquerda evidenciando uma reação negativa e o da direita positiva

Fonte: Autor, (2022)

2.2.5.3 Ágar Sulfeto Indol Motilidade (SIM)

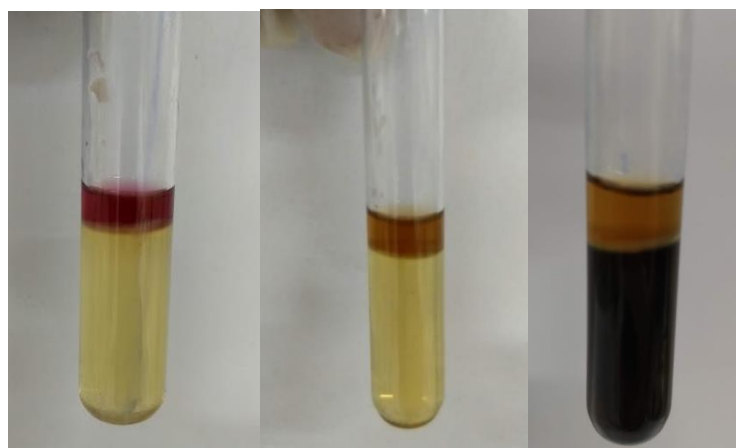
O ágar Sulfeto Indol Motilidade (SIM) foi utilizado para avaliar a produção de ácido sulfídrico (H_2S), indol e a motilidade dos microrganismos. Para a

inoculação das bactérias foi utilizado uma agulha microbiológica. A mesma foi introduzida no tubo de ensaio, perfurando o meio a uma profundidade de 2/3 do seu volume total e em seguida retirada pelo mesmo local de inoculação evitando oscilações. Decorrido o período de incubação de 24hs foi realizada a leitura da seguinte forma: se ao longo da linha de inoculação ou disseminado pelo meio fosse evidenciado um precipitado de coloração enegrecida, seria decorrente da produção de H₂S que surge da reação com o sulfato ferroso amoniacal (Fe(NH₄)₂ SO₄), formando sulfureto de ferro que é um precipitado negro insolúvel. A ausência do precipitado negro evidencia uma reação negativa.

É possível avaliar a presença de motilidade através de meio semissólido (possuindo até 0,4% de ágar), quando se observando a presença de turbidez que parte da linha de inoculação e se dissemina pelo meio. A ausência se caracteriza pela turvação somente na linha de inoculação.

O meio SIM ainda revela a presença ou não da enzima triptofanase produzida pelos microrganismos avaliados. A enzima realiza uma desaminação do aminoácido triptofano, presente no meio de cultura, e, dessa forma, ocasiona a liberação de subprodutos como ácido pirúvico, amônia e indol. O indol é um gás incolor detectável pela adição do reagente de Kovacs ou o reativo de Ehrlich (solução aquosa ou alcoólica de p-dimetil aminobenzaldeído, respectivamente). Na interface entre a cultura e o reagente, desenvolve-se um anel de cor rosada, em resposta à ligação do indol com o aldeído, em meio ácido, formando o composto colorido. Caso a amostra seja negativa haverá a formação de um anel com tonalidade de cor diferente (cor original do meio ou marrom)(GARY et al., 2018).

Figura 6: Ágar sulfeto Indol Motilidade



Fonte: Arquivo pessoal do autor

2.2.5.4 Caldo Clark-Lubs (VM/VP)

Para avaliação da produção de ácidos mistos ou do butileno glicol, decorrente da fermentação de glicose, foi utilizado o meio de cultura Clark-Lubs. Para detectar a presença destes produtos, após o período de incubação, foram adicionados, respectivamente, os reagentes Vermelho de Metila (VM) e Voges-Proskauer (VP), sendo esse último constituído pelas soluções de α naftol a 5,0% (p/v) e Hidróxido de potássio (KOH) a (40%; p/v).

Para esses testes, uma pequena porção do cultivo foi inoculado em dois tubos de ensaio contendo 1,0 mL do Caldo Clark-Lubs. Esses foram incubados por 24 horas a 35° C (± 2) em estufa bacteriológica. Transcorrido as 24 horas, um dos tubos de Clark Lubs foram testados para a prova do VP, pela adição de 0,6 mL de α -naftol a 5,0% e em seguida 0,2 mL de KOH a 40,0% (respectivamente). Em seguida, os tubos com cultivos foram agitados e permaneceram abertos (com intuito de expor os meios ao oxigênio) e foram mantidos em repouso por até 40 minutos.

As leituras foram feitas em dois intervalos de 20 minutos, se o meio viesse a apresentar uma coloração avermelhada o mesmo seria considerado como positivo, e se apresentassem ao final do período de leitura uma coloração acobreada, seriam admitidos como negativo, para a presença de acetoína.

Para a realização do teste de VM, adicionou-se 5 gotas (cerca de 250 μ L) do reagente Vermelho de Metila ao segundo tubo de Clark-Lubs.. Amostras que alteraram a sua coloração para um vermelho vivo instantaneamente foram consideradas positivas, enquanto as que apresentaram uma coloração acobreada foram consideradas negativas para a presença de ácidos mistos.

