



UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO DO RISCO DE ENTEROBACTERIAES
PRODUTORAS DE ESBLs/pAmpC FECALIS PARA O
DESENVOLVIMENTO DE INFECÇÃO DO LOCAL
CIRÚRGICO EM ANIMAIS DE COMPANHIA
SUBMETIDOS A CIRURGIA ORTOPÉDICA LIMPA**

Dissertação de Mestrado apresentada a provas públicas para a obtenção do grau de mestre em Medicina Veterinária, orientada por Professor Doutor João Manuel Cardoso Martins e Professora Doutora Adriana de Jesus Inácio Belas

Inês dos Santos Chambino, nº 21703748

2024

www.ulusofona.pt



UNIVERSIDADE
LUSÓFONA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**AVALIAÇÃO DO RISCO DE ENTEROBACTERIAES
PRODUTORAS DE ESBLs/pAmpC FECALIS PARA O
DESENVOLVIMENTO DE INFECÇÃO DO LOCAL
CIRÚRGICO EM ANIMAIS DE COMPANHIA
SUBMETIDOS A CIRURGIA ORTOPÉDICA LIMPA**

VERSÃO FINAL

Dissertação de Mestrado defendida em provas públicas na
Universidade Lusófona, Centro Universitário de Lisboa, no dia
17/12/2024 perante o júri, nomeado pelo Despacho de Nomeação
n.º: 1076 /2024, de Dezembro de 2024, com a seguinte composição:

Presidente: Prof. Doutora Cátia Marques

Arguente: Prof. Doutora Liege Martins (Universidade
Lusófona Centro Universitário de Lisboa)

Orientador: Prof. Doutor João Martins

Este trabalho também foi orientado por Professora Doutora
Adriana Belas

Inês dos Santos Chambino, nº 21703748

2024

www.ulusofona.pt

Agradecimentos

À Universidade Lusófona, expresso o meu mais sincero agradecimento pela oportunidade de realizar este mestrado. A instituição foi, sem dúvida, fundamental para o meu crescimento académico e pessoal, proporcionando-me um ambiente de excelência que estimulou o meu desenvolvimento intelectual e científico.

Ao meu orientador, Professor Doutor João Martins, dirijo os meus mais profundos e sinceros agradecimentos. A sua orientação e apoio constantes foram cruciais para a concretização desta dissertação. A sua paciência e disponibilidade foram indispensáveis em cada etapa do processo. Sempre disposto a oferecer conselhos e a guiar-me. A sua dedicação ao meu progresso proporcionaram-me a motivação necessária para ultrapassar os obstáculos e alcançar os objetivos traçados. Mais do que um orientador, foi um mentor, e por isso deixo o meu sincero agradecimento por todo o apoio, conhecimento transmitido e por acreditar no meu potencial.

À minha co-orientadora, Professora Doutora Adriana Belas, expresso um agradecimento muito especial. Não foram apenas as horas dedicadas ao laboratório ou as discussões científicas que marcaram este percurso, mas também o laço de amizade e confiança que se formou entre nós. Partilhamos momentos de trabalho árduo, mas também muitas conversas e confidências que tornaram esta fase tão especial. A sua disponibilidade e sentido de humor tornaram os desafios mais fáceis de enfrentar. Por tudo isso deixo o meu mais sincero agradecimento.

À minha mãe, as palavras nunca serão suficientes para expressar toda a gratidão que sinto. Durante esta etapa, foste o meu porto seguro, a fonte inesgotável de carinho e paciência. Em cada momento de dúvida e cansaço encontrava em ti o conforto e as palavras para continuar. Nos dias mais difíceis, foste quem me ouviu e me lembrou que eu era capaz de alcançar os meus sonhos. És a minha maior inspiração. Obrigada mãe, por todo o sacrifício e por acreditares em mim quando eu mesma duvidei.

Ao meu irmão, agradeço por seres sempre o ponto de referência na minha vida. Obrigada por estares sempre presente.

Ao meu pai, pelos ensinamentos que me transmitiste ao longo da vida. A força e a resiliência ajudaram-me a ultrapassar os desafios desta jornada.

À minha querida avó, que já não se encontra entre nós, dedico este trabalho com todo o amor e saudade. O teu carinho e sabedoria continuam a guiar-me todos os dias. Este trabalho é, em parte, também teu.

Resumo

A infecção do local cirúrgico (ILC) é uma complicação cirúrgica grave que afeta o sucesso cirúrgico, a saúde e o bem-estar do paciente.

As β -lactamases de largo espectro (ESBLs) e AmpC mediadas por plasmídeo (*pAmpC*) representam uma ameaça à saúde animal, humana e ambiental sendo consideradas um risco para a saúde pública.

O objetivo deste estudo foi identificar a presença de Enterobacterales produtoras de ESBLs/*pAmpC* em amostras fecais de animais de companhia submetidos a cirurgia ortopédica limpa e perceber se representam um fator de risco para o desenvolvimento de ILC.

Desde fevereiro a junho de 2023, foram recolhidas 64 zangaratoas fecais de animais de companhia (cães e gatos) submetidos a cirurgia ortopédica limpa em três hospitais veterinários da região de Lisboa.

As amostras foram inoculadas em Macconkey agar suplementadas com 1,5 $\mu\text{g/mL}$ de cefotaxima e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de meropenem. As espécies de bactérias e genes de resistência foram identificadas através da reação em cadeia de polimerase (PCR). O teste de suscetibilidade de antimicrobianos foi realizado e interpretado segundo as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

Neste estudo 20,3% (13/64) dos animais de companhia encontravam-se colonizados com Enterobacterales produtoras de ESBLs e/ou *pAmpC*. Cerca de 84,6% (11/13) foram identificados como *Escherichia coli*. Os isolados de *E. coli* resistentes a cefalosporinas de terceira geração (C3G) pertenceram predominantemente ao grupo filogenético B₁ (54,5%, 6/11) e 18,2% (2/11) foram também resistentes ao grupo dos carbapenemos.

As Enterobacterales isoladas além da resistência ao grupo dos β -lactâmicos apresentaram resistências a outras classes de antibióticos, conferindo um perfil multirresistente (MDR) em 46,1% (6/13) dos casos. Os genes mais prevalentes foram o *bla*_{TEM-1} e *bla*_{CTX-M-15}. Para além do referido foi identificado o gene *bla*_{OXA-244tipo} em dois isolados de *E. coli*.

Nenhum dos animais que participaram neste estudo evidenciou sinais compatíveis com ILC. Apesar dos resultados negativos, este estudo demonstra a importância dos animais de companhia como reservatórios para a disseminação de estirpes de bactérias resistentes ou multirresistentes para outros animais, humanos ou ambiente, constituindo uma ameaça para a biossegurança e saúde pública.

Palavras-chave: Infecção do local cirúrgico, cirurgia ortopédica limpa, ESBLs/*pAmpC*, biossegurança, animais de companhia.

Abstract

Surgical site infection (SSI) represents a serious surgery complication that can affect the surgery outcome, patient's overall health, and well-being.

Extended Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs) and plasmid mediated AmpC (pAmpC) represent a serious threat to animal, human and environmental health and thus public health.

This study aimed to characterize the presence of ESBL/pAmpC producing Enterobacterales in fecal samples of companion animals undergoing clean orthopedics procedures and understand if it represents a risk factor for developing SSI.

From February until June 2023, 64 fecal swabs from companion animals (dogs and cats) undergoing surgery were collected from three different Veterinary Hospitals in Lisbon.

The samples were inoculated on MacConkey agar plates supplemented with 1.5 µg/mL cefotaxime and 1.0 µg/mL meropenem. Bacterial species and the presence of β-lactamase genes were confirmed by PCR. Antimicrobial susceptibility testing and interpretation were performed using the disk diffusion method according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines.

In this study, 20.3% (13/64) of the companion animals were colonized with ESBL/pAmpC-producing Enterobacterales. About 84.6% (11/13) were identified as *Escherichia coli*. Moreover, *E. coli* isolates belonged mainly to the B1 phylogenetic group (54.5%, 6/11). Third generation cephalosporin (C3G) -resistant *E. coli* were also resistant to carbapenems in 18.2% (2/11).

Furthermore, Enterobacterales strains also showed resistance to other classes of antibiotics: overall 46.1% (6/13) of the cases were multidrug resistant (MDR). The genes *bla*_{TEM-1} and *bla*_{CTX-M-15} were the most prevalent. Also, the gene *bla*_{OXA-244} was isolated in two cases.

Neither of the patients in this study showed compatible signs with SSI, however, this study highlights the importance of companion animals as reservoirs and transmission of resistant nor MDR bacterial strands to other animals, humans, and environment, acting as a threat to biosecurity and public health

Keywords: Surgical site infection, clean orthopedic surgery, ESBLs/pAmpC, biosecurity, companion animals

Abreviaturas, Siglas e Símbolos

- AK – Amicacina
- AMC – Amoxicilina/ ácido clavulânico
- AMP – Ampicilina
- ASA – Sociedade Americana de Anestesiologia, do inglês “American Society of Anesthesiologists”
- BHIB – *Brain-Heart-Broth*
- C – Cloranfenicol
- C3G – Cefalosporina de terceira geração
- C4G – Cefalosporina de quarta geração
- CAMV – Centro de Atendimento Médico-Veterinário
- CAZ – Ceftazidima
- CDC – Centro de Doença Prevenção e Controle
- CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*
- CMI – Concentração mínima inibitória
- CN – Gentamicina
- COL – Cirurgia ortopédica limpa
- CTX – Cefotaxima
- DD – Difusão de disco
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico, do inglês “Deoxyribonucleic acid”
- E. cloacae* – *Enterobacter cloacae*
- E. coli* – *Escherichia coli*
- EGMs – Elementos genéticos móveis
- ENR – Enrofloxacina
- EPC – Enterobacterales produtoras de carbapenemases
- ERT – Ertapenemo
- ESBLs – β -lactamases de largo espectro, do inglês “Extended Spectrum β -lactamases”
- EUCAST – Comité Europeu de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana, do inglês “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing”
- F – Nitrofurantoína
- FEP – Cefepime
- FOS – Fosfomicina
- FOX – Cefoxitina

ILC – Infecção do local cirúrgico
IMP – Imipenemo
ITU – Infecção do trato urinário
K. pneumoniae – *Klebsiella pneumoniae*
LEV – Levofloxacina
MALDI-TOF - *Matrix-assisted laser desorption/ionization*
McK – Macconkey Agar
MDR – Multirresistente, do inglês “Multidrug resistance”
MEM – Meropenemo
MLST – *Multilocus sequencing typing*
MRSA – *Staphylococcus metilina* resistente
NA – Ácido Nalidíxico
OI – Oligonucleótidos iniciadores
OMS – Organização Mundial de Saúde
pAmpC – AmpC mediadas por plasmídeo
PCR – Reação em cadeia da polimerase, do inglês “polymerase chain reaction”
RAM – Resistência a antibióticos
S. aureus – *Staphylococcus aureus*
SXT – Trimetropim/sulfametoxazole
TE – Tetraciclina
THR – Prótese total de anca, do inglês “Total Hip Replacement”
TPLO - Osteotomia de nivelamento do plateau tibial, do inglês “Tibial Plateau Leveling Osteotomy”
TSA – Teste de sensibilidade a antibióticos
WGS – Sequenciação Total do Genoma, do inglês “Whole Genome Sequencing”

Índice

1. Casuística de estágio	10
2. Introdução.....	13
2.1. Enterobacterales.....	13
2.1.1. <i>Escherichia coli</i>	14
2.1.1.1. Classificação filogenética.....	14
2.2 Resistência a antibióticos.....	15
2.2.1. Mecanismos de resistência aos antibióticos.....	16
2.2.1.1. β -Lactamases de largo espectro.....	17
2.2.1.1.1. CTX-M, TEM, SHV e OXA.....	19
2.2.1.2. Cefalosporinas do tipo AmpC mediadas por plasmídeos	20
2.2.1.3. Carbapenemases	21
2.3. Métodos de detecção de ESBLs e <i>pAmpC</i>	22
2.3.1. Detecção fenotípica.....	22
2.3.2. Detecção molecular.....	23
2.4. Prevalência de ESBL/ <i>pAmpC</i> na Europa	23
2.5. Antibióticos em cirurgia ortopédica limpa	25
2.5.1. Infecção do local cirúrgico	25
2.5.1.1. Fatores de risco.....	27
2.5.1.1.1. Fatores pré-cirúrgicos	27
2.5.1.1.2. Fatores cirúrgicos.....	29
2.5.1.1.3. Fatores pós-cirúrgicos.....	33
2.5.2. Profilaxia com antibióticos	33
2.5.2.1. Tipo de antibiótico.....	34
2.5.2.2. Dose e tempo de administração.....	34
2.5.2.3. Duração da profilaxia com antibióticos.....	35
2.5.2.4. Recomendações e estratégias.....	36

3. Material e Métodos.....	38
3.1. Delineamento experimental	38
3.2. Processamento laboratorial das amostras	39
3.2.1. Identificação de Enterobacterales resistentes às C3G e carbapenemos ..	39
3.2.1.1. <i>E. coli</i> e respectivos grupos filogenéticos	40
3.2.1.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	41
3.2.1.3. Identificação de <i>Enterobacter cloacae</i>	42
3.2.2. Teste de sensibilidade a antibióticos	42
3.2.3. Identificação de genes de resistência aos β -lactâmicos	43
3.2.3.1. Detecção do gene <i>bla</i> _{CTX-M}	43
3.2.3.2. Detecção dos genes <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} e <i>bla</i> _{OXA-1}	44
3.2.3.3. Detecção dos genes <i>bla</i> _{DHA} , <i>bla</i> _{MOX} , <i>bla</i> _{CIT} , <i>bla</i> _{ACC} , <i>bla</i> _{FOX} , <i>bla</i> _{EBC} e <i>bla</i> _{CMY}	44
3.2.3.4. Detecção dos genes <i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{NDM} , <i>bla</i> _{OXA-48} , <i>bla</i> _{BIC}	45
3.2.3.5. Purificação dos produtos amplificados e Sequenciação	46
3.3. Análise estatística	46
4. Resultados	47
5. Discussão.....	53
6. Conclusão	59
7. Referências Bibliográficas	60
8. Anexos.....	I

Índice de tabelas

Tabela 1 – OI utilizados para a identificação dos grupos filogenéticos de <i>E. coli</i>	40
Tabela 2 – OI utilizados para a identificação de <i>K. pneumoniae</i>	41
Tabela 3 – OI utilizados para a identificação do gene <i>bla</i> _{CTX-M}	43
Tabela 4 – OI utilizados para a identificação do gene <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} e <i>bla</i> _{OXA-1}	44
Tabela 5 – OI utilizados para a identificação dos genes através de PCR multiplex .	45
Tabela 6 – OI utilizados para a identificação do gene <i>bla</i> _{CMY-2}	45
Tabela 7 – OI utilizados para a identificação dos genes codificadores de carbapenemases	46
Tabela 8 – Caracterização da amostra quanto à espécie, raça, origem e sexo.	47
Tabela 9 – Fatores de risco estudados	48
Tabela 10 – Perfil de resistência dos isolados clínicos identificados como <i>E. coli</i> às várias classes de antibióticos utilizados.....	50
Tabela 11 – Caracterização das amostras quanto à espécie de bactéria, grupo filogenético, determinantes e perfil de resistência.....	52

Índice de figuras

Figura 1 – Representação gráfica dos animais observados em percentagem.....	11
Figura 2 – Representação gráfica da distribuição em percentagem das principais áreas clínicas e cirúrgicas.	11
Figura 3 – Representação gráfica da distribuição em percentagem dos casos observados por classe animal.	12
Figura 4 – Representação gráfica da distribuição de casos em percentagem por área clínica.	12
Figura 5 – Distribuição dos discos de antibiótico pelas placas Mueller-Hinton Agar para realização de teste de sensibilidade a antibióticos pelo método de DD.	42
Figura 6 – Representação gráfica da frequência e identificação de Enterobacterales produtores de ESBLs/pAmpC em cães e gatos.	49
Figura 7 – Perfil de resistência dos isolados clínicos às várias classes de antibióticos estudados	50
Figura 8 – Representação gráfica da distribuição dos genes identificados por espécie de bactéria em percentagem.	51

1. Casuística de estágio

A autora de forma a complementar a sua área de estudos optou por dividir o seu período de estágio em três fases, numa primeira fase o estágio curricular foi realizado no Hospital Veterinário GHVS durante os meses de setembro de 2022 a janeiro de 2023, numa segunda fase, a autora encontrou-se na Clínica Veterinária Vetexóticos nos meses de fevereiro e março de 2023, e numa última fase, a autora realizou estágio no Laboratório de Microbiologia Clínica do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa durante abril de 2023 a setembro de 2023. Desta forma, a autora realizou no total, aproximadamente 1616 horas de estágio.