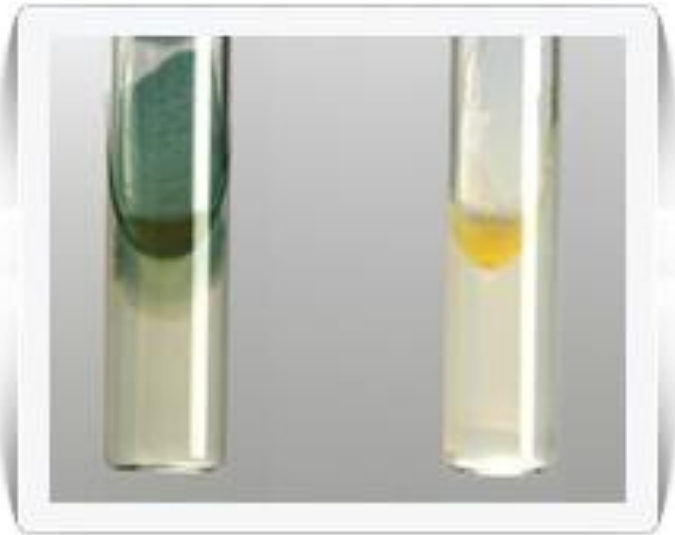
2.2.5.5 Lisina descarboxilase

Para a realização dessa prova era utilizado o meio ágar lisina de ferro, onde o mesmo era semeado por pique central, semelhante ao descrito no meio SIM. Com a finalidade de avaliar a descarboxilação da lisina através da degradação da lisina em cadaverina, conseqüentemente, alcalinizando o meio. Se o microrganismo fosse negativo o meio iria apresentar uma coloração amarelada, indicando a fermentação da glicose.

2.2.5.6 Fenilalanina desaminase

Para tal prova era utilizado o meio ágar fenilalanina, sendo esse meio de extrema importância para indicar um crescimento de *Proteus* spp. Pois a bactéria quando presente produz o ácido fenilpirúvico por desaminação oxidativa e após 24 horas de incubação com adição do cloreto férrico a 10%, o ácido reage com os sais de ferro dando uma tonalidade esverdeada a parte inclinada do meio. A reação sendo negativa o meio ficará amarelado, ou seja, da cor original do reagente (GARY et al., 2018).

Figura 7: Fenilalanina desaminase



Fonte: <https://bityli.com/YFSDz>

2.2.5.7 Ureia

Para a prova da ureia era utilizado um meio líquido contendo ureia, no qual era semeado com o auxílio de uma alça bacteriológica. Na presença da enzima uréase, sintetizada pelos microrganismos, a ureia presente no meio é degradada em amônia, perceptível pela coloração rosa pink no meio após 24 horas de semeio.

Figura 8: Caldo Ureia



Fonte: <https://bityli.com/pKbiF>

2.2.5.8 Fermentação de carboidratos Sorbitol e celobiose

Uma pequena quantidade de massa bacteriana foi suspensa no interior de dois tubos de ensaio contendo caldo para fermentação vermelho de fenol, acrescidos separadamente dos carboidratos sorbitol e celobiose, na concentração de 1%. Estes tubos foram incubados por até 72 horas a 35°C (± 2) em estufa bacteriológica. Decorrido o tempo, foi observado se houve uma alteração na coloração original do meio (Vermelho) para amarelo, em decorrência da produção de ácidos, resultantes da fermentação dos carboidratos.

Todas as provas bioquímicas realizadas bem como a interpretação das mesmas foram executadas como descrito por (GARY et al., 2018), utilizando como controle positivo e negativo para estas provas as bactérias presentes na tabela 2.

2.2.6 Antibiograma

O antibiograma é uma ferramenta para avaliar o perfil fenotípico de suscetibilidade dos microrganismos aos antimicrobianos. Essa avaliação resulta na classificação em sensíveis, intermediários e resistentes. No LDIC, a suscetibilidade aos antimicrobianos era obtida através do teste de disco-difusão, utilizando-se do meio Ágar Müeller-Hinton enriquecido com 5% de sangue desfibrinado de carneiro para os gêneros *Streptococcus* spp. e *Corynebacterium* spp e o meio Ágar Müeller-Hinton (sem enriquecimento) para os demais gêneros bacterianos.

As amostras com os microrganismos já identificados e oriundos de uma cultura pura eram suspensos em uma solução salina com o objetivo de se obter uma turvação semelhante ao da escala 0,5 de McFarland, o que equivale a uma concentração celular de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC)/mL. Após esse processo, eram semeadas por esgotamento na superfície das placas e, decorridos 5 minutos, essas eram acrescidos de 6 a 7 discos impregnados com antimicrobianos. As mesmas eram incubadas em estufa bacteriológica e após decorrido 24 horas os halos de inibições eram mensurados e comparados (BRAZILIAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING - BRCAST, 2021; CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI, 2020, 2021)

Tabela 2: Cepas controle utilizadas

Cepas	TSI	SIM	CIT	VM	VP	Sorbitol	Celobiose	Fenilalanina	Ureia	Lisina
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Ácido/Ácido H ₂ S: Negativo Gás: Positivo	H ₂ S: Negativo MOT: Positivo IND: Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	Ácido/Ácido H ₂ S: Negativo Gás: Positivo	H ₂ S: Negativo MOT: Negativo IND: Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	*	*	*	*	*
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	Ácido/Ácido H ₂ S: Negativo Gás: Positivo	H ₂ S: Negativo MOT: Positivo IND: Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	*	*	*
<i>Proteus mirabilis</i> ATCC 25933	Alcalino/Ácido H ₂ S: Positivo Gás: Positivo	H ₂ S: Positivo MOT: Positivo IND: Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo

Fonte: (GARY et al., 2018)

TSI: Ágar tríplice açúcar ferro; SIM: Ágar Sulfeto Indol Motilidade; CIT: Ágar Citrato de Simmons; VM: vermelho de metila; VP: voges-Proskauer; H₂S: Sulfeto de hidrogênio; IND: Indol; MOT: Motilidade; *Não utilizada para a prova

Os antimicrobianos eram escolhidos com base no microrganismo isolado e no sítio de infecção, sendo utilizados: Amoxicilina + ácido clavulânico (20/10µg); cotrimoxazol (25µg), tetraciclina (30µg), Doxiciclinina (30µg), Ciprofloxacina (5µg), Marbofloxacina (5µg) Enrofloxacina (5µg), Amicacina (30µg), Gentamicina (10µg), Tobramicina (10µg), Cefoxitina (30µg), Ceftriaxona (30µg), Cefotaxima (30µg), Ceftazidima (30µg), Cefepime (30µg); Aztreonama (30µg), Imipenem (10µg), Meropenem (10µg), Piperacilina + Tazobactam (30/6µg), Cefalexina (30µg), Cloranfenicol (30µg), Nitrofurantoína (300 µg), Penicilina G (10U), Ampicilina (10µg), Eritromicina (15µg), Clindamicina (2µg), Vancomicina (30µg) e Ceftiofur (30µg).

2.2.7 Pesquisa de *Leptospira* spp.

Esse exame avalia a presença de espiroquetas na urina, sendo utilizado para o diagnóstico presuntivo de leptospirose, uma vez que é possível correlacionar a sintomatologia do animal com os resultados obtidos na técnica e, dessa forma, traçar uma suspeita clínica e um direcionamento ao tratamento.

A urina direcionada ao laboratório para ser submetida a este procedimento diagnóstico teria que ser coletada por cistocentese, visando minimizar a ocorrência de bactérias presentes na microbiota e diminuir a ocorrência de espermatozóides, no caso de machos.

Um volume de 3,0 mL de urina era colocado em um tubo de ensaio e centrifugado a 2500 rotações por minuto (RPM) durante cinco minutos. Decorrido esse tempo, era retirada uma alíquota de 25 µL do precipitado e era colocado sobre uma lâmina de microscopia, previamente limpa e sobre este uma lâminula. Essa preparação era levada ao microscópio de campo escuro e observado na objetiva de 100x a procura de bactérias que se encontravam movimentando-se pelo campo em forma de espiral (ANVISA, 2004).

Figura 9: Microscópico de campo escuro



Fonte: Autor, (2022)

2.2.8 Cultura fúngica

As amostras destinadas a cultura fúngica eram semeadas em ágar Sabouraud® ou por esgotamento ou dispendo o material sobre a placa. Pela técnica por esgotamento o próprio swab fica impregnado com a amostra, de modo que foi semeado por toda a placa. A técnica de dispor o material era utilizada em amostras de pelo. Empregando-se uma pinça era colocado uma pequena quantidade deste material no centro da placa e depois com a mesma pinça os fios eram espalhados por ela em quatro pontos diferentes. Por fim a placa era envolta com plástico filme (para evitar a entrada de ácaros que se alimentam dos fungos) e incubadas em estufa a 25 °C durante 7-22 dias.

Após sete dias era realizada a leitura das placas, nos casos de ausência de crescimento do microrganismo, essas eram novamente incubadas e, após 15 dias, relatava-se o crescimento final dos fungos. Os fungos eram avaliados quanto a seus aspectos macroscópicos e microscópicos, sendo as lâminas coradas com Lactofenol Azul Algodão ou pelo Gram.

O Lactofenol Azul Algodão era utilizado para a visualização de fungos filamentosos presentes na cultura, por intermédio da retirada de uma fração de fita

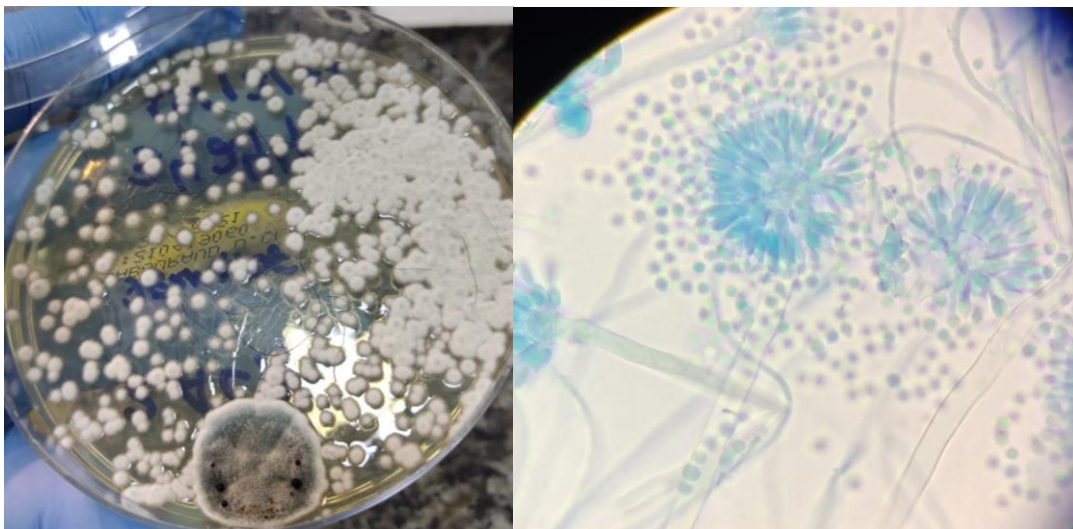
adesiva transparente, essa era pressionada sobre as colônias fúngicas. Em seguida, a fita era colada em uma lâmina de microscopia, contendo previamente uma gota de azul de lactofenol. Decorrido esse processo, a lâmina era levada ao microscópio, sendo observada na objetiva de 40x e 100x.