O Hospital Veterinário GHVS situado em Almada, apresenta serviço médico-veterinário 24 horas por dia. Oferece serviços em diversas especialidades médicas, nomeadamente: cardiologia, endocrinologia, neurologia e neurocirurgia, dermatologia, cirurgia tecidos moles, oftalmologia e cirurgia oftalmológica, ortopedia e traumatologia, meios avançados de diagnóstico de imagem (endoscopia e tomografia computadorizada). Apresenta também um centro de fisioterapia e reabilitação animal, e ainda, um local designado para banhos e tosquiadas.

Durante o período de estágio no Hospital Veterinário GHVS (784h), a autora, teve a oportunidade de assistir a consultas (533 horas), participar em diversas cirurgias (65 horas) e a desempenhar diversas tarefas no internamento dos animais hospitalizados (162 horas). As restantes 24h foram dedicadas a momentos de estudo e elaboração de trabalhos escritos e respetivas apresentações sobre diversos temas solicitados pela orientadora externa.

Durante o período de tempo que permaneceu no local de estágio, a autora observou um total de 347 animais. Entre os quais aproximadamente 64,8% (225/347) eram cães e 35,2% (122/347) eram gatos (Figura 1).

A figura 2 representa a distribuição dos casos observados em percentagem pelas diversas áreas.

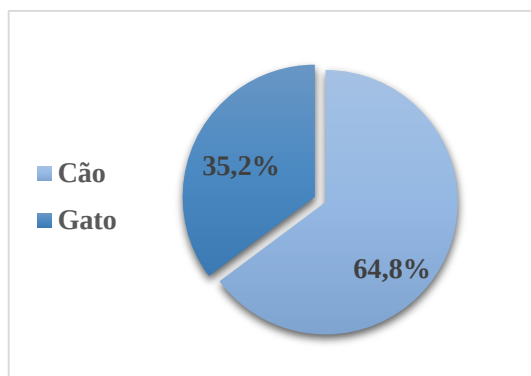


Figura 1 – Representação gráfica dos animais observados em percentagem.

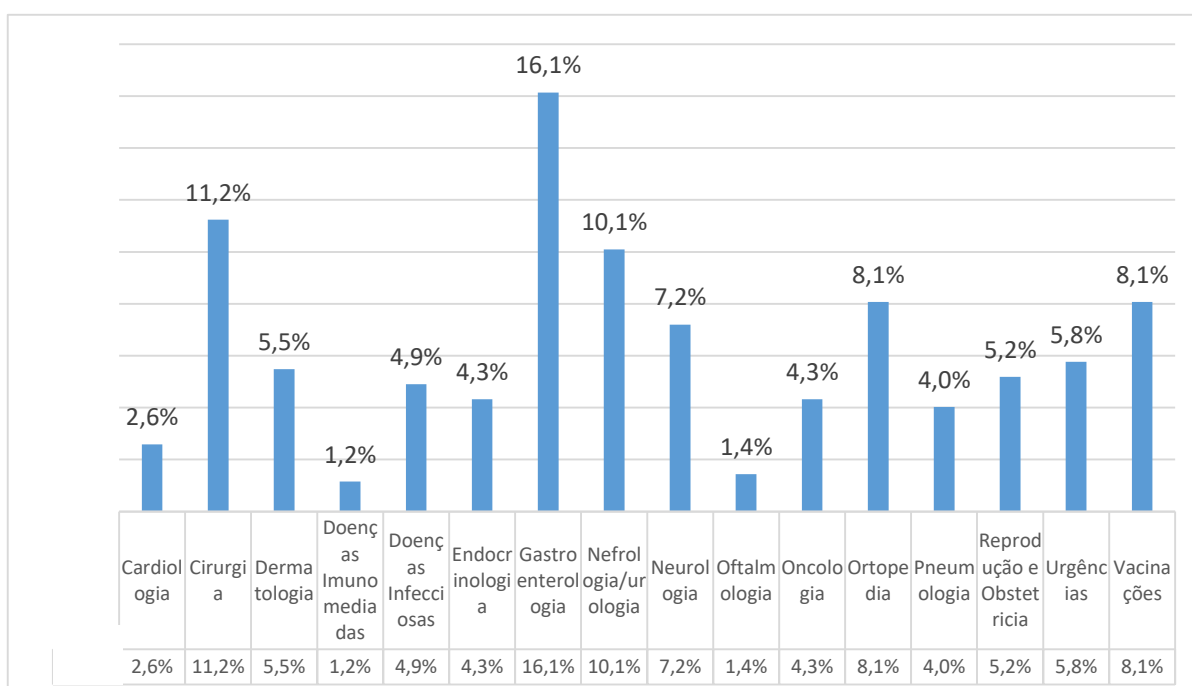


Figura 2 – Representação gráfica da distribuição em percentagem das principais áreas clínicas e cirúrgicas.

A Clínica Veterinária de animais exóticos - Vetexóticos situada em Almada, dedica-se exclusivamente ao atendimento de animais exóticos (pequenos mamíferos, répteis, aves, anfíbios e peixes).

Durante o período de estágio a autora assistiu e participou em consultas, cirurgias e realizou diversos exames radiográficos perfazendo um total de 304 horas. A figura 3 representa, em percentagem, os casos observados por classe animal. A figura 4 demonstra a distribuição dos diversos casos observados por área clínica e classe animal.

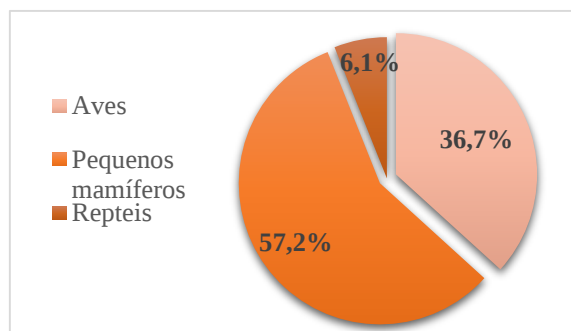


Figura 3 – Representação gráfica da distribuição em percentagem dos casos observados por classe animal.

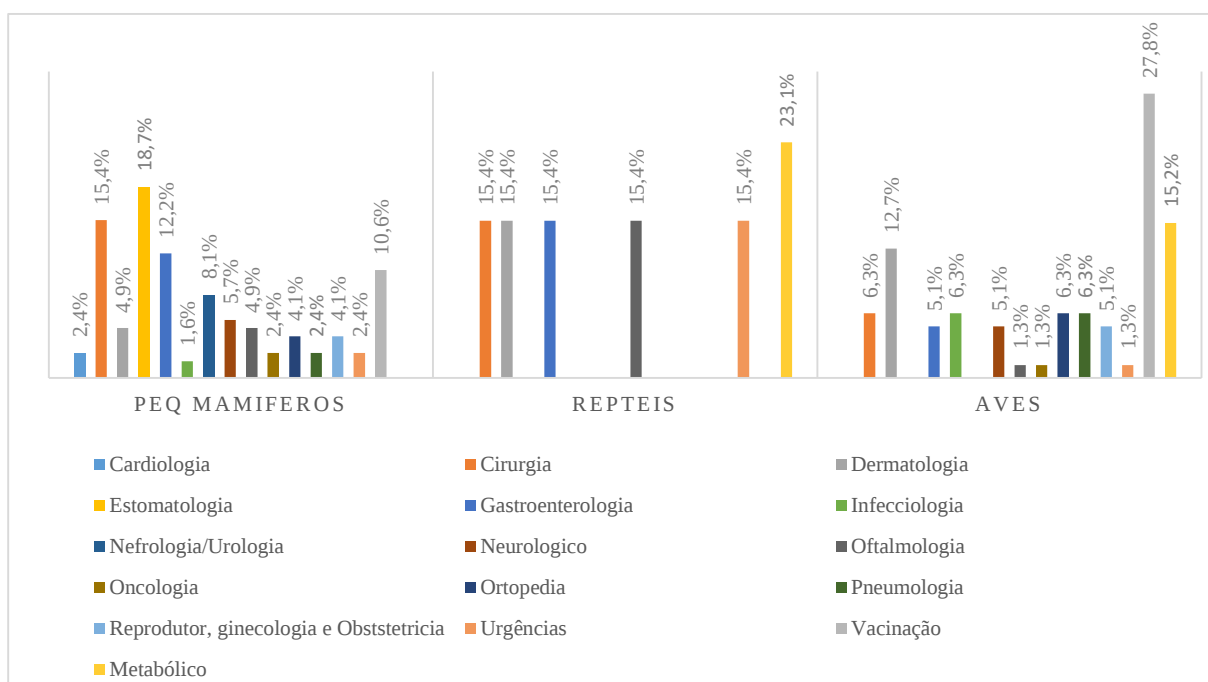


Figura 4 – Representação gráfica da distribuição de casos em percentagem por área clínica.

O Laboratório de Microbiologia Clínica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Lusófona – Centro Universitário de Lisboa apoia o Hospital Veterinário da Universidade, sendo realizadas diversas análises, tais como: culturas bacterianas, teste de sensibilidade a antibióticos (TSA) e testes de biologia molecular. Este estágio permitiu à autora aprender as principais técnicas laboratoriais para isolamento e identificação de bactérias, os meios de cultura mais comumente utilizados e técnicas de biologia molecular como reação em cadeia da polimerase, do inglês “polymerase chain reaction” (PCR) para a amplificação de genes de interesse para o desenvolvimento da presente dissertação de mestrado. A autora permaneceu durante o estágio no Laboratório, aproximadamente 528 horas.

2. Introdução

O desenvolvimento de infecção do local cirúrgico (ILC) é uma comorbidade grave e catastrófica para o sucesso de cirurgia ortopédica limpa (COL): contribui para o aumento da morbidade e compromete a saúde e bem-estar animal (Gonzalez, Renberg, Roush, KuKanich & Warner, 2017). Atualmente existem diversos fatores de risco identificados que podem desencadear o aparecimento de ILC (Gehlen, Klein, Merle, Lübke-Becker & Stoeckle, 2023; Lyssens, Devriendt, Stock, Roggeman & Rooster, 2019; Pratesi, Moores, Downes, Grierson & Maddox, 2015). Um destes fatores é a colonização prévia com microrganismos resistentes (Välkki *et al.*, 2020), como Enterobacterales produtoras de β -lactamases de largo espectro, do inglês “Extended Spectrum β -lactamases (ESBLs). A ocorrência cada vez mais prevalente deste tipo de microrganismos em animais de companhia na Europa (Menezes *et al.*, 2023; Werhahn Beining *et al.*, 2023) e em Portugal (Belas *et al.*, 2022) constitui uma ameaça grave não só para a saúde animal, como também humana e ambiental, ou seja, para a saúde pública.

Apesar dos diversos estudos existentes sobre a incidência de ILC em animais de companhia submetidos a COL e outros estudos independentes sobre a prevalência de ESBLs em animais saudáveis e doentes, não é do conhecimento da autora a existência de estudos que estabeleçam uma correlação direta entre a colonização prévia com ESBLs e o risco de desenvolvimento de ILC em animais de companhia. Por este motivo a presente dissertação procurou investigar esta relação de forma a melhorar o conhecimento sobre esta temática.

2.1. Enterobacterales

Os microrganismos que integram a ordem Enterobacterales são ubiqüitários, apresentam uma distribuição geográfica bastante ampla e encontram-se disseminados pelos diferentes ecossistemas ocupando nichos ecológicos bastante diversificados (Janda & Abbott, 2021), tais como: o solo, águas residuais, insetos e vegetação e o trato gastrointestinal de animais e humanos (anexo A: figura A1).

A ordem Enterobacterales é constituída por diversas espécies de bactérias (140) (Moxley, 2022), comumente isoladas no setor da saúde, nomeadamente a *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. (Van Duin & Doi, 2017). No caso dos animais vertebrados, estes apresentam uma associação íntima com alguns géneros desta ordem: normalmente são encontradas no trato gastrointestinal de humanos e animais, estabelecendo associações do tipo comensal ou, ocasionalmente patogénicas (Mairi, Pantel, Sotto, Lavigne, & Touati, 2018).

Da perspectiva da resistência a antibióticos (RAM) as Enterobacterales são especialmente importantes, pois são uma causa comum de infecções nosocomiais e em comunidade (Van Duin & Doi, 2017). Desta forma, podem estar associados a diversas doenças em humanos, animais e plantas (Alnajjar & Gupta, 2017). Segundo Janda & Abbott (2021), é considerada a ordem com maior impacto na saúde humana e veterinária, estando associada a uma grande variedade de síndromes clínicas, doenças de origem alimentar e zoonoses.

2.1.1. *Escherichia coli*

E. coli é um bacilo Gram-negativo e anaeróbio facultativo (Tudu *et al.*, 2022). É um membro da ordem Enterobacterales e família das *Enterobacteriaceae* presente naturalmente no trato gastrointestinal de humanos e animais (Urban-Chmiel *et al.*, 2022). As estirpes comensais, presentes no trato gastrointestinal dos mamíferos (habitat primário) são também identificadas noutros nichos ecológicos, como por exemplo, águas residuais e solo (habitat secundário). Pelo que a sua distribuição geográfica é bastante ampla (Lagerstrom & Hadly, 2023).