Figura 10: Microscopia de *Mucor* spp.



Fonte: Arquivo, (2022)

Figura 11: Placa "contaminada" com *Aspergillus* spp com sua respectiva microscopia



Fonte: Autor, (2022)

A técnica de Gram era utilizada para a visualização de fungos

leveduriformes, como *Candida* spp. e *Malassezia* spp., onde com uma alça microbiológica era retirada uma porção de uma colônia fúngica, sendo esta homogeneizada com movimentos circulares sobre uma lâmina de microscopia contendo um pouco de salina estéril. Depois a lâmina era corada normalmente pela técnica de Gram.

Figura 12: Crescimento de *Candida* spp. de amostra urinária

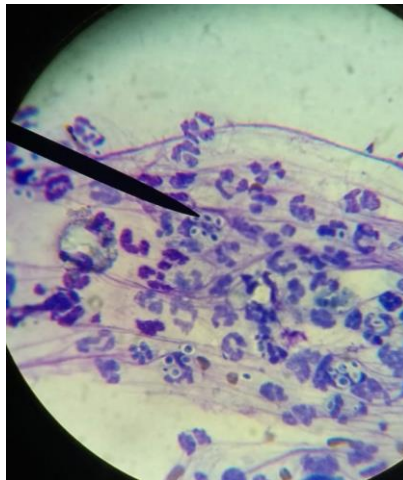


Fonte: Autor, (2022).

2.2.9 *Imprint* de lesão

O *Imprint* é utilizado como método de diagnóstico rápido para esporotricose. A lesão do animal era limpa com gaze e escarificada com swab estéril, depois dessa etapa eram feitas duas lâminas de *imprint*. Essas eram pressionadas três vezes na lesão e, posteriormente, coradas com Panótico rápido. Para identificar esporos dos fungos do gênero *Sporothrix* spp., as lâminas eram visualizadas ao microscópico nas objetivas de 40x e 100x. O *Sporothrix* spp. poderiam estar contido no interior de fagócitos (macrófagos) ou livres.

Figura 13: *Imprint* de lesão positivo para *Sporothrix* spp.



Fonte: Autor, 2022

2.2.10 Direto de pelo

Os animais suspeitos de dermatofitoses eram encaminhados para exame direto e cultura fúngica dos pelos. pelos sejam retirados tanto das bordas das lesões, devido ao crescimento centrífugo dos fungos, quanto haja retirada junto com raiz, uma vez que se presente, o fungo é localizado próximo à essa área. O animal não deve estar fazendo uso de medicamento antifúngico, pois pode ocasionar a um falso negativo(DOS SANTOS; COELHO; NAPPI, 2002).

Os pelos eram postos sobre uma lâmina de microscopia previamente limpa, e sobre este era adicionado KOH a 20% para a clarificação do pelo, sendo este coberto por uma lamínula e após 10 minutos esta era levada ao microscópio de luz branca sob a objetiva de 100X, sendo observado se o pelo encontrava-se íntegro e a existência de esporos fúngicos dentro (endotrix) ou fora (ectotrix) do pelo.

2.3 Vivência no Serviço de Saúde Pública

As atividades na saúde pública foram desenvolvidas no Distrito Sanitário 2, situado no município de Recife-PE, sendo realizada nas três vigilâncias(Ambiental, Epidemiológica e Sanitária).

2.3.1 Vigilância Ambiental

As atividades nesse setor iniciaram em junho de 2020, com duração de trinta dias, contudo devido à pandemia da COVID-19 as atividades presenciais estavam bastante restritas, sendo realizadas durante esse período atividades remotas, como apresentações de seminários e sobre a função da vigilância, ocorrendo também visitas presenciais pontuais.

Presencialmente foram realizadas atividades administrativas, como ajuda na elaboração de escalas de trabalho dos agentes de saúde, preenchimentos de tabelas e atendimento ao público por via telefônica.

2.3.2 Vigilância Sanitária

As atividades nessa vigilância também tiveram uma duração de um mês, onde no turno da manhã eram feitas visitas diárias em vários estabelecimentos, como farmácias, restaurantes, clínicas odontológicas, mercados, bares e entre outros. Com o intuito de constatar o estado de higiene dos estabelecimentos e averiguar se esses encontravam-se conforme as normas vigentes. Essas visitas poderiam ser marcadas com o proprietário do local, se estas fossem para a emissão ou renovação da licença de sanitária.

As vistorias também eram realizadas mediante denúncias de inconformidade, principalmente sobre mau acondicionamento de alimentos, venda de produtos fora do prazo de validade, falta de higiene no preparo dos alimentos e devido a pandemia eram recebidas bastantes denúncias de locais com aglomeração e de funcionários do estabelecimento sem máscara e não cumprindo distanciamento.

No período da tarde eram realizadas as atividades administrativas da vigilância, como a conferência de documentações para emissão de futuras licenças.