2.1.1.1. Classificação filogenética

E. coli engloba um grupo de estirpes genomicamente coerente que partilham um grau de semelhança bastante elevado em diversas características (Jianhe, Bolin, Yanzhao & Yawei, 2020). No entanto, simultaneamente é uma espécie bacteriana bastante versátil, sendo que o seu genoma apresenta uma plasticidade considerável, isto é, apesar das semelhanças, existem diferenças fenotípicas, diversos nichos ecológicos ocupados, capacidade de provocar doença (patogénicas) ou não (comensais) e a probabilidade de transportar genes de RAM (Lagerstrom & Hadly, 2023), o que por sua vez possibilita a evolução e adaptação rápida ao meio em que se encontram. Estas diferentes características realçam a importância do desenvolvimento de um método simples que permita agrupar as várias estirpes de *E. coli* num determinado grupo com base em critérios específicos de modo a estabelecer relações filogenéticas entre si (Clermont, Christenson, Denamur & Gordon, 2013). Através do PCR ou por técnicas mais sofisticadas e precisas como a *Multilocus sequence typing* (MLST) foi possível organizar as estirpes de *E. coli* em oito grupos filogenéticos (A, B₁, B₂, C, D, E, F e G). Segundo Touchon *et al.* (2020), os filogrupos A, B₁, B₂ e D representam a maioria das estirpes identificadas atualmente.

De acordo com Lagerstrom & Hadly (2023), parece existir uma relação entre o grupo filogenético e o hospedeiro: os filogrupos A, B₂ e D são frequentemente isolados em humanos enquanto o grupo filogenético B₁ é mais frequente em animais. Contudo, alguns estudos (anexo

B: tabela B1) demonstraram estirpes de *E. coli* pertencentes aos diferentes filogrupos em animais e, ainda, presença de estirpes comuns em animais e humanos realçando a partilha de um fundo de genes comum (Clermont *et al.*, 2011).

As estirpes patogénicas pertencem, na sua maioria, aos grupos B₂ ou D, em contrapartida, as estirpes pertencentes aos grupos filogenéticos A e B₁ representam, sobretudo, estirpes comensais (Clermont *et al.*, 2013; Nojoomi & Ghasemian, 2019).

As estirpes apresentam diferenças fenotípicas e genotípicas entre grupos filogenéticos distintos, mas também dentro do mesmo grupo. Sendo que a sua prevalência depende de diversos fatores como: sexo, espécie, dieta, idade do hospedeiro, clima e localização geográfica (Touchon *et al.*, 2020).

2.2 Resistência a antibióticos

A RAM representa a capacidade de um determinado microrganismo sobreviver ou reproduzir-se na presença de um antibiótico que anteriormente o eliminaria e/ou inibiria o seu crescimento e multiplicação. Representa um fenómeno que tem vindo a aumentar a sua incidência a nível mundial, sobretudo devido à utilização excessiva e descontrolada de antibióticos para fins terapêuticos e profiláticos em humanos e animais (Pomba *et al.*, 2017), para o controlo de condições de saneamento, esgotos e urbanização. O uso excessivo e impróprio de antibióticos em medicina humana, medicina veterinária, agricultura e aquacultura promove a libertação de resíduos antibióticos para o ambiente, contribuindo para o aparecimento, disseminação rápida e descontrolada de resistências (Caliskan-Aydogan & Alocilja, 2023). A excreção continuada de resíduos de antibióticos para o meio ambiente é um fator importante a considerar, pois provoca uma pressão seletiva sobre as bactérias tornando-se reservatório de estirpes que contêm genes de resistência (Mairi *et al.*, 2018) e que por sua vez, promovem a sua disseminação para os restantes ecossistemas (anexo C: figura C1). Estes microrganismos e os seus genes podem ser transmitidos de animais para humanos e vice-versa de forma bastante rápida (Pomba *et al.*, 2017). A transmissão ocorre pelo contacto direto como saliva, urina, fezes de humanos e animais ou consumo de alimentos e água contaminados. Pelo que a transmissão entre humanos e animais pode ocorrer facilmente através da cadeia alimentar, contacto com animais de produção, companhia e/ ou ambiente (Werhahn Beining *et al.*, 2023). As interações próximas entre animais de companhia e humanos aumentam o risco da transmissão de resistências a determinados grupos de antibióticos pelo contacto direto através

das condições domésticas como a alimentação, higiene e a partilha de afeto, facilitando a transmissão destas estirpes bacterianas e os seus genes de resistência (Tudu *et al.*, 2022).

Médicos veterinários, técnicos de explorações animais e matadouros podem aumentar a exposição entre humanos e animais e por conseguinte aumentar a probabilidade de disseminação de bactérias resistentes (Riwu, Effendi & Rantam, 2020). Desta forma, a interação humano-animais-ambiente possibilita, simultaneamente, a partilha de genes entre estirpes bacterianas provenientes de nichos ecológicos distintos resultando no aparecimento e dispersão de novas resistências.

O aparecimento de bactérias com RAM é uma das ameaças iminentes à saúde (Van Duin & Doi, 2017) e representam um desafio ao sucesso terapêutico uma vez que este tipo de microrganismos diminui as opções terapêuticas disponíveis provocando assim, inevitavelmente, o aumento dos tempos de hospitalização, associadas igualmente a custos superiores, estando, por isso, intimamente ligadas ao aumento da morbilidade e mortalidade dos pacientes (Caliskan-Aydogan & Alocilja, 2023; Riwu *et al.*, 2020). A capacidade de transmissão e partilha de determinantes de resistência constitui uma ameaça ao conceito de Uma Só Saúde, isto é, a saúde dos humanos está interligada à saúde animal e ambiental. A sua crescente e acelerada dispersão tornou-se endémica em ambientes hospitalares (infecções nosocomiais) e em comunidade (Riwu *et al.*, 2020). A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece a emergência de RAM como um problema para a saúde humana, animal e ambiental e desde 2019 que declara que a RAM representa o grupo das dez maiores ameaças à Saúde Pública.

2.2.1. Mecanismos de resistência aos antibióticos

As Enterobacterales apresentam múltiplas estratégias para ultrapassar os efeitos dos antibióticos (Mairi *et al.*, 2018; Sawa, Kooguchi, & Moriyama, 2020), nomeadamente: alterações na permeabilidade da membrana através da expressão de bombas de efluxo e/ou diminuição da produção de porinas; redução da afinidade do antibiótico por alteração das regiões alvo; inativação do princípio ativo pela produção de enzimas β -lactamases.

A presença de um destes mecanismos de resistência ou a sua associação dificulta o sucesso terapêutico tanto em ambiente hospitalar como em comunidade (Gupta, Tak, & Mathur, 2014).

A eficácia dos antibióticos β -lactâmicos tem vindo a ser desafiada pela produção de enzimas denominadas β -lactamases. Estas enzimas apresentam a capacidade de hidrolisar este

grupo de antibióticos (Bajaj, Singh & Viridi, 2016). De facto, segundo Bush & Jacoby (2010) a hidrólise de β -lactâmicos por β -lactamases é o mecanismo de resistência mais comum sendo clinicamente importante para as Enterobacterales. A perda de suscetibilidade a antibióticos β -lactâmicos é atribuída essencialmente à produção de ESBLs, β -lactamases AmpC mediadas por plasmídeo (*pAmpC*) e carbapenemases. Encontram-se distribuídas mundialmente em humanos, animais e no ambiente (Bogaerts *et al.*, 2015). Existe uma ampla distribuição de infecções bacterianas que são resistentes a diversos antibióticos devido à expressão destas enzimas (Riwu *et al.*, 2020). Segundo Tudou, *et al.* (2022), a presença de genes codificadores de ESBLs/*pAmpC* em Enterobacterales têm sido identificadas nas fezes de cães saudáveis na Europa.

As bactérias pertencentes à ordem Enterobacterales como a *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* apresentam mecanismos especializados para a disseminação de genes resistentes. De acordo com Tudou *et al.* (2022), os genes codificantes de ESBLs podem ser encontrados tanto no cromossoma, mas sobretudo em elementos genéticos móveis (EGMs) como os plasmídeos, transposões, sequências de inserção, integrões e bacteriófagos pelo que a sua transmissão é bastante facilitada. A transferência horizontal de genes é o mecanismo mais comumente associado à disseminação da RAM entre as diversas espécies de bactérias (Sawa, *et al.*, 2020). Os EGMs conseguem ser transmitidos de célula para célula horizontalmente através de fenómenos de conjugação, transformação ou por transdução (Castanheira, Simner, & Bradford, 2021). Os EGMs contêm múltiplos genes de resistência pelo que conferem um fenótipo multirresistente, do inglês “Multidrug resistance” (MDR) aos seus hospedeiros.

Sawa *et al.* (2020), salientam ainda que a associação de estirpes comensais, com genes RAM representa igualmente um grave problema de saúde pública, pois constituem reservatórios de genes de resistência de ESBLs e *pAmpC*. Para além disso ocorre, normalmente, em conjugação com genes que conferem resistências a outras classes de antibióticos, evidenciando um fenótipo MDR (Kazmierczak, Jonge, Stone & Sahm, 2020). Por este motivo e a expressão fenotípica de resistência ser muito ampla, a emergência de infecções provocadas por bactérias produtoras destas enzimas são consideradas uma preocupação em medicina veterinária e humana (Rodríguez-Guerrero, Callejas-Rodelas, Navarro-Marí & Gutiérrez-Fernández 2022).

2.2.1.1. β -Lactamases de largo espectro

Nos últimos anos, observou-se um aumento rápido e acentuado na prevalência de bactérias resistentes a antibióticos pertencentes ao grupo dos β -lactâmicos em animais de

companhia, humanos e no ambiente (solo, águas residuais, animais, alimentos) (Riwu *et al.*, 2020). A inativação do princípio ativo por β -lactamases é considerado a principal causa para a resistência aos antibióticos β -lactâmicos de espectro alargado em Enterobacterales (Castanheira *et al.*, 2021; Tudu *et al.*, 2022). Desta forma, a produção de ESBLs pode levar inevitavelmente ao aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes, bem como os custos com a saúde (Drieux, Brossier, Sougakoff & Jarlier, 2008; Polsfuss, Bloemberg, Giger, Meyer & Hombach, 2012).

As ESBLs são uma família de enzimas β -lactamases bastante diversificadas em termos de estrutura e perfil de substrato com atividade contra penicilinas, cefalosporinas de terceira geração (C3G), como a cefotaxima (CTX) e ceftazidima (CAZ) e até mesmo cefalosporinas de quarta geração (C4G) [cefepime (FEP)] (Sawa, *et al.*, 2020; Urban-Chmiel *et al.*, 2022). De acordo com Riwu *et al.* (2020) e Castanheira *et al.* (2021), a prevalência de estirpes produtoras de ESBLs pertencentes à ordem das Enterobacterales, tem aumentado continuamente durante a última década na Europa e noutras regiões do mundo, apresentando atualmente uma distribuição mundial (anexo D: figura D1). Simultaneamente, as ESBLs têm vindo a ser identificadas tanto em infeções nosocomiais como em comunidade a nível mundial (Bajaj *et al.*, 2016; Castanheira *et al.*, 2021). Salgado-Caxito, Benavides, Adell, Paes & Moreno-Switt (2021), compararam a prevalência de *E. coli* produtora de ESBLs entre vários países do mundo e verificaram que a prevalência geral em cães foi de 6,9% e em gatos de 5,0%, contudo a prevalência foi variável entre os vários continentes desde 0,6% (Oceânia) a 16,6% (África) em cães e desde 0% (Oceânia) a 16,8% (Ásia) em gatos (anexo D: figura D2).

De acordo como Shurina & Page (2021) e Riwu *et al.* (2020), os β -lactâmicos (cefalosporinas, monobactâmicos, carbapenemos) representam os agentes antibacterianos mais comumente utilizados. Assim, o uso indiscriminado deste grupo de antibióticos originou uma pressão evolutiva substancial nas bactérias pertencentes à ordem das Enterobacterales resultando numa elevada existência de β -lactamases distintas. Por esta razão, atualmente existem diversas ESBLs com características enzimáticas muito diversas identificadas em Enterobacterales (Sawa, *et al.*, 2020).

Apesar de ser uma minoria comparativamente com a proporção da microbiota comensal do trato gastrointestinal de indivíduos saudáveis, *E. coli* comensal poderá constituir reservatório de genes que codificam β -lactamases (Sawa *et al.*, 2020). É ainda de salientar que pacientes clinicamente saudáveis podem estar colonizados com ESBLs e Enterobacterales produtoras de cefalosporinases *pAmpC*, funcionando como reservatórios e fontes de

transmissão (Schmitt *et al.*, 2021; Urban-Chmiel *et al.*, 2022). Por estes motivos, a OMS categorizou as ESBLs como um agente patogénico de prioridade crítica na lista publicada em 2024 (AMR & IRC, 2024).

As ESBLs mais comumente isoladas e com maior relevância clínica pertencem à família CTX-M seguido da família TEM e SHV e alguns subtipos à família OXA (Urban-Chmiel *et al.*, 2022), codificadas respetivamente por *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA}. Estas enzimas conferem resistência à maioria dos antibióticos β -lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda, terceira e até mesmo de quarta geração. Algumas podem também hidrolisar antibióticos monobactâmicos como o aztreonam (Castanheira *et al.*, 2021).

Atualmente, estas enzimas são isoladas a partir de infeções nosocomiais como também em infeções adquiridas em comunidade. Adicionalmente este fenótipo tem sido observado em humanos saudáveis, animais de companhia, animais de produção, alimentos e águas de esgoto, indicando a existência de reservatórios que contêm e disseminam ESBLs (Caliskan-Aydogan & Alocilja, 2023; Tseng, Liu, & Liu, 2023).

2.2.1.1.1. CTX-M, TEM, SHV e OXA

A família CTX-M integra enzimas β -lactamases com significado clínico importante devido à capacidade desta enzima conferir resistência a C3G (Shurina & Page, 2021). Esta família pode ser dividida em 5 grupos de acordo com a homologia das suas sequências, isto é a semelhança na sequência de aminoácidos permitindo estabelecer uma relação filogenética entre membros: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25 (Castanheira *et al.*, 2021; Riwu *et al.*, 2020; Shurina & Page, 2021). Posteriormente cada grupo pode ser dividido em vários subgrupos. As cefotaximases são geneticamente diversas (Castanheira, *et al.*, 2021) e, de acordo com Shurina & Page (2021), partilham menos de 40% da sequência em aminoácidos.

Apresentam a capacidade de hidrolisar C3G, e algumas variantes são capazes de hidrolisar o cefepime (C4G) (Bush & Jacoby, 2010).

Este grupo de enzimas é codificado pelo gene *bla*_{CTX-M} presente na maioria dos casos em plasmídeos (Urban-Chmiel *et al.*, 2022).

As diferentes pressões seletivas a que estas bactérias portadoras de enzimas CTX-M foram submetidas originaram uma pressão evolutiva substancial, o que contribuiu para uma distribuição geográfica ampla, mas específica e traduziu-se em suscetibilidades diferentes a antibióticos igualmente distintos (Bajaj *et al.*, 2016; Shurina & Page, 2021). Na Europa as

enzimas CTX-M-15 e CTX-M-14 são as mais prevalentes em humanos e as enzimas CTX-M-15 e CTX-M-1 em animais de companhia (Belas *et al.*, 2022; Bogaerts *et al.*, 2015;)

A família TEM contém enzimas que evidenciam fenótipo de ESBL. Estas correspondem a variantes da β -lactamase TEM-1 mediada por plasmídeos (Sawa *et al.*, 2020).

Atualmente encontram-se descritas 243 enzimas desta família, no entanto nem todas evidenciam características de ESBLs.

As β -lactamases pertencentes à família SHV inicialmente estavam codificadas no ácido desoxirribonucleico, do inglês “deoxyribonucleic acid” (DNA) cromossomal de *K. pneumoniae* (Liakopoulos, Mevius & Ceccarelli, 2016). A primeira variante a surgir foi a SHV-2 que diferia num único aminoácido comparativamente com a SHV-1. Esta alteração parece estar associada à hidrólise eficiente da ceftazidima. Atualmente encontram-se identificadas 228 variantes da SHV, contudo nem todas foram caracterizadas funcionalmente de forma a perceber se demonstram fenótipo de ESBL. Mundialmente, as mais comumente identificadas em Enterobacterales são a SHV-5 e SHV-12. Normalmente as enzimas do tipo SHV encontram-se sobretudo em isolados de *K. pneumoniae* (Castanheira *et al.*, 2021).

De acordo com Belas, Salazar, Gama, Couto & Pomba (2014) e Castanheira *et al.* (2021), com o aparecimento de outras enzimas, nomeadamente enzimas CTX-M a prevalência das TEM e SHV diminuiu e o seu impacto clínico é reduzido.

As oxacilinas são enzimas β -lactamases codificadas pelo gene *bla_{OXA}* e apresentam capacidade de hidrolisar a oxacilina, penicilinas, cefalosporinas de primeira e segunda geração. Existem, ainda 27 oxacilinas com capacidade de hidrolisar C3G e 4GC evidenciando um fenótipo de espectro alargado (Castanheira *et al.*, 2021). Algumas enzimas pertencentes a esta família detêm, também, a capacidade de hidrolisar antibióticos pertencentes ao grupo dos carbapenemos (OXA-48) (Sawa *et al.*, 2020).

2.2.1.2. Cefalosporinas do tipo AmpC mediadas por plasmídeos

As β -lactamases AmpC são cefalosporinas clinicamente relevantes pois são capazes de hidrolisar uma grande variedade de antibióticos β -lactâmicos incluindo as penicilinas, cefalosporinas, principalmente de primeira e segunda geração (Urban-Chmiel, *et al.*, 2022). Algumas apresentam, também atividade contra C3G e ao grupo das cefamicinas (Castanheira *et al.*, 2021) como por exemplo a cefoxitina (FOX). No entanto, a hidrólise é bastante reduzida no caso do cefepime e dos carbapenemos devido à baixa afinidade da enzima para com estes substratos.

Estas enzimas podem encontrar-se codificadas no DNA cromossomal ou em plasmídeos (Rodríguez-Guerrero *et al.*, 2022). O grupo de genes que codificam estas cefalosporinases denominam-se *bla*_{AmpC} (Gupta *et al.*, 2014) e as famílias de enzimas mais comumente identificadas são ACC, FOX, MOX, DHA, CMY, CIT e EBC (Rodríguez-Guerrero *et al.*, 2022)

As *pAmpC* apresentam uma distribuição geográfica bastante ampla (Jacoby, 2009) e, as cefalosporinases mais prevalentes em isolados clínicos pertencem maioritariamente à família CMY-2, seguida da DHA-1, ambas mediadas por plasmídeos. Segundo, Rodríguez-Guerrero *et al.* (2022), a enzima CMY-2 é mais prevalente em *E. coli* e a enzima DHA-1 é mais comumente encontrada em *K. pneumoniae*. De acordo com, Belas, Menezes, Gama, & Pomba, (2020) e Bogaerts *et al.* (2015), a enzima CMY-2 é a mais prevalente em animais de companhia.

É ainda de salientar que, os plasmídeos que apresentam genes codificadores de AmpC normalmente contêm múltiplos genes de resistência para outras classes de antibióticos como aminoglicosídeos, cloranfenicol, quinolonas, sulfonamidas e tetraciclinas bem como outros genes codificadores de β -lactamases como a TEM, CTX-M e SHV (Jacoby, 2009).

2.2.1.3. Carbapenemases

A utilização excessiva e incorreta de antibióticos e a rápida disseminação de genes que codificam carbapenemases são fatores importantes que permitiram, nos últimos anos, o aparecimento de Enterobacterales produtoras de carbapenemases (EPC) (Van Duin & Doi, 2017). As mais frequentemente isoladas pertencem à família: KPC, NDM, VIM e OXA-48 (Mairi *et al.*, 2018).

A rápida disseminação permite a colonização do hospedeiro, acentuado pelas interações entre indivíduos quer da mesma espécie quer de espécies distintas, como por exemplo humanos e os respetivos animais de companhia (Caliskan-Aydogan & Alocilja, 2023). O aparecimento de bactérias resistentes aos carbapenemos em animais nos últimos anos é preocupante e representa um problema grave de saúde animal e de saúde pública. Esta situação pode dever-se ao facto do aumento da prescrição de antibióticos a animais de companhia, mas também pelo contacto próximo entre animais e os seus coabitantes humanos (Rincón-Real & Suárez-Alfonso, 2022).

No entanto são poucos os antibióticos que demonstram atividade contra as EPCs devido à habilidade das carbapenemases em hidrolisar a maioria dos antibióticos β -lactâmicos

(Van Duin & Doi, 2017) e, normalmente coexistem outros mecanismos adicionais de resistência contra outras classes de antibióticos como as fluoroquinolonas e aminoglicosídeos.

A presença de EPCs é problemática visto que os antibióticos pertencentes ao grupo dos carbapenemos são considerados os β -lactâmicos da última linha de defesa pelo que se torna importante identificar bactérias produtoras de carbapenemases de forma a ter um diagnóstico correto, permitir um tratamento mais adequado e definir estratégias de prevenção e controlo de infeções (Caliskan-Aydogan & Alocilja, 2023). Apesar desta classe de antibióticos ser utilizada, principalmente na saúde humana, podem ser usados, ocasionalmente em animais de companhia sob condições específicas, nomeadamente infeções do trato urinário (ITU), ILC provocada por microrganismos MDR (Mairi *et al.*, 2018).

2.3. Métodos de deteção de ESBLs e pAmpC

Existem diversos recursos que podem ser utilizados para a diferenciação e identificação de Enterobacterales, nomeadamente meios de cultura bacteriológicos, testes bioquímicos e testes moleculares. Os testes de deteção podem ser caracterizados em métodos fenotípicos e moleculares (Castanheira *et al.*, 2021).

2.3.1. Deteção fenotípica

Este método de deteção permite avaliar a expressão fenotípica e perfil de resistências de determinado isolado clínico a diversas classes de antibióticos distintos. Para este efeito é realizado um TSA. O seu objetivo é perceber quais as classes de antibióticos a que determinado isolado é suscetível e/ou qual concentração mínima necessária para inibi-lo.

Com o aumento das taxas de resistência aos antibióticos é importante recorrer à utilização de métodos padronizados, simples, flexíveis e práticos (Castanheira *et al.*, 2021). De acordo com Comité Europeu de Testes de Susceptibilidade Antimicrobiana, do inglês “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing” (EUCAST) e *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI), o método de difusão de disco (DD) é uma das abordagens mais utilizadas para o TSA em laboratórios de rotina. As metodologias predefinidas para a testagem e respetiva interpretação dos resultados encontram-se disponíveis em ambos os guias.

2.3.2. Detecção molecular

As metodologias moleculares especialmente o PCR com sequenciação *Sanger* ou sequenciação total do genoma, do inglês “Whole Genome Sequencing” (WGS) servem como teste de eleição para a detecção, identificação e diferenciação das diferentes β – lactamases (Bajaj *et al.*, 2016). Os testes moleculares permitem identificar genes específicos, por esse motivo revelam-se úteis para reconhecer o mecanismo que confere determinada resistência (Castanheira *et al.*, 2021), permitindo adequar a terapêutica para os casos cujos testes fenotípicos tenham originado resultados duvidosos.

O PCR é o método de amplificação dos ácidos nucleicos mais comumente utilizado e permite a obtenção de milhões de cópias de um fragmento de DNA específico em pouco tempo. Esta técnica baseia-se num binómio de tempo e temperatura que ocorre por ciclos e pode ser dividida em três passos principais: desnaturação, hibridação e extensão.

Apesar da técnica de PCR permitir a detecção e análise de genes alvo que codificam a RAM, pode não ser suficiente para descobrir novos mecanismos de resistência. Assim, a WGS é considerada um método com maior sensibilidade e especificidade para esse efeito.

2.4. Prevalência de ESBL/*pAmpC* na Europa

A disseminação de ESBLs e *pAmpC* representam uma ameaça global responsável pela falha terapêutica devido à capacidade destas enzimas em hidrolisar C3G e C4G e carbapenemos.

O anexo B: tabela B1 evidencia diversos estudos em alguns países da Europa, mas sobretudo em Portugal que demonstram a prevalência de ESBLs/*pAmpC*, os principais grupos filogenéticos e determinantes de resistência identificados bem como alguns fatores de risco importantes que podem contribuir para o aumento da sua incidência.

A prevalência de ESBLs/*pAmpC* é significativa na Europa apesar de apresentar alguma variabilidade (3,6 - 25%). Relativamente aos grupos filogenéticos, foram identificados os quatro principais (A, B₁, B₂ e D). Num estudo de Belas *et al.* (2022), identificaram que a maioria dos isolados clínicos (48,6%) correspondia a *E. coli* do grupo filogenético D.

Os determinantes de resistência identificados pertenceram sobretudo ao grupo de enzimas CTX-M (CTX-M-15, CTX-M-1, CTX-M-32) e CMY-2 evidenciando a grande diversidade de genes codificadores presentes atualmente.

Os estudos representados no anexo B:tabela B1salientam, também, diversos fatores de risco que podem aumentar a prevalência de ESBLs/*pAmpC* nos animais de companhia e

permitir a disseminação de genes de resistência entre animais como também a transmissão entre espécies (animais-humanos). Os principais fatores identificados foram animais que pertencem a abrigos/canis, administração prévia de antibióticos, hospitalização recente (até 12 meses), dieta à base de alimento cru, contacto com cachorros e animais do sexo feminino.

Segundo Belas *et al.* (2014), cães pertencentes a canis apresentam uma probabilidade três vezes superior de serem portadores de ESBLs/*pAmpC* comparativamente com cães pertencentes a tutores privados provavelmente devido ao uso indiscriminado de antibióticos nestes locais. Referem ainda que o tratamento prévio com antibiótico é um fator de risco para a colonização por estas bactérias, em que a cefalexina oral funciona como seletor de *E. coli* produtora de CMY-2 na microbiota fecal. Werhalm *et al.* (2023), identificaram que 16,6% dos animais que receberam terapia antimicrobiana prévia eram portadores de bactérias produtoras de ESBL.

A transferência de bactérias e determinantes de resistência de mãe para cachorros, pode ocorrer através do leite, microbiota vaginal e fezes. Segundo Werhalm *et al.* (2023), 14.6% dos cães que contactaram com cachorros eram portadores de Enterobacterales produtoras de ESBLs, ou seja, estes animais apresentam maior risco de infeção por este tipo de microrganismos. Concluíram que de forma geral manter os animais em grupos, representa risco acrescido para ser portador de ESBLs e salientam que constituem uma fonte de transmissão também para outros animais e humanos com contacto próximo.

Belas *et al.* (2014), identificaram que as fêmeas apresentam maior risco de serem portadores de Enterobacterales produtoras de ESBLs provavelmente devido à prevalência superior de infeções bacterianas como piómetra ou ITU.

Werhalm *et al.* (2023), identificaram a dieta à base de carne crua e géneros alimentícios excedentes como um fator de risco para o aumento da prevalência de ESBLs. No seu estudo identificaram que 13,8% dos animais com dieta à base de carne crua e 15,5% dos animais com dieta à base de géneros alimentícios excedentes humanos eram portadores deste tipo de bactérias.

O antropomorfismo e o relacionamento de mutualismo entre humanos e animais conduziram à transferência de genes de resistência entre animais e humanos e vice-versa. Em Portugal, Belas *et al.* (2020), e Menezes *et al.* (2023), identificaram a partilha de genes de resistência entre humanos e os respetivos animais de companhia evidenciando a transferência destes determinantes de resistência entre espécies.

2.5. Antibióticos em cirurgia ortopédica limpa

Como descrito anteriormente, com o aparecimento crescente de bactérias resistentes a diversos antibióticos tornou-se essencial definir estratégias que minimizem a utilização incorreta e consequentemente reduzam o aparecimento de novas resistências. Em COL é crucial aplicar e seguir medidas criteriosas, uma vez que a ocorrência de ILC em cirurgia sobretudo por Enterobacterales produtoras de ESBL/pAmpC representam um desafio pois, dificultam o tratamento pela limitação de opções terapêuticas e comprometem o sucesso cirúrgico principalmente em intervenções com aplicação de implantes metálicos.

As principais medidas focam-se sobretudo na identificação de fatores de risco e na prevenção pela aplicação de medidas que minimizem a contaminação e impeçam o crescimento microbiano. Nos subcapítulos seguintes vão ser identificados os principais fatores de risco associados ao desenvolvimento de ILC e algumas medidas e recomendações relativamente ao uso de antibióticos com o objetivo de encontrar um equilíbrio, em que por um lado o crescimento bacteriano é reduzido e, simultaneamente o aparecimento de novas resistências é minimizado.

A cirurgia limpa engloba as feridas cirúrgicas não traumáticas, onde não se verifica inflamação ou infeção no momento da intervenção, mantendo sempre a assepsia (Singh & Weese, 2018). Neste tipo de cirurgias, o trato respiratório, gastrointestinal e os sistemas genito-urinário e orofaríngeo não são acedidos (Fossum, 2019). É ainda de salientar que, as feridas cirúrgicas limpas são encerradas por primeira intenção e, de forma geral, as cirurgias inseridas neste grupo são eletivas (Onyekwelu *et al.*, 2017). A cirurgia ortopédica inclui todos os procedimentos cirúrgicos realizados ao sistema musculoesquelético.

2.5.1. Infeção do local cirúrgico

A ILC pode ser definida como a infeção que ocorre ao nível da ferida cirúrgica após um procedimento (Välkki *et al.*, 2020). A maioria das ILC são, normalmente, identificadas entre 14 a 30 dias após o procedimento ou até 90 dias se ocorrer a colocação de implantes metálicos (Fossum, 2019; Lyssens *et al.*, 2019; Suranigi, Ramya, Sheela Devi, Kanungo & Najimudeen, 2021). De acordo com as definições do Centro de Doença Prevenção e Controlo (CDC), uma infeção associada a implantes pode desenvolver-se até um ano após a cirurgia (Stetter, Boge, Grönlund & Bergström, 2021).

De acordo com Singh & Weese (2018), definir ILC pode ser difícil e distinguir inflamação (pela manipulação dos tecidos) de infeção é importante para instituir um tratamento

rápido e evitar terapia desnecessária da inflamação não infecciosa. Segundo, Aiken, Hughes, Abercromby, Holmes & Anderson (2015), a ILC ocorre se a ferida cirúrgica apresentar um ou uma combinação dos seguintes sinais: presença de conteúdo purulento; deiscência espontânea com conteúdo seroso e presença de pelo menos dois desses sinais: edema, rubor, calor, dor ou pirexia; presença de claudicação associada a dor, edema e conteúdo em cirurgias com utilização de implantes e simultaneamente, pirexia e sinais radiográficos compatíveis com osteomielite. Pratesi *et al.* (2015), salientam ainda que a ILC ocorre quando existe simultaneamente sinais clínicos, citologia e cultura compatíveis.