2.3.2 Vigilância Epidemiológica

Devido a pandemia do Covid-19 e da alta demanda de atividades relacionadas a essa vigilância, a participação nessa vigilância teve uma duração de quatro meses, sendo realizadas atividades como investigação de óbito por covid 19,

aonde a gente iria atrás de um parente próximo de alguém que veio a óbito por suspeita de covid para confirmar a doença através de questionário.

Também foi realizadas atividades de coleta de sangue para o diagnóstico de arboviroses (Dengue, Chikungunya, Zika) e Sarampo, onde o agente de saúde da área direcionava algumas pessoas da sua área responsável para a confirmação sorológica.

Foi realizado acompanhamento vacinal contra a raiva, onde humanos que foram mordidos por cães, gatos e morcegos eram acompanhados por via telefônica para confirmação do protocolo vacinal.

Era realizada atividade de liberação de laudo de COVID 19 bem como acompanhamento telefônico das pessoas positivas, para avaliar a progressão dos casos. E por fim as plataformas SINAN e DATASUS eram alimentadas com os resultados de arboviroses e COVID, respectivamente.

As atividades nas vigilâncias desempenham um papel importante na formação do residente, pois o mesmo é exposto a outras atividades distintas da sua área de atuação, sendo de suma importância na Saúde Pública.

2..4 Estágio de vivência

O estágio de vivência foi realizado no laboratório de Diagnóstico Veterinário (UDVET) em Teresina-PI em dezembro de 2021. O estágio foi realizado com ênfase em patologia clínica, onde eram realizados coleta de sangue para hematologia e bioquímico, Hemograma, Bioquímica sérica, provas sorológicas para Parvovirose, Cinomose, Erlichiose, Anaplasnose, FIV/FelV e Leishmaniose sendo estas feitas em Kits comerciais como immunocomb, alere e SNAP 4dx plus.

Eram realizadas urinálise, pesquisa de parasitas nas fezes pelas técnicas de Willis-Mollay e Hoffman além de cultura com antibiograma de diversos espécimes clínicos.

CAPÍTULO II

Isolamento e detecção de bactérias produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) oriundos de infecção do trato urinário em cães e gatos atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco

Isolamento e detecção de bactérias produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) oriundos de infecção do trato urinário em cães e gatos atendidos no hospital veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco

Resumo

A resistência aos antimicrobianos é um problema emergente que arrasa o mundo moderno, devido ao aparecimento de microrganismos com capacidade de resistirem à ação dos mais diversos antimicrobianos, sendo o uso indiscriminado desses fármacos apontados como uma das principais causas da problemática. Um dos mecanismos de resistência que vem apresentando destaque são as β -lactamases de espectro estendido (ESBL), que conferem as bactérias resistência as cefalosporinas e aos monobactâmicos. Dessa forma, objetivou-se nesse trabalho isolar e avaliar a presença de microrganismos apresentando β -lactamases de espectro estendido de infecção urinária em pequenos animais atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco (HOVET) no período de março de 2020 a fevereiro de 2022. Foram analisadas 106 amostras de urina remetidas ao Laboratório de Doenças Infectocontagiosas dos Animais Domésticos (LDIC), e dessas foram isoladas 4/106 (3,77%) cepas ESBL positivas, e todas identificadas como *Escherichia coli*. O monitoramento da presença desses microrganismos é de suma importância para o controle da disseminação dessas cepas entre animais e humanos, evidenciando a importância da detecção de bactérias com esse mecanismo de resistência para a escolha do tratamento adequado.

Palavras-chaves: Multirresistência, Zona Fantasma, Resistência bacteriana.

Introdução

A infecção do trato urinário (ITU) é um dos principais problemas que acomete pequenos animais, sendo uma comorbidade decorrente principalmente de microrganismos residentes na microbiota entérica, contudo podem ocorrer casos raros por bactérias Gram positivas (ARIANE MARTINS FERNANDES; VALÉRIA REGIA FRANCO SOUSA, 2017).

Essas infecções ocorrem principalmente por ascensão do microrganismo pelo trato urogenital, transmigração bacteriana ou introdução de cateter. A ocorrência dos casos está diretamente relacionada com o estado clínico do animal e a presença de fatores predisponentes, como atonia de bexiga, redução da referência de micção e volume urinário (BAHR ARIAS et al., 2013; PEREIRA; AGUIAR; NERCOLINI, 2020).

Com o passar dos anos as bactérias vem apresentando uma evolução no que condiz com suas capacidades de resistirem aos antimicrobianos. Segundo Sato et al., (2015) o uso intensivo de antimicrobianos do grupo dos antibióticos e/ou quimioterápicos podem resultar na seleção de bactérias resistentes, tornando a ação dos princípios ativos menos eficazes e permitindo que bactérias patogênicas se adaptem ao ambiente competitivo.

Diante disso, após o emprego de um fármaco antimicrobiano, principalmente os de amplo espectro, pode-se observar a elevação do percentual de cepas resistentes entre bactérias patogênicas e comensais. *Escherichia coli* está entre as principais espécies que tem apresentado relatados acerca de resistência antibiótica, ocasionada por diversos mecanismos de resistência codificados por diferentes genes (COSTA et al., 2009; FÁVERO et al., 2011; SILVA et al., 2015).

Nesse sentido, algumas estirpes conseguiram desenvolver vários mecanismos para debelar a ação desses fármacos, como o desenvolvimento de bombas de efluxo, mudança estrutural no local de ligação do antimicrobiano e também o desenvolvimento de enzimas que inativam os antibióticos, como no caso as β -lactamases de espectro estendido (ESBL) (MOSQUITO et al., 2011).

Sendo assim, as bactérias ESBL positivas tornam-se capazes de hidrolisar a maioria das penicilinas e cefalosporinas, abrangendo os oximino- β -lactâmicos (cefuroxima, cefalosporinas de terceira e quartas gerações e aztreonam), porém apresentam sensibilidade às cefamicinas (cefoxitina) ou carbapenêmicos.

Entretanto, alguns inibidores de β -lactamase como o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam conseguem inibir as ESBL *in vitro* (VERDI et al., 2016).

Dessa forma, devido ao crescente aumento no número de cepas multirresistentes e a extensa subnotificação das bactérias ESBL positivas objetivou-se nesse trabalho isolar e avaliar a presença de microrganismos apresentando β -lactamases de espectro estendido de infecção urinária em pequenos animais atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Federal Rural de Pernambuco no período de março de 2020 a fevereiro de 2022.

Material e Métodos

Coleta do material

Os cães e gatos atendidos no HOVET com suspeitas de infecção do trato urinário eram direcionados pelos clínicos para o setor de diagnóstico por imagem para realizar a coleta da urina por cistocentese. Após esse processo a amostra era direcionada para o LDIC o mais rápido possível, desse modo evitando contaminações.

Isolamento e identificação do microrganismo

Para o isolamento inicial foi utilizado dois meios de cultura, o ágar Cistina Lactose Eletrólito Deficiente (CLED) e o ágar MacConkey, sendo os dois meios para isolamento de Gram positivo e Gram negativos respectivamente, incubados em estufa bacteriológica a 35 °C (± 2) em atmosfera aeróbia por 24hs.

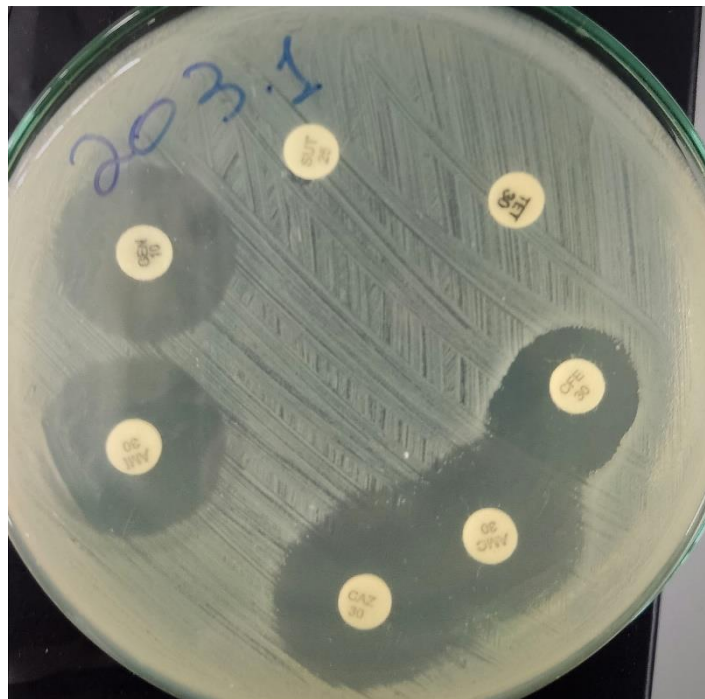
Após leitura inicial, confirmando-se crescimento bacteriano e, através da técnica de Gram, verificando-se que são bacilos Gram-negativos, as amostras eram submetidas a diversas provas bioquímicas, como: ágar tríplice açúcar ferro (TSI), ágar citrato de Simmons (CIT), ágar sulfeto indol motilidade (SIM), caldo Vermelho de Metila (VM), Voges-Proskauer (VP), lisina descarboxilase, fenilalanina desaminase, ureia e fermentação de sorbitol e celobiose com o intuito de identificar o gênero e a espécie bacteriana, conforme (GARY et al., 2018).

Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

Os isolados bacterianos identificados foram submetidos à avaliação de sensibilidade antimicrobiana *in vitro*, por meio da técnica de disco-difusão, de acordo com as normas estabelecidas pelo Clinical Laboratory Standards, utilizando o ágar Müller Hinton (MH) (CLSI, 2018).

A detecção de ESBL era realizada em dois momentos, primeiro era feita uma análise preliminar que consistia na avaliação da resistência as cefalosporinas e, nessa mesma placa, eram posicionados os discos de amoxicilina com ácido clavulânico (AMC) próximo às cefalosporinas, conforme a imagem.