A prevalência de ILC em COL é bastante variável segundo os autores 0,6% a 7,1% (Välkki *et al.*, 2020), 0,8% a 18% (Williams, 2018) e 4% a 30% (Suranigi *et al.*, 2021).

A ILC constitui uma complicação cirúrgica grave e frustrante em medicina veterinária (Gonzalez *et al.*, 2017; Singh & Weese, 2018), uma vez que leva ao atraso da cicatrização, aumenta o risco de morbidade operatória, conduzindo a redução da qualidade de vida (Onyekwelu *et al.*, 2017), podendo levar a períodos de hospitalização mais prolongados, traduzindo-se em custos significativamente mais elevados para os tutores (Suranigi *et al.*, 2021; Välkki *et al.*, 2020). Segundo, Lyssens *et al.* (2019), pode em alguns casos levar até à morte. Por estes motivos a identificação precoce de ILC bem como o reconhecimento de fatores de risco é essencial para não só gerir as expectativas do tutor bem como otimizar os resultados clínicos (Onyekwelu *et al.*, 2017).

Os agentes etiológicos responsáveis pela ILC são, na sua maioria, microrganismos oportunistas comensais encontrados no paciente, no pessoal médico e ambiente hospitalar/clínico (Suranigi *et al.*, 2021). Os microrganismos mais frequentemente isolados em ILC de COL são: *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus aureus*, Enterobacterales, *Enterococcus* spp. e *Pseudomonas* spp. Ao longo dos anos, tem ocorrido um aumento substancial de organismos MDR em hospitais e na comunidade, desta forma a ILC pode ser provocada, muitas das vezes por bactérias MDR, nomeadamente *Staphylococcus aureus* metilicina resistentes (MRSA) e Enterobacterales produtoras de ESBLs, que podem ser encontradas tanto no meio ambiente, como integrar a microbiota natural do paciente (Singh & Weese, 2018).

As fontes de infeção bacteriana podem ser agrupadas em fatores endógenos ou exógenos (Lyssens *et al.*, 2019). Relativamente às fontes endógenas, estas incluem a microbiota naturalmente presente na pele, membranas mucosas, trato gastrointestinal e/ou infeções preexistentes no local cirúrgico, como por exemplo abscessos ou feridas abertas. Para além disto,

é importante salientar que as fontes endógenas de ILC incluem, igualmente, os locais, distantes da região a intervencionar, mas com potencial de representar foco de infeção, como doença dentária, ITU e/ou endocardite. No caso das fontes exógenas estas incluem todos os fatores extrínsecos ao paciente como o as condições do bloco operatório (ambiente, ventilação), instrumentos, materiais e equipamentos cirúrgicos e pessoal cirúrgico (Fossum, 2019).

2.5.1.1. Fatores de risco

De forma a predizer o risco de desenvolver ILC, é crucial identificar os fatores de risco que predis põem o seu desenvolvimento (Williams, 2018). Atualmente existem diversos fatores identificados (Gehlen *et al.*, 2023; Stetter *et al.*, 2021;); a infeção pode ser desencadeada por fatores exógenos (ambiente da sala cirúrgica e equipa) endógenos (microrganismos preexistentes, pele e membranas mucosas do paciente). Quando as membranas mucosas ou a pele são cortadas, os tecidos subjacentes ficam expostos a diversas fontes de contaminação de microrganismos. Os mais frequentemente isolados são *S. aureus*, *E. coli*, *Enterococcus spp.* (Suranigi *et al.*, 2021). Os fatores de risco podem ser também divididos em fatores pré, intra e pós cirúrgicos (Lyssens *et al.*, 2019). O anexo E: tabela E1 demonstra a prevalência de ILC em diversos estudos de procedimentos ortopédicos limpos em animais de companhia bem como possíveis fatores de risco que predis põem ao seu aumento.

2.5.1.1.1. Fatores pré-cirúrgicos

Nesta categoria podem ser inseridos todos os fatores intrinsecamente relacionados com o paciente e abordagens ao paciente antes do procedimento cirúrgico.

Relativamente aos fatores endógenos é importante salientar o estatuto clínico do animal: presença de doenças concomitantes, o estado imune, a idade, o peso, a raça, o sexo do paciente (Gehlen *et al.*, 2023), colonização prévia com microrganismos MDR, a classificação da ferida cirúrgica e administração profilática de antibióticos.

Pacientes com doenças concomitantes, como por exemplo endocrinopatias (diabetes mellitus, hiperadrenocorticism e hipotireoidismo) estão associados ao aumento do risco de ILC (Fossum, 2019), uma vez que estas comorbidades podem aumentar a taxa de filtração glomerular o que leva ao aumento do *clearance* do antibiótico profilático potenciando o aparecimento de ILC pela diminuição do tempo em que o antibiótico se mantém acima da concentração mínima inibitória (CMI) (Gonzalez *et al.*, 2017).

A idade é um fator importante a ter em consideração. Num estudo publicado por Hagen *et al.* (2020), verificou-se que cães com idade inferior a 6 anos e superior a 12 anos apresentam maior risco de desenvolver ILC. Em cães mais jovens pode ser explicado pela imaturidade do sistema imunitário, bem como alterações na personalidade e atividade, ou seja, em cães mais jovens existe maior probabilidade de ocorrer uma atividade exagerada após a cirurgia, levando mais facilmente a deiscência e consequentemente a infecção. No caso de pacientes geriátricos, a incidência de ILC pode aumentar pois estes apresentam um sistema imune mais comprometido pelo que facilita o crescimento de bactérias resistentes (Singh, & Weese, 2018; Stetter *et al.*, 2021). Sendo que Aiken *et al.* (2015), indicam que por cada ano de idade, o risco de desenvolvimento de ILC é 1,5 vezes superior.

Pacientes com obesidade podem apresentar maior predisposição para desenvolvimento de ILC, pois de acordo com Hagen *et al.* (2020), cães submetidos a osteotomia de nivelamento do plateau tibial, do inglês “Tibial Plateau Leveling Osteotomy” (TPLO), o peso adicional constitui um desafio biomecânico para o complexo placa e parafusos, conduzindo a micro movimentos a nível do local de osteotomia e por esse motivo provocam dano à rede vascular recém-formada.

Relativamente ao sexo, as hormonas androgénicas podem resultar num aumento do risco de ILC em cães e gatos machos inteiros (Fossum, 2019).

A classificação da ferida cirúrgica quanto ao grau de contaminação (limpa, limpa-contaminada, contaminada e/ou suja) em conjunto com a identificação do grau ASA (Sociedade Americana de Anestesiologia, do inglês “American Society of Anesthesiologists”) permitem também, prever o risco de desenvolvimento de ILC (Onyekwelu *et al.*, 2017). Segundo, Turk, Singh & Weese (2015), a classificação da ferida cirúrgica não é suficiente por si mesmo como fator preditivo do risco de ILC devido à sua natureza multifatorial e à diversidade de procedimentos cirúrgicos.

Relativamente à profilaxia antimicrobiana, devido à sua relevância será abordada no subcapítulo seguinte.

A preparação do local cirúrgico é realizada com o objetivo de reduzir a contaminação microbiana. Assim, a preparação incorreta ou que provoque traumatismo desnecessário pode aumentar o risco de desenvolvimento de ILC (Singh & Weese, 2018). A tricotomia provoca abrasões microscópicas da pele que pode ser colonizada com microrganismos oportunistas (Gehlen *et al.*, 2023). Assim de forma a minimizar a prevalência de ILC, nestas circunstâncias, é recomendado realizar a tricotomia imediatamente antes do procedimento (Fossum, 2019), isto

é o mais próximo possível da hora de incisão e de forma mais atraumática possível, com o uso de lâminas adequadas e em bom estado. É recomendado, também a sua realização em pacientes com indução anestésica de modo a reduzir o trauma, pois em cães conscientes há maior probabilidade de traumatismo de pele (Singh & Weese, 2018).

A contaminação microbiana do local cirúrgico é o precursor principal para desenvolvimento de ILC (Suranigi, *et al.*, 2021). Desta forma, a antisepsia é outra medida importante para diminuir o grau de contaminação na pele, no entanto esfregar excessivamente, uso de biocidas agressivos, re-contaminação do local e tempo de contacto inadequados são fatores que impedem alcançar uma assepsia adequada e conferem falsa segurança (Singh & Weese, 2018). Num estudo realizado por Suranigi *et al.* (2021), em medicina humana a 1027 pacientes submetidos a cirurgias ortopédicas limpas, avaliaram a incidência de ILC em pacientes cuja preparação do local cirúrgico foi realizada apenas com iodopovidona e outra com uma combinação de iodopovidona e álcool. Verificaram que a preparação da pele feita apenas com iodopovidona teve maior incidência de ILC comparativamente com a combinação de iodopovidona e álcool. Em medicina veterinária, Vätkki *et al.* (2020), recomendam a utilização de ciclos de gluconato de clorexidina a 4% e etanol a 70% para a preparação do local cirúrgico.

A preparação asséptica da equipa cirúrgica deve ser criteriosa, a higienização das mãos e braços antes de entrar no bloco operatório podem ser realizadas de acordo com as recomendações da OMS (Vätkki *et al.*, 2020). Toda a equipa presente no bloco deve usar máscara e touca cirúrgica estéreis, o cirurgião e assistente devem também utilizar bata e luvas estéreis. Nos procedimentos ortopédicos limpos é recomendada a utilização do método de dupla luva e em casos de suspeita da perda de assepsia, as luvas devem ser imediatamente trocadas.

2.5.1.1.2. Fatores cirúrgicos

Nesta categoria podem ser inseridos alguns fatores intrínsecos ao animal, ao procedimento cirúrgico, às condições do bloco operatório e equipa cirúrgica (Suranigi *et al.*, 2021).

A hipotensão intra-cirúrgica, pressão arterial média inferior a 60mmHg e pressão arterial sistémica inferior a 90mmHg, torna a ocorrência de ILC 27 vezes mais provável (Turk *et al.*, 2015). Pode estar associada à diminuição de oxigénio sanguíneo no local cirúrgico (Fossum, 2019), bem como a diminuição da atividade fagocítica, reduzindo a capacidade de controlo de infeção ao nível da ferida cirúrgica, assim a hipotensão representa um fator de risco

que deve ser monitorizado antes, durante e após o procedimento cirúrgico, de modo a poder tomar medidas que minimizem o impacto deste parâmetro.

O tempo cirúrgico é um fator importante a ter em consideração para a avaliação da incidência de ILC (Singh, & Weese, 2018). Por cada hora adicional de cirurgia o risco de desenvolvimento de infecção aumenta em 30% (Williams, 2018). Períodos prolongados (superiores a 90 minutos) (Gonzalez *et al.*, 2017) predis põem a ILC, inclusive segundo Stetter *et al.* (2021), cirurgias que requerem mais de 120 minutos apresentaram seis vezes mais hipóteses de desenvolver ILC comparativamente com procedimentos mais curtos (inferiores a 30min).

O risco de desenvolvimento de ILC aumenta com a duração do procedimento cirúrgico, pelo aumento da exposição da ferida cirúrgica a contaminação e aderência bacteriana (Suranigi *et al.*, 2021), supressão do sistema imune associado à diminuição de linfócitos, pela inibição da migração leucocitária e da fagocitose e diminuição da síntese de citocinas, maior trauma do tecido pela maior manipulação de tecidos e hipotermia (Välkki *et al.*, 2020). Com o prolongamento da duração do procedimento ocorre diminuição dos níveis de antibiótico a nível do tecido o que leva a maior probabilidade de contaminação bacteriana (Gonzalez *et al.*, 2017), pelo que é necessária a re-administração para manter os níveis acima da CMI (Gehlen, *et al.*, 2023).

A condição do tecido a ser operado e o grau de contaminação preexistente são fatores importantes para o desenvolvimento de ILC (Gehlen *et al.*, 2023). O tecido traumatizado e/ou necrosado apresenta um nível reduzido de oxigénio, o que permite o crescimento bacteriano. Para além disso, quando a integridade dos tecidos se encontra comprometida, a imunidade mediada por células (fagocitose) e imunidade humoral estão significativamente diminuídas (Fossum, 2019). Desta forma, o manuseamento atraumático dos tecidos e instrumentos são importantes para prevenir infecção. Durante o procedimento, a implementação dos 7 princípios de Halsted é recomendado com o objetivo de minimizar o desenvolvimento de ILC (Singh & Weese, 2018).

Outro fator a ter em consideração é o tipo de procedimento, pois em procedimentos mais complexos, naturalmente o tempo cirúrgico é superior e possivelmente associado a maior dissecação do local e consequentemente mais trauma tecidular, predispondo a maior crescimento bacteriano na ferida cirúrgica (Singh & Weese, 2018). Os estudos existentes salientam o risco de ILC dependendo do tipo de procedimento: Segundo Valki *et al.* (2020), a taxa de ILC em cirurgias ortopédicas limpas é de 6,7% destacando-se três procedimentos:

artrodese em 25% dos casos, artroscopia em 11,8% e TPLO em 7,7% dos animais. Num estudo realizado por Aiken *et al.* (2015), obtiveram uma prevalência de ILC de 5,13% para animais apenas com administração antimicrobiana profilática e de 2,44% para administração conjunta de antibiótico profilático e antibiótico pós-cirúrgico por 5 dias. Para outros procedimentos ortopédicos limpos (exceto TPLO) obtiveram 1,33% e 4%, respectivamente. As taxas de ILC para a artrodese variam entre 2,6 a 18,2%. (Välkki *et al.*, 2020). Turk *et al.* (2015), obtiveram uma taxa de ILC 5,2% e especificamente para TPLO obtiveram uma incidência de 7,5%.

No caso específico da TPLO, segundo os autores supramencionados trata-se de um procedimento cirúrgico que poderá apresentar uma prevalência superior de ILC comparativamente com outros procedimentos (osteotomia ulnar, reparação extracapsular de ruptura de ligamento cruzado, artrotomia, excisão da cabeça e colo do fêmur) e o risco reportado é bastante variável entre 2,5 a 25,9%. A elevada taxa pode ser atribuída à disseção agressiva do periósteo, à cobertura reduzida da tíbia proximal por tecidos moles, à necrose térmica do tecido ósseo durante a osteotomia, à presença de implante e o tipo utilizado.

Os implantes são substâncias estranhas ao organismo usados como suporte, reconstrução ou com o objetivo de mimetizar a função da estrutura anatômica. A presença de implantes cirúrgicos para determinados procedimentos, como prótese total de anca, do inglês “Total Hip Replacement” (THR) ou TPLO, pode predispor ao desenvolvimento de ILC.

Num estudo publicado por Turk *et al.* (2015), o risco de desenvolver ILC foi 5,6 vezes superior em cães que receberam implantes comparativamente com cães que não receberam. Em casos de existência de ILC, a terapia médica recorrendo ao uso de antibióticos, raramente é bem-sucedida até à remoção do implante, uma vez que ocorre a formação de biofilmes. Os biofilmes formam-se quando bactérias, particularmente a *S. pseudintermedius* aderem à superfície e começam a excretar uma matriz extracelular formando um agregado bacteriano. Uma vez ancorado à superfície, os microrganismos são extremamente resistentes aos antibióticos, pelo que nestas circunstâncias o implante constitui uma barreira ao antibiótico e ao próprio sistema imunitário do paciente dificultando o controlo da infeção (Fossum, 2019; Turk *et al.*, 2015). Ainda no estudo de Turk *et al.* (2015), devido à presença de ILC, o implante teve de ser removido em 42 das 71 TPLO realizadas com presença de ILC. Assim, nos casos em que é necessária a utilização de implantes, o desenvolvimento de ILC é catastrófico para o sucesso cirúrgico pelo que reforça a importância de desenvolver estratégias para a minimizar.

Além disso, a experiência do cirurgião é fundamental, uma vez que um cirurgião inexperiente provoca traumatismo maior comparativamente com cirurgias mais experientes

resultando numa maior suscetibilidade à infecção (Fossum, 2019). Deste modo, a experiência do cirurgião representa um papel importante, mas a coordenação entre os serviços de anestesia, imagem diagnóstica, planeamento cirúrgico e condições do bloco operatório são parâmetros igualmente essenciais (Singh & Weese, 2018).

O tempo anestésico encontra-se intimamente correlacionado com o tempo pré- e pós-cirúrgico bem como a duração do período cirúrgico (Fossum, 2019). A diferenciação do papel da anestesia propriamente dito no desenvolvimento de ILC em relação ao tempo total de cirurgia pode ser difícil, no entanto sabe-se que a anestesia geral aumenta o risco de desenvolvimento de infecção comparativamente com a sedação (Gehlen *et al.*, 2023). De forma geral a anestesia está associada a diversos efeitos no organismo, incluindo a diminuição da temperatura corporal, impactos no sistema imunitário e hipotensão (Singh & Weese, 2018). A duração da anestesia geral aumenta significativamente o risco de ILC, segundo Pratesi *et al.* (2015), o risco de ILC aumenta 2% por cada minuto adicional de anestesia. Por este motivo é recomendado um plano que limite o tempo anestésico para cada procedimento e ainda, deve ser minimizado o tempo anestésico que não é dedicado à cirurgia (Lyssens *et al.*, 2019).

É, igualmente importante referir que, além das alterações imunes provocadas pelos anestésicos voláteis, a incidência de ILC pode surgir pela utilização de fármacos contaminados, como o propofol (Välkki *et al.*, 2020) – o propofol pode encontrar-se contaminado pelo corpo médico, particularmente porque é utilizado para diversos pacientes (Fossum, 2019).

O ambiente da sala cirúrgica inclui diversos aspetos a serem considerados, nomeadamente as condições de ventilação, disposição da sala cirúrgica e condições dos materiais e instrumentos utilizados, visto que estes fatores constituem fontes de microrganismos com potencial para desencadear ILC (Suranigi, *et al.*, 2021).

Relativamente à ventilação, deve ser desenhada de forma a fornecer no total 15 mudanças de ar por hora. O bloco operatório deve estar desenhado com superfícies facilmente laváveis e com o mínimo de superfícies abertas horizontais como prateleiras. Os instrumentos devem-se encontrar devidamente esterilizados e acondicionados (Fossum, 2019).

No caso do corpo cirúrgico, devem-se encontrar devidamente equipados com a paramentação (fato, luvas e máscara) estéril durante todo o procedimento cirúrgico. O número de pessoas que se encontra dentro do bloco operatório deve ser limitado apenas aos elementos necessários (Gehlen *et al.*, 2023) pois, o aumento do trânsito de pessoal constitui uma fonte de microrganismos aerogenos visto que diminui a eficácia dos sistemas de ventilação pelo movimento e abertura das portas.

2.5.1.1.3. Fatores pós-cirúrgicos

Diversos autores, Gehlen *et al.* (2023), Lyssens *et al.* (2019) e Pratesi *et al.* (2015), indicam que um período prolongado de hospitalização predispõe a desenvolvimento de ILC, uma vez que potencia a colonização com microrganismos.

Após o procedimento, o local cirúrgico deve ser protegido com pelo menos um penso simples de forma a constituir uma barreira estéril e impermeável a possíveis fontes de contaminação (Lyssens *et al.*, 2019).

Pratesi *et al.* (2015), salientam a importância de manter o paciente numa zona confinada, optar por passeios curtos até ao seguimento radiográfico que normalmente decorre entre as seis e oito semanas após o procedimento. Durante este período, o paciente e os respetivos locais cirúrgicos devem ser avaliados para a presença de sinais compatíveis com ILC aos 7 e 30 dias após o procedimento cirúrgico (Stetter *et al.*, 2021).

2.5.2. Profilaxia com antibióticos

A profilaxia antimicrobiana em cirurgia refere-se à administração de antibióticos na proximidade do procedimento cirúrgico de forma a prevenir uma infeção não estabelecida (Lyssens *et al.*, 2019). A administração perioperatória de antibióticos constitui uma medida preventiva com o objetivo de reduzir a incidência de ILC (Singh & Weese, 2018). A sua utilização é recomendada, principalmente para procedimentos com risco acrescido de infeção ou quando a infeção pós-operatória origina consequências graves para o sucesso cirúrgico, como a colocação de implantes metálicos em COL (Gonzalez *et al.*, 2017; Singh & Weese, 2018).

Para maximizar o sucesso profilático devem ser avaliados os diversos fatores que contribuem para a sua falha, nomeadamente dose e frequência de administração incorretas, via de administração e duração de tratamento inadequados, tipo de antibiótico utilizado, presença de material estranho ao organismo (implante cirúrgico), presença de resistência bacteriana, hospedeiro imunodeprimido (doença concomitante ou terapia imunossupressora), farmacocinética do fármaco, interações medicamentosas (Fossum, 2019). Para isso tem de ser definido, o tipo de fármaco a administrar, o tempo de administração ótimo, frequência e dose de fármaco eficazes, bem como a definir a duração total da profilaxia (Williams, 2018).

2.5.2.1. Tipo de antibiótico

O antibiótico a utilizar deve ser eficaz contra os microrganismos espectáveis de serem identificados em COL. De forma geral, os microrganismos responsáveis por provocar ILC cirúrgico pertencem à microbiota comensal, isto é, cocci Gram - positivos como *S. aureus* e *S. Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus spp.* e bacilos Gram - negativos, Enterobacterales como *E. coli* (Dhammi, Ul Haq, & Kumar, 2015; Lyssens *et al.*, 2019). Normalmente são utilizados antibióticos da classe dos β -lactâmicos como as cefalosporinas. Segundo diversos autores, Allerton *et al.* (2021), Lyssens *et al.* (2019), e Vålkkki *et al.* (2020), a cefazolina é aconselhada uma vez que não só é eficaz contra estes microrganismos como também, é segura, apresenta baixa toxicidade, custo reduzido e boa penetração óssea permitindo um equilíbrio rápido entre o plasma e a ferida cirúrgica com concentrações elevadas no tecido ósseo e articular (Chou *et al.*, 2020).

2.5.2.2. Dose e tempo de administração

Para que a profilaxia com antibióticos seja eficaz é necessária uma concentração adequada da molécula no local de intervenção cirúrgica, no momento da incisão e durante todo o procedimento. Por este motivo, segundo Dhammi *et al.* (2015), é recomendada a utilização de antibióticos pertencentes à classe dos β -lactâmicos como as penicilinas e cefalosporinas pois são grupos de fármacos tempo-dependentes, ou seja, a sua eficácia está correlacionada com o período de tempo em que a concentração de antibiótico se mantém superior à CMI.

De forma a obter um protocolo eficaz, a concentração do fármaco terá de exceder a CMI no local cirúrgico desde a primeira incisão até ao encerramento da ferida cirúrgica para impedir o crescimento bacteriano e permitir ao sistema imunitário do hospedeiro controlar a possível infeção (Aiken *et al.*, 2015). Assim, o momento da primeira administração é crucial para garantir uma concentração adequada de antibiótico. De acordo com Gonzalez *et al.* (2017), e Singh & Weese (2018), a re-administração de antibióticos tempo-dependentes deve ser realizada a cada 2 semi-vidas durante a cirurgia para manter a concentração sérica alvo. Vários estudos, Allerton *et al.* (2021), Gonzalez *et al.* (2017), Lyssens *et al.* (2019), Stetter *et al.* (2021), e Vålkkki *et al.* (2020), indicam que a primeira administração deve ser realizada entre 30 a 60 minutos antes da primeira incisão de pele. A concentração do antibiótico no sangue e osso ocorre normalmente 20 a 60 minutos, respetivamente e têm de ser mantidas acima da CMI dos microrganismos potencialmente causadores de infeção até ao encerramento da pele. A

administração superior a 60 minutos antes do procedimento aumenta a probabilidade de ILC pois o tempo de semi-vida das cefalosporinas é curto (Dhammi *et al.*, 2015).

Relativamente à dose e via de administração a utilizar, Gonzalez *et al.* (2017), realizaram um estudo que permitiu a comparação dos níveis séricos e fluido intersticial de cefazolina administrada por via endovenosa e administrada simultaneamente por via endovenosa e intramuscular a uma dose de 22mg/Kg. Uma vez que a concentração de cefazolina no fluido intersticial é semelhante à sua concentração no plasma devido ao rápido equilíbrio desta entre tecidos e soro numa ferida cirúrgica, concluíram que a administração de cefazolina a 22mg/Kg por via endovenosa aplicada 30 a 60 minutos antes da cirurgia deve manter uma concentração de fluido intersticial acima da CMI necessária para inibição de 90% dos microrganismos presentes em animais de companhia submetidos a procedimentos cirúrgicos. É ainda de salientar que a via endovenosa garante concentrações rápidas e elevadas do agente antibiótico na ferida cirúrgica (Lyssens *et al.*, 2019).

Välkki *et al.* (2020), avaliaram a taxa de ILC em animais submetidos a diversos procedimentos ortopédicos limpos (n=406) e com a implementação de um protocolo profilático de cefazolina por via endovenosa a 22mg/Kg com administração entre 30 a 60 minutos antes do início do procedimento e com re-administração a cada 90 minutos. Concluíram que o protocolo é eficaz para reduzir a prevalência de ILC para níveis aceitáveis (6,3%) em COL.

2.5.2.3. Duração da profilaxia com antibióticos

A duração mínima da cobertura com antibióticos deve incluir o tempo desde a primeira incisão até ao encerramento da ferida cirúrgica (Dhammi *et al.*, 2015). Contudo, a duração da profilaxia é um assunto controverso e com discrepâncias de opiniões entre médicos e cirurgiões veterinários (Pratesi *et al.*, 2015). De acordo com o CDC, é recomendado que este tipo de profilaxia seja inferior a 24 horas após o fim do procedimento cirúrgico, uma vez que o seu prolongamento pode induzir o desenvolvimento de RAM, aumentar as interações idiossincráticas originando um maior risco de ocorrência de infeções nosocomiais, danos hepáticos e/ou renais, originar distúrbios gastrointestinais e aumentar custos desnecessários (Dhammi *et al.*, 2015; Välkki *et al.*, 2020). Para além disso, a probabilidade dos microrganismos, que sobrevivem à terapia inicial, serem responsivos ao antibiótico pelo prolongamento do tratamento é baixa (Singh & Weese, 2018). Por estes motivos, a terapia com antibióticos pós-cirúrgica a longo termo apresenta um efeito limitado ou até mesmo

contraproducente pelo que não é recomenda prolongar a sua administração por mais de 24 horas após o procedimento cirúrgico (Lyssens *et al.*, 2019; Singh & Weese, 2018;).

Num estudo publicado por Aiken *et al.* (2015), os autores avaliaram e compararam o impacto do prolongamento da profilaxia com antibióticos até ao período pós-operatório em 400 cães submetidos a COL. Neste estudo, a incidência de ILC foi 5.24% e de 3.54% para o grupo apenas com toma de antibiótico profilático e a combinação de antibiótico profilático e antibiótico pós-operatório, respetivamente. Concluíram que as taxas de ILC não obtiveram diferença estatística significativa. Assim, a administração de antibiótico profilático parece ser suficiente para prevenir ILC.

No estudo publicado por Välikki *et al.* (2020), concluíram, que a suspensão de antibiótico no período pós - cirúrgico não esteve associada ao aumento do risco de ILC e que a implementação de outras medidas como a antisepsia rigorosa, técnica cirúrgica adequada, anestesia equilibrada são vitais para a prevenção de ILC.

Num estudo realizado por Hagen *et al.* (2020), em cães submetidos a TPLO, verificaram prevalência de ILC em 6,6% dos pacientes que receberam terapia antibiótica pós-cirúrgica face aos pacientes que não receberam qualquer antibiótico (20,1%). Concluíram que a administração de antibiótico pós-operatório apresenta efeito protetor contra a ILC. No entanto, salientam que não verificaram associação estatística com períodos prolongados de terapia e desenvolvimento de ILC, por essa razão, é incerto se de facto é necessário prolongar a profilaxia ou se esta pode ser restrita a um período de 24 horas, tal como é recomendado em medicina humana e veterinária. Apesar destes resultados, os autores ressaltam que o risco deve ser devidamente avaliado e quando o período de risco cessa, o uso de antibióticos é desnecessário pois leva a efeitos adversos, aumento dos custos e a RAM.

2.5.2.4. Recomendações e estratégias

A ILC é uma ameaça presente em medicina veterinária pelo que é importante definir medidas para controlar e reduzir a sua incidência e impacto pelo que o conhecimento da prevalência dos fatores de risco é importante para esse efeito (Turk *et al.*, 2015).

O uso profilático de antibióticos no peri-operatório deve ser realizado como adjuvante e nunca com o fim de substituir a preparação rigorosa e técnica cirúrgica meticulosa (Singh & Weese 2018) uma vez que os princípios da assepsia e utilização de técnica cirúrgica adequada permitem a redução da incidência de ILC (Aiken *et al.*, 2015; Williams *et al.*, 2018). Além disso, a utilização inapropriada ou indiscriminada de antibióticos pode originar:

microrganismos resistentes a determinadas classes de fármacos, incluindo microrganismos MDR, aumento do risco de infecções nosocomiais e de custos hospitalares (Gonzalez *et al.*, 2017).

É necessário aumentar a consciencialização para a problemática de RAM através de comunicação, educação e treino eficientes (Sternberg-Lewerin *et al.*, 2022). Uma das medidas fundamentais é definir diretrizes de gestão antimicrobiana, pois representa uma ferramenta importante para auxiliar os médicos veterinários a otimizar o uso de antibióticos com o objetivo de diminuir a RAM (Allerton *et al.*, 2021).