Figura 14: Antibiograma preliminar



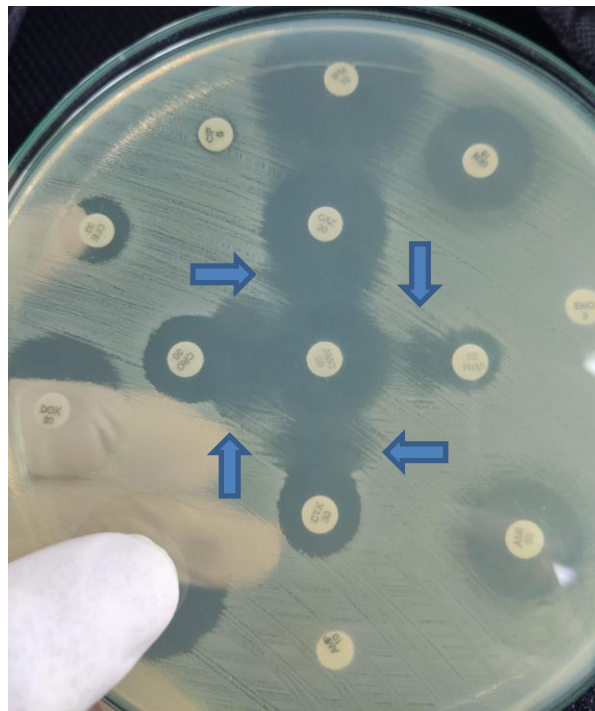
Fonte: arquivo pessoal

As aferições dos halos de inibição em torno dos antibióticos testados foram realizadas com o auxílio de um paquímetro e os valores obtidos foram analisados como preconizado pelos documentos VET08 (CLSI, 2020), M100 (CLSI, 2021) e (BrCAST, 2021). Foram utilizadas para estes testes as seguintes cepas controles: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603.

As amostras que apresentaram resistência as cefalosporinas e/ou alguma deformidade entre o halo de AMC foram submetidas ao teste confirmatório. Para identificação da enzima ESBL, no presente estudo, adotou-se o Teste de Sinergismos de disco duplo (TSDD). Esse teste é realizado utilizando discos de

cefalosporinas (cefotaxima, ceftazidima, cefepima), sendo eles organizados de tal maneira que fiquem próximos (20 a 30 mm de distância entre os centros dos discos) de discos impregnados de amoxicilina acrescido do inibidor ácido clavulânico. A amostra é caracterizada como positiva quando existe a formação de uma zona fantasma (aumento da zona de inibição) em qualquer um dos discos das cefalosporinas em direção ao disco com ácido clavulânico (BRCAST, 2018).

Figura 15: Teste confirmatório para ESBL, observar a deformidade dos halos (setas).



Fonte: arquivo pessoal

Resultados

Das 106 amostras de urinas que foram enviadas ao LDIC, obteve-se 4/106 (3,77%) de isolados confirmados como *E. coli* produtoras de β -lactamases de espectro estendido.

Discussão

A multirresistência é um fenômeno extremamente relevante, pois compromete a eficácia dos fármacos utilizados para a terapia de possíveis enfermidades causadas por microrganismos tais como *E. coli*. Para Magiorakos et al. (2012), bactérias multirresistentes são aquelas que apresentam resistência a três ou

mais classes ou subclasses de agentes antimicrobianos.

Cepas multirresistentes de *E. coli* vem sendo identificadas como causa primária de infecções no trato urinário, meningite neonatal, sepse nosocomial e enterites, nos seres humanos. A resistência aos antimicrobianos restringem os tratamentos disponíveis, dificultando e podendo levar até a morte, devido ineficiência destes fármacos (SCHNEIDER; NADVORNY; SCHMIDT, 2009).

Nesse sentido, das quatro cepas confirmadas, todas foram classificadas como multirresistentes. Entretanto, a presença de ESBL não indica que a cepa possa ser classificada dessa maneira, pois isolados produtores de β -lactamases de espectro estendido podem conter outros meios que abrangem o leque de resistência (LAGO; FUENTEFRIA; FUENTEFRIA, 2010). Na tabela 2 foi demonstrado o perfil de resistência aos fármacos utilizados.

Segundo o CLSI (2018) não há a necessidade da realização de testes confirmatórios para detecção de ESBL em laboratórios clínicos, visto que houve uma redução no diâmetro dos halos e isso seria medida suficiente para indicar uma possível resistência. Contudo, uma das bactérias isoladas se apresentou de modo divergente, a mesma apresentava diâmetros de inibição indicativos de um microrganismo sensível, entretanto, houve a formação da zona fantasma.

O CLSI por ser direcionado a microbiologia humana, quando voltada a veterinária esses halos de inibição ainda podem não indicar a presença de resistência a essas drogas. Dessa forma, o microrganismo em questão, quando analisado isoladamente apresentou somente resistência a Cefalexina (cefalosporina de primeira geração), mas apresentava perfil compatível com sensibilidade ao aztreonam, ceftazidima, cefepime e Cefotaxima. Adicionalmente, foi realizado o teste de sinergismo de disco duplo e constatada a presença da zona fantasma, esse microrganismo, como indica a ANVISA (2008), foi reportado como resistente a todas as cefalosporinas e ao aztreonam.

A presença de cepas ESBL em infecções veterinárias pode acarretar ao uso de antimicrobianos sem efeito ao tratamento, visto que, essa classe é uma das mais utilizadas para o tratamento de ITU, o que pode levar ao agravamento do estado do paciente. Por isso, é de suma importância a realização de cultura com antibiograma de pacientes veterinários.

Ainda sobre esse contexto, o uso indiscriminado de antimicrobianos é um dos principais fatores que levam ao desenvolvimento dessas cepas, devido a uma pressão seletiva sobre os microrganismos. Sendo assim, o uso racional de antibióticos visa minimizar o surgimento de novas cepas ESBL ou de outros mecanismos que possam inclusive acarretar em superbactérias resistentes a fármacos de última escolha.

Nesse estudo, uma das cepas isoladas apresentou sensibilidade somente a fármacos da última linha de tratamento, sendo estes Nitrofurantoína e Meropenem. Dependendo do estado clínico do animal a única escolha de tratamento seria com carbapenêmicos, sendo esta uma classe de antibióticos restrita, utilizado em tratamentos humanos, contudo, há relatos de cepas com mecanismos de resistência a esses fármacos, tornando o tratamento laborioso.