Em Países nórdicos a prevalência de RAM são das mais baixas na Europa (Sternberg-Lewerin *et al.*, 2022). Diversas faculdades de medicina veterinária da Finlândia, Noruega e Suécia criaram um programa *Nordic Vets Against Antimicrobial Resistance* com o objetivo de permitir aos médicos veterinários da região de partilhar conhecimento e experiências e de forma a ultrapassar este desafio. Existem atualmente diretrizes publicadas por diversos países nórdicos que têm como objetivo promover a importância de uma assepsia rigorosa. Ressalvam que a profilaxia não é necessária para animais com classificação ASA I e II ou para pacientes ASA III apiréticos que são sujeitos a procedimentos limpos ou limpo-contaminados (Jessen *et al.*, 2019). Salientam a importância da identificação de fatores de risco, pois indicam que pacientes de baixo risco não necessitam de profilaxia antimicrobiana em procedimentos ortopédicos limpos mesmo em casos em que ocorra a colocação de implantes ou próteses articulares (Bergvall, Greko, Larsson, Mannerfelt, Odensviks, 2009). Não aconselham a re-administração de antibióticos profiláticos em procedimentos cirúrgicos limpos que apresentem duração inferior a 60 minutos.

A presente dissertação teve como objetivo perceber se a colonização com Enterobacterales produtoras de ESBLs/*pAmpC* representa um fator de risco para o desenvolvimento de ILC em COL. Para esse efeito foi desenhado um estudo prospetivo longitudinal.

3. Material e Métodos

3.1. Delineamento experimental

Durante o período de fevereiro a junho de 2023, foram recolhidas amostras fecais de animais de companhia submetidos a COL, em três Centros de Atendimento Médico-Veterinários (CAMVs) distintos da região de Lisboa.

De modo a proceder a uma recolha de dados completa e sistemática foi elaborado um questionário (anexo F: figura F1) onde se realçou diversos parâmetros demográficos como: idade, sexo, peso, espécie, administração prévia de antibióticos (até 12 meses antes) ou fármacos imunossupressores, bem como parâmetros cirúrgicos: tipo de procedimento, implante, fármacos utilizados na anestesia, tipo de panos de campo utilizados, temperatura e pressão intracirúrgica do paciente, duração do procedimento e anestesia.

Foram incluídos neste estudo todos os animais (cães e gatos) que se apresentaram para COL planeada. Os critérios de exclusão para este estudo foram: fraturas expostas e animais sem seguimento após 7, 30 e 90 dias do procedimento cirúrgico.

A antissepsia cirúrgica foi realizada com uma combinação de clorexidina a 2% e álcool isopropílico a 70% (Braun®).

O protocolo profilático consistiu na administração de cefazolina (22mg/Kg) por via endovenosa 30 a 60 minutos antes da primeira incisão cirúrgica. A administração do antibiótico foi repetida nas cirurgias que se prolongaram por mais de três horas (Gonzalez *et al.*, 2017). Após o procedimento, a administração de cefazolina foi mantida a uma dose de 22mg/Kg a cada 8 horas por uma duração máxima de 24 horas.

Em todos os animais incluídos neste estudo foi recolhida uma zaragatoa fecal antes da administração do antibiótico profilático, obtendo-se desta forma um total 64 amostras.

As amostras foram recolhidas com uma zaragatoa estéril posteriormente incorporada num tubo de transporte com meio AMIES (Deltalab®), todas elas devidamente identificadas com nome do animal, data e local de recolha e acompanhadas do questionário individual. As amostras foram refrigeradas a $4 \pm 1^\circ\text{C}$ até serem processadas.

Todos os pacientes foram sujeitos a vigilância ativa através de seguimentos presenciais no respetivo hospital veterinário ou por contacto telefónico aos 7 e 30 dias pós-cirúrgico. Aos 90 dias foram realizadas radiografias para observação de sinais compatíveis com ILC caso o tutor o permitisse. O diagnóstico de ILC foi baseado nos seguintes critérios (Aiken *et al.*, 2015):

- (i) Presença de conteúdo purulento ou seropurulento na incisão;
- (ii) Deiscência espontânea ou formação de abscesso na região da incisão;

- (iii) Presença de pelo menos um dos sinais seguintes: edema localizado, dor, local, eritema, pirexia ($>39^{\circ}\text{C}$);
- (iv) Sinais radiográficos compatíveis com osteomielite.

Se durante o seguimento fosse observada suspeita de ILC, coletar-se-ia uma amostra da ferida cirúrgica e esta seria enviada para análise laboratorial com pedido de TSA.

Este projeto foi submetido e aprovado com parecer favorável pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal (16-2022).

3.2. Processamento laboratorial das amostras

As zaragatoas fecais foram inoculadas pelo método de estrias em três placas de petri com meios distintos: MacConkey Agar (McK) (Biokar Diagnostics®), McK suplementado com CTX na concentração de $1\mu\text{g/ml}$ e McK suplementado com meropenem (MEM) na concentração de $1,5\mu\text{g/ml}$. De seguida as zaragatoas foram colocadas em 5 ml de meio de enriquecimento (água Peptonada - Biokar Diagnostics®, França). Após todas as sementeiras, as placas inoculadas foram devidamente identificadas e colocadas na estufa a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24-48h. As colónias presentes nas placas foram interpretadas quanto à morfologia e reações químicas com meio de cultura. Após a identificação presuntiva das colónias de interesse, estas foram conservadas com meio *Brain-Heart-Broth* (BHIB, Biokar Diagnostics®) com 20% de glicerol e armazenadas a -80°C . É importante salientar que apenas foram armazenadas as colónias puras obtidas dos meios McK suplementado com CTX e MEM.

3.2.1. Identificação de Enterobacterales resistentes às C3G e carbapenemos

Os isolados de Enterobacterales resistentes às C3G previamente conservados em BHIB + 20% de glicerol foram inoculadas em meio agar sangue Columbia 5% sangue de Carneiro (BIOGERM, SA®) e colocadas na estufa a $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas de forma a obter colónias puras e viáveis para posterior extração de DNA, para confirmação das espécies identificadas pelo método de PCR, realização do TSA e determinação de genes de resistência por PCR. A extração de DNA total foi realizada utilizando o método de fervura adaptado de (Pomba *et al.*, 2006). Esta técnica permite a lise das membranas celulares através do calor e dos ciclos de centrifugação. Resumidamente, uma suspensão da cultura bacteriana em questão foi preparada em $100\mu\text{L}$ de água MilliQ e foi submetida à lise pelo calor, mantendo-a a 100°C durante 15 minutos. O sobrenadante resultante após a centrifugação foi armazenado a -20°C para posterior realização da técnica de PCR.

3.2.1.1. *E. coli* e respetivos grupos filogenéticos

As amostras cuja interpretação presuntiva resultou em *E. coli* foram submetidas a um PCR para confirmação e posterior identificação do grupo filogenético principal em que cada uma delas estava inserida (A, B₁, B₂ e D). Para a PCR utilizou-se água MiliQ, enzima Supreme Taq (Supreme NZYTaq II 2x Green Master Mix, Nzytech, Lisboa, PT), os Oligonucleótidos iniciadores (OI) correspondentes (tabela 1) e a amostra de DNA em estudo. Em cada reação foram incluídos controlos positivos [(*E. coli* ATCC 25929, FMV-ULusófona1027 (B₂), FMV-ULusófona1591/23 (B₁)] e um controlo negativo (água Milli-Q®).

Tabela 1 – OI utilizados para a identificação dos grupos filogenéticos de *E. coli*

Nome	Direção dos primers	Sequência	Pares de bases do produto	Referência
<i>gadA</i>	Forward	5'-GATGAAATGGCGTTGGCGCAAG-3'	373 pb	Doumith, <i>et al.</i> , 2012.
	Reverse	5'-GGCGGAAGTCCCAGACGATATCC-3'		
<i>chuaA</i>	Forward	5'-AAACGCGCTCGCGCCTAAT-3'	288 pb	
	Reverse	5'-AAACGCGCTCGCGCCTAAT-3'		
<i>yjaA</i>	Forward	5' TGTTCGCGATCTTGAAAGCAAACGT-3'	211 pb	
	Reverse	5'-GCGGGTGAGACAGAAACGCG-3'		
TspE4.C2	Forward	5'-GCGGGTGAGACAGAAACGCG-3'	152 pb	
	Reverse	5'-TTGTCGTGAGTTGCGAACCCG-3'		

Através da utilização de PCR multiplex é possível definir um isolado de *E. coli* nos quatro filogrupos principais (A, B₁, B₂ e D). O protocolo consiste na deteção de dois genes distintos – o *chuA* e *yjaA* e o fragmento de DNA TspE4.C2 (Clermont *et al.*, 2013; Clermont, Condamine, Dion, Gordon & Denamur, 2021).

O gene *chuA* codifica proteínas de ligação ao grupo heme presentes na membrana externa presente em determinadas estirpes de *E. coli* integrando o sistema de transporte de ferro (Spurbeck *et al.*, 2012). O gene *yjaA* é responsável pela resposta celular em condições de desfavoráveis: medeia a resposta celular a alterações de pH, presença de peróxido de hidrogénio e formação de biofilmes (Alshaikh, El-Banna, Sonbol & Farghali, 2024; Lee, Hiibel, Reardon & Wood, 2010).

O fragmento TspE4.C2 é responsável pela codificação de enzimas lipase esterase o que permite uma vantagem competitiva por tornar o meio menos favorável a outros microrganismos ou tornar o meio favorável à formação de biofilmes.

Através da análise da presença ou ausência destes genes numa determinada estirpe de *E. coli* permite a classificação pelos diferentes grupos (Clermont *et al*, 2013; Clermont *et al.*, 2021) (anexo G: figura G1).

Para a realização do PCR utilizou-se o termociclador (Biometra TOne Series, Analytik jena Alemanha). O programa utilizado para a amplificação dos genes presentes em cada amostra foi o descrito por Doumith, Day, Hope, Wain & Woodforda (2012). A temperatura de hibridação utilizada foi de 65°C durante 30 segundos.

Os produtos de PCR obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose (NZYtech, Lisboa, Portugal) a 2 % (p/v) em tampão tris- borato-EDTA 1X (TBE, Nzytech, Portugal). Para visualização dos produtos de PCR foi utilizado um agente intercalante (GreenSafe Premium, Nzytech, Portugal). Em cada corrida, foram adicionados 5 µL de cada produto de reação e 5 µL do marcador de peso molecular NZYDNA Ladder V 50-1000pb (NZYtech, Portugal). A corrida de eletroforese foi realizada durante 60 minutos a 90V. Os produtos de PCR foram visualizados utilizando um transluminador ultravioleta (UView TM Mini Tansilluminator, Bio-Rad, França).

3.2.1.2. *Klebsiella pneumoniae*

As amostras cujo resultado presuntivo resultou em *Klebsiella* spp., foram submetidas a um PCR para confirmação e identificação da espécie. Os OI utilizados para a identificação da espécie *K. pneumoniae*, através da amplificação do gene *fimK*, encontram-se representados na tabela 2. Para a realização do PCR utilizou-se o termociclador (Biometra TOne Series, Analytik jena Alemanha). Para a identificação de *K. pneumoniae* foi seguido o protocolo descrito por Padmavathy *et al.*, 2012), com uma temperatura de hibridação de 54°C durante 55 segundos.

Os produtos de PCR obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose tal como descrito no ponto 3.2.1.1.

Tabela 2 – OI utilizados para a identificação de *K. pneumoniae*

Nome	Direção dos primers	Sequência	Pares de bases do produto	Referência
<i>fimK</i>	Forward	5'- TGCTCTATCAGGTGAGTCAT-3'	746 pb	Padmavathy, <i>et al.</i> , 2012.
	Reverse	5'- AAAATCGATAGTTTCAGCAT-3'		

3.2.1.3. Identificação de *Enterobacter cloacae*

Para confirmação do isolado de *E. cloacae* foi realizada a identificação por sistema automatizado de identificação microbiana por espectrometria de massa [*Matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI-TOF)] (Biomerieux, Portugal) em laboratório externo.

3.2.2. Teste de sensibilidade a antibióticos

O TSA foi realizado para os isolados bacterianos obtidos das placas de McK suplementadas com CTX (1µg/ml) e McK com MEM (1.5 µg/ml). O meio de cultura utilizado foi o Müller-Hinton Agar (Biokar Diagnostics®) recomendado pela EUCAST e CLSI. Para cada isolado obtido e confirmado quanto à espécie estes foram testados quanto à suscetibilidade aos antibióticos pelo método de DD.

Após a sementeira numa suspensão com o grau 0,5 da escala de McFarland, correspondente a uma concentração bacteriana entre $1 - 2 \times 10^8$ UFC/ml, em placas de Müller-Hinton Agar (Biokar, Beauvais, França) de colónias de cultura pura dos vários isolados, foram aplicados os seguintes discos de antibióticos (Oxoid, Hampshire, Reino Unido): amoxicilina/ácido clavulânico (AMC) 30µg, ampicilina (AMP) 10µg, CTX 30µg, CAZ 30µg, FEP 30µg, cefoxitina (FOX) 30µg, MEM 10µg, imipenem (IMP) 10µg, ertapenem (ERT) 10µg; enrofloxacin (ENR) 5µg, levofloxacin (LEV) 5µg, ciprofloxacin (CIP) 5µg, ácido nalidixico (NA) 30µg, gentamicina (CN) 10µg, amicacina (AK) 30µg, fosfomicina (FOS) 200µg, tetraciclina (TE) 30µg, trimetropim/sulfametoxazole (SXT) 25µg, cloranfenicol (C) 30µg e nitrofurantoína (F) 300µg.

A colocação dos discos de antibióticos foi realizada de acordo com a figura 5.



Figura 5 – Distribuição dos discos de antibiótico pelas placas Müller-Hinton Agar para realização de teste de sensibilidade a antibióticos pelo método de DD. Original do autor.

Posteriormente as placas foram incubadas à temperatura de $37 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 18-24 horas. Para a interpretação dos resultados recorreu-se às diretrizes publicadas pelo CLSI (2024)

e, quando os critérios não estavam disponíveis para animais de companhia, usou-se os critérios clínicos para humanos do CLSI (2024). A estirpe *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como estirpe de referência para realização do TSA.

A MDR foi definida como resistência a pelo menos três classes de antibióticos tal como proposto anteriormente por Magiorakos *et al.* (2012).

3.2.3. Identificação de genes de resistência aos β-lactâmicos

Após a confirmação da espécie de cada uma das amostras e da realização do TSA, estas foram submetidas à pesquisa dos genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA}, *bla*_{DHA}, *bla*_{CMY}. Para todas as reações de PCR utilizou-se água MiliQ, enzima Supreme Taq (Supreme NZYTaq II 2x Green Master Mix, Nzytech, Lisboa, PT), os OI correspondentes e a amostra de DNA em estudo. Para a realização de todas as PCR utilizou-se o termociclador (Biometra TOne Series, Analytik jena Alemanha). Todos os produtos de PCR obtidos foram analisados por eletroforese em gel de agarose tal como descrito no ponto 3.2.1.1.

3.2.3.1. Detecção do gene *bla*_{CTX-M}

Permite avaliar a presença de genes que conferem resistência às C3G pela produção de cefotaximases. As amostras positivas foram avaliadas quanto à presença dos dois subgrupos mais prevalentes: *bla*_{CTX-M-1} e *bla*_{CTX-M-9}. Os OI utilizados para a amplificação dos genes *bla*_{CTX-M-geral} e os subgrupos *bla*_{CTX-M-1} e *bla*_{CTX-M-9} encontram-se descritos na tabela 3. Relativamente ao programa utilizado para a amplificação do grupo CTX-M seguiu-se o protocolo descrito por Edelstein, Pimkin, Palagin, Edelstein & Stratchounski (2003), utilizando uma temperatura de hibridização de 57°C durante 2 minutos. No caso específico dos subgrupos CTX-M-1 e CTX-M-9 foi seguido o programa descrito por Woodford, Fagan & Ellington (2006).