Tabela 3: Perfil de sensibilidade dos isolados ESBL positivos

Antimicrobiano	Perfil de sensibilidade	
	Sensível	Resistente
Amoxicilina com ácido clavulânico (30 µg)	0	4
Ceftriaxona (30 µg)	0	4
Cefotaxima (30 µg)	0	4
Cefepime (30 µg)	0	4
Cotrimoxazol (25 µg)	1	3
Meropenem (10 µg)	4	0
Ceftazidima (30 µg)	0	4
Tetraciclina (30 µg)	1	3
Enrofloxacina (5 µg)	0	4
Gentamicina (10 µg)	2	2
Aztreonam (30 µg)	0	4
Nitrofurantoína (300 µg)	3	1
Cloranfenicol (30 µg)	1	3
Ciprofloxacina (5 µg)	0	4
Cefalexina (30 µg)	0	4

Dessa forma, o monitoramento da presença desses microrganismos é de suma importância para o controle e disseminação dessas cepas entre animais e humanos, visto que pode ocorrer uma transmissão cruzada dessas cepas, ocasionando problemas tanto em animais como em humanos principalmente imunossuprimidos.

Conclusão

Com o presente trabalho, conclui-se que há a presença de cepas ESBL positivas ocasionando infecção do trato urinário em pacientes veterinários atendidos do HOVET-UFRPE e por ser um mecanismo de resistência de fácil observação o microbiologista veterinário deve estar sempre atento a possíveis cepas produtoras de β -lactamases de espectro estendido, evitando a emissão de laudos equivocados.

Estirpes de *E. coli* que apresentam perfil de multirresistência e/ou produção de ESBL oferecem elevado risco à saúde pública, pela possibilidade de disseminação destas, que podem dificultar a terapêutica das enfermidades humanas e/ou animais.

Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Modulo 2 Gram negativos fermentadores.** Disponível em: <https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlere/rede_rm/cursos/boas_praticas/MODULO2/resistencia7.htm>. Acesso em: 13 fev. 2022.

ANVISA, A. N. DE V. S. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde.** 1. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004. v. 1

ARIANE MARTINS FERNANDES; VALÉRIA REGIA FRANCO SOUSA. **INFECÇÃO URINÁRIA EM CÃES DOENTES RENAI: ETIOLOGIA E RESISTÊNCIA.** Cuiabá: Trabalho de conclusão de curso, 2017.

BAHR ARIAS, M. M. et al. Estudo da ocorrência de infecção hospitalar em cães e gatos em um centro cirúrgico veterinário universitário. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 33, n. 6, 2013.

BRAZILIAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING - BRCAST. **Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos**, 2021. Disponível em: <http://www.brcast.org.br>

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Development of In Vitro Susceptibility Testing Criteria and Quality Control Parameters.** CLSI guideline M23. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals.** CLSI supplement VET01S, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2020.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing** CLSI supplement M100, Wayne, PA, 2021.

COMITÊ BRASILEIRO DE TESTES DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (BRCAS). **Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica**, 2018.

COSTA, M. M. DA et al. Patotipos De *Escherichia coli* Na Suinocultura E Suas Implicações. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 76, p. 509–516, 2009.

DOS SANTOS, J. I.; COELHO, M. P. P.; NAPPI, B. P. Diagnóstico laboratorial das dermatofitoses. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 34, n. 1, p. 3–6, 2002.

FÁVERO, A. F. et al. Evolução da genética do “ porco tipo banha” ao suíno light. In: **Sonho, Desafio e Tecnologia - 35 Anos de Contribuições da Embrapa Suínos e Aves**. 1. ed. concórdia: Embrapa suínos e aves, 2011. p. 470.

GARY, W. P. et al. **Diagnóstico microbiológico - texto e atlas**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

LAGO, A.; FUENTEFRIA, S. R.; FUENTEFRIA, D. B. Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 430–434, 2010.

MAGIORAKOS, A. P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 2012.

MOSQUITO, S. et al. **Mecanismos moleculares de resistencia antibiótica en *Escherichia coli* asociadas a diarrea**. *Revista peruana de medicina experimental y salud pública*, 2011.

PEREIRA, M. L.; AGUIAR, M. H. S.; NERCOLINI, N. A. M. Infecção de trato urinário inferior por *Citrobacter* sp em cadela com hipoadrenocorticismo. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 27, n. 2, 2020.

SATO, J. P. H. et al. Associação entre fatores de virulência e resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* enterotoxigênicas isoladas de leitões com diarreia no Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 43, n. 1329, p. 7p, 2015.

SCHNEIDER, R. N.; NADVORNY, A.; SCHMIDT, V. Perfil de resistência antimicrobiana de isolados de *Escherichia coli* obtidos de águas superficiais e subterrâneas, em área de produção de suínos. **Revista Biotemas**, v. 22, n. 3, p. 11–17, 2009.

SILVA, C. V. O. et al. *Escherichia coli* na suinocultura. Aspectos clínicos. Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 9, p. 288–293, 2015.

VERDI, C. M. et al. Detecção Laboratorial Dos Mecanismos De Resistência Da *Klebsiella Pneumoniae*: Uma Revisão. **Revista Saúde Integrada**, v. 17, n. 9, p. 16–27, 2016.