Tabela 3 – OI utilizados para a identificação do gene *bla*_{CTX-M}

Nome	Direção dos primers	Sequência	Pares de bases do produto	Referência
CTX-M-geral	Forward	5'-TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA-3'	544 pb	Edelstein, <i>et al.</i> , 2003
	Reverse	5'-CGATATCGTTGGTGGTGCCATA-3'		
CTX-M-1	Forward	5'-AAAAATCACTGCGCCAGTTC-3'	415 pb	Woodford <i>et al.</i> , 2006
	Reverse	5'-AGCTTATTCATCGCCACGTT-3'		
CTX-M-9	Forward	5'-CAAAGAGAGTGCAACGGATG-3'	205 pb	Woodford <i>et al.</i> , 2006
	Reverse	5'-ATTGGAAGCGTTCATCACC-3'		

3.2.3.2. Detecção dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{OXA-1}

Os genes *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} quando presentes conferem resistência a penicilinas e cefalosporinas de primeira bem como algumas de segunda geração.

Relativamente ao *bla*_{OXA-1}, permite que a bactéria seja resistente às oxacilinas e cefalosporinas de primeira geração (cefazolina e cefalexina). Os OI utilizados para a amplificação do *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{OXA-1} encontram-se descritos na tabela 4. Foram realizados diferentes PCRs para o estudo de cada gene. O programa utilizado para a amplificação dos genes *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} encontra-se descrito por Colom *et al.* (2003). O protocolo para *bla*_{OXA-1} está descrito por Féria *et al.* (2002). As temperaturas de hibridização utilizadas foram 72°C durante 1 minuto, 56°C durante 1 minuto e 65°C durante 30 segundos, respetivamente.

Tabela 4 – OI utilizados para a identificação do gene *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{OXA-1}

Nome	Direção dos primers	Sequência	Pares de bases do produto	Referência
TEM	Forward	5'-ATTCTTGAAGACGAAAGGGC-3'	1092 pb	Colom <i>et al.</i> , 2003
	Reverse	5'-ATGAGTAAACTTGGTCTGAC-3'		
SHV	Forward	5'-CGCTTCCTTACTCGCCTTTA-3'	910 pb	Colom <i>et al.</i> , 2003
	Reverse	5'- TTACGCTTGCCAGTGCTC-3'		
OXA-1	Forward	5'- TATCTACAGCAGCGCCAGTG-3'	199 pb	Féria <i>et al.</i> , 2002
	Reverse	5'- CGCATCAAATGCCATAAGTG-3'		

3.2.3.3. Detecção dos genes *bla*_{DHA}, *bla*_{MOX}, *bla*_{CIT}, *bla*_{ACC}, *bla*_{FOX}, *bla*_{EBC} e *bla*_{CMY}

Estes genes codificam a resistência às cefamicinas, cefalosporinas de 1^a, 2^a e 3^a geração e aztreonam. Com o objetivo de detetar bactérias produtoras de *pAmpC* foram estudados os genes: *bla*_{DHA}, *bla*_{MOX}, *bla*_{CIT}, *bla*_{ACC}, *bla*_{FOX}, *bla*_{EBC} e *bla*_{CMY}. Para isso elaborou-se um PCR multiplex realizado de acordo com Pérez-Pérez, & Hanson (2002). Os OI utilizados encontram-se representados na tabela 5 utilizando uma temperatura de hibridização de 65°C durante 30 segundos.

Tabela 5 – OI utilizados para a identificação dos genes através de PCR multiplex

Nome	Direção dos primers	Sequência	Pares de bases	Referência
CIT	<i>Forward</i>	5'- CACATTGACATAGGTGTGGTGC-3'	462 pb	Pérez-Pérez & Hanson (2002)
	<i>Reverse</i>	5'-TGGCCAGAACTGACAGGCAAA-3'		
DHA	<i>Forward</i>	5'- TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC-3'	405 pb	
	<i>Reverse</i>	5'- AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT-3'		
ACC	<i>Forward</i>	5'- CCGTACGCATACTGGCTTTGC-3'	346 pb	
	<i>Reverse</i>	5'- AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA-3'		
EBC	<i>Forward</i>	5'- TTCGCCGCAATCATCCCTAGC -3'	302 pb	
	<i>Reverse</i>	5'- TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG-3'		
FOX	<i>Forward</i>	5'- AACATGGGGTATCAGGGAGATG-3'	190 pb	
	<i>Reverse</i>	5'- CAAAGCGCGTAACCGGATTGG-3'		

Caso a família *bla*_{CIT} fosse positiva para uma determinada amostra, elaborou-se um PCR adicional para a detecção do *bla*_{CMY-2} (tabela 6). Os parâmetros utilizados foram baseados no protocolo descrito por Belas *et al.* (2014). Sendo que a temperatura de hibridização utilizada foi de 59°C durante 5 minutos.

Tabela 6 – OI utilizados para a identificação do gene *bla*_{CMY-2}

Nome	Direção dos primers	Sequência	Pares de bases	Referência
CMY	Forward	5' - ATGATGAAAAAATCGTTATGC-3'	1146 pb	Belas <i>et al.</i> , 2014
	Reverse	5'- TTATTGYAGCTTTTCAAGAATGC-3'		

3.2.3.4. Detecção dos genes *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{BIC}

Estes genes conferem às bactérias a capacidade de resistência aos carbapenemos pela produção de carbapenemases.

Para o estudo destes genes foi realizado PCR multiplex utilizando os oligonucleótidos descritos na tabela 7.

As condições (binómio tempo/temperatura) de PCR utilizadas foram adaptadas do trabalho desenvolvido pelos autores Poirer, Walsh, Cuvillier & Nordmann (2011). A temperatura de hibridação utilizada foi 52°C durante 40 segundos.

Tabela 7 – OI utilizados para a identificação dos genes codificadores de carbapenemases

Nome	Direção dos primers	Sequência	Pares de bases	Referência
KPC	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	5' - CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG-3' 5'- CTTGTCATCCTTGTTAGGCG-3'	798 pb	Poirer <i>et al.</i> , 2011
NDM	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	5'- GGTTTGGCGATCTGGTTTTC-3' 5'- CGCAATGGCTCATCACGATC-3'	621 pb	
BIC	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	5'- TATGCAGCTCCTTTAAGGGC-3' 5'-TCATTGGCGGTGCCGTACAC -3'	537 pb	
OXA-48	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	5'- GCGTGGTTAAGGATGAACAC-3' 5'- CATCSSGTTCAACCCAACCG-3'	438 pb	

3.2.3.5. Purificação dos produtos amplificados e Sequenciação

Neste trabalho foram sequenciados os genes dos isolados que apresentavam resistência às C3G e carbapenemos. Os produtos de PCR foram purificados recorrendo ao sistema de purificação NZYgelpure (NZYtech, Lisboa, Portugal) de acordo com as instruções do fabricante. Os produtos de PCR purificados foram sequenciados na empresa STAB VIDA (Caparica, Portugal).

3.3. Análise estatística

A análise estatística foi realizada recorrendo ao programa informático Jamovi, versão 2.5.3 (<https://www.jamovi.org>). Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão, ou medianas e percentagens (%). Para analisar as diferenças estatísticas a nível do desenvolvimento de resistências entre o grupo de animais que tomaram antibiótico até 12 meses antes das recolhas de amostras fecais face ao grupo que não tomou foi realizado o teste de Mann-Whitney.

Com o objetivo de estudar a correlação entre o grupo de animais em que foi prescrito antibiótico até 12 meses antes da recolha das amostras fecais, com o desenvolvimento de resistências, recorreu-se ao Coeficiente de Spearman.

O nível de significância foi definido para $p < 0,05$.

4. Resultados

Neste estudo, foram obtidas no total 64 zaragatoas fecais de animais de companhia (cães e gatos) submetidos a COL. A maioria dos animais neste estudo eram da espécie canina e de tutores privados. Os dados relativamente à espécie, raça, origem e sexo podem ser observados na tabela 8.

Tabela 8 – Caracterização da amostra quanto à espécie, raça, origem e sexo.

	n	%
Espécie		
Canina	59/64	92,2%
Felina	5/64	7,8%
Raça		
Pura	45/64	70,3%
SRD	19/64	29,7%
Tutor		
Privado	55/64	85,9%
Abrigo	7/64	10,9%
s/d	2/64	3,1%
Sexo		
FI	10/64	15,6%
FC	19/64	29,7%
MI	11/64	17,2%
MC	13/64	20,3%
s/d	11/64	17,2%

Legenda: FI: fêmea castrada; FC: fêmea inteira; MC: macho castrado; MI: macho inteiro; s/d: sem dados.

A idade, dias de hospitalização, duração do procedimento cirúrgico e anestesia representaram dados bastante variáveis. O antibiótico mais comumente prescrito correspondeu a amoxicilina com ácido clavulânico. A maioria dos animais integrantes do estudo obtiveram classificação ASA I. Em termos de procedimento a maioria necessitou de colocação de implantes metálicos e o procedimento mais comum correspondeu a TPLO.

Os dados correspondentes à idade, hospitalização prévia, prescrição de antibiótico, duração do procedimento cirúrgico, anestesia, protocolo de pré-medicação, indução anestésica, classificação ASA, anestesia loco-regional, tipo de panos de campo utilizados e procedimento cirúrgico, presença de implantes metálicos, ocorrência de hipotermia e hipotensão intra-cirúrgica, encontram-se descritos na tabela 9.

Tabela 9 – Fatores de risco estudados

Variáveis	n	%	Média ± Desvio padrão	Intervalo
Idade (anos)	-	-	4,6 ± 3 anos	5 meses - 12 anos
Hospitalização (dias)				
Sim	9/64	14,1%	5,6 ± 6 dias	1 - 30 dias
Não	55/64	85,9%		
Duração P.Cx (min)	-	-	81 ± 40 min	30 - 180 min
Duração anestésica (min)	-	-	132 ± 50 min	50 a 240 min
AB (até 12 meses) (dias)				
Sim	17/64	26,6%	99 ± 123 dias	1 - 365 dias
AMC	10/17	58,8%		
Cefazolina	2/17	11,8%		
AMC + Cefazolina	1/17	5,9%		
Metronidazol	1/17	5,9%		
s/d	3/17	17,6%		
Não	47/64	73,4%	-	-
P. Med anestésica				
Dex + opioide	43/64	67,2%	-	-
Dex + opioide + K	9/64	14,1%	-	-
Dex + opioide + AINES	4/64	6,3%	-	-
Midazolam + opioide	2/64	3,1%	-	-
s/d	6/64	9,4%	-	-
Indução anestésica				
Propofol	60/64	93,8%	-	-
Alfaxalona	4/64	6,3%	-	-
ASA				
I	28/64	43,8%	-	-
II	27/64	42,2%	-	-
III	3/64	4,7%	-	-
IV	2/64	3,1%	-	-
s/d	4/64	6,3%	-	-
Anestesia L.R.				
Sim	49/64	76,6%	-	-
Não	15/64	23,4%	-	-
Pano de campo				
Aderente	20/64	31,3%	-	-
Não aderente	21/64	32,8%	-	-
Ambos	16/64	25,0%	-	-
s/d	7/64	10,9%	-	-
P. Cx				
TPLO	26/64	40,6%	-	-
THR	8/64	12,5%	-	-
Artroplastia	11/64	17,2%	-	-
O. C. Fémur	3/64	4,7%	-	-
Fraturas	7/64	10,9%	-	-
Luxação patelar	6/64	9,4%	-	-
Amputação	1/64	1,6%	-	-
Hemilaminectomia	1/64	1,6%	-	-
Tenotomia	1/64	1,6%	-	-
Implantes				
Sim	51/64	79,7%	-	-
Não	13/64	20,3%	-	-
Hipotermia I.C				
Sim	15/64	23,4%	-	-
Não	49/64	76,6%	-	-
Hipotensão I.C				
Sim	12/64	18,8%	-	-
Não	52/64	81,3%	-	-

Legenda – AB: antibiótico; AMC: Amoxiciclina + ácido clavulânico; AINES: Antinflamatório não esteroide; I.C: intracirúrgica; K: quetamina; L.R: Loco-regional; min: minutos; TPLO: Osteotomia de nivelamento do plateau tibial; P. Med: Pré-medicação; P.Cx: Procedimento cirúrgico; THR: Prótese total de anca; S/d: sem dados; ASA: Sociedade Americana dos Anestesiologistas.

Verificou-se também que os animais aos quais foram prescritos antibióticos nos 12 meses prévios à cirurgia, não apresentaram diferenças significativas relativamente ao desenvolvimento de resistências nas bactérias fecais ($p=0,622$). Foi possível também constatar que não se verificou existência de correlação entre a toma de antibióticos prévios à cirurgia e o desenvolvimento de resistência nas bactérias fecais ($r=0,066$; $p=0,619$). A prescrição de antibiótico no período pós-operatório foi decisão do médico-cirurgião responsável, não tendo sido definido nenhum protocolo ou critério específico.

Relativamente à incidência de ILC, neste estudo nenhum paciente evidenciou sinais compatíveis durante o seguimento.

Aproximadamente 20,3% (13/64) dos animais foram sugestivos de colonização com Enterobacterales produtoras de ESBLs e/ou pAmpC. Destas, 85% (11/13) foram identificadas como *E. coli*, 7,7% (1/13) como *K. pneumoniae* e 7,7% (1/13) como *E. cloacae* (Figura 6).

Relativamente às amostras positivas para *E. coli* cujo fenótipo revelou resistência às C3G, alguns isolados evidenciaram resistência a pelo menos um antibiótico das diversas classes (carbapenemos, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclina, sulfonamidas, fenicóis, nitrofuranos (figura 7 e tabela 10). Além da resistência às C3G e C4G, *K. pneumoniae* e *E. cloacae*, demonstraram resistência a outros grupos de antibióticos (figura 7).

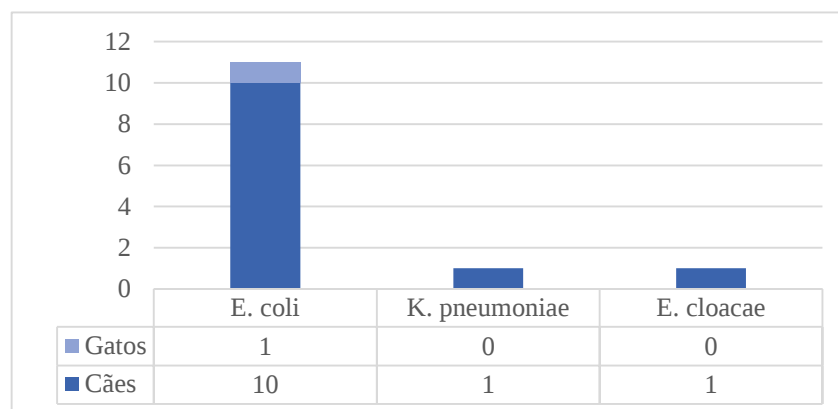


Figura 6 – Representação gráfica da frequência e identificação de Enterobacterales produtores de ESBLs/pAmpC em cães e gatos.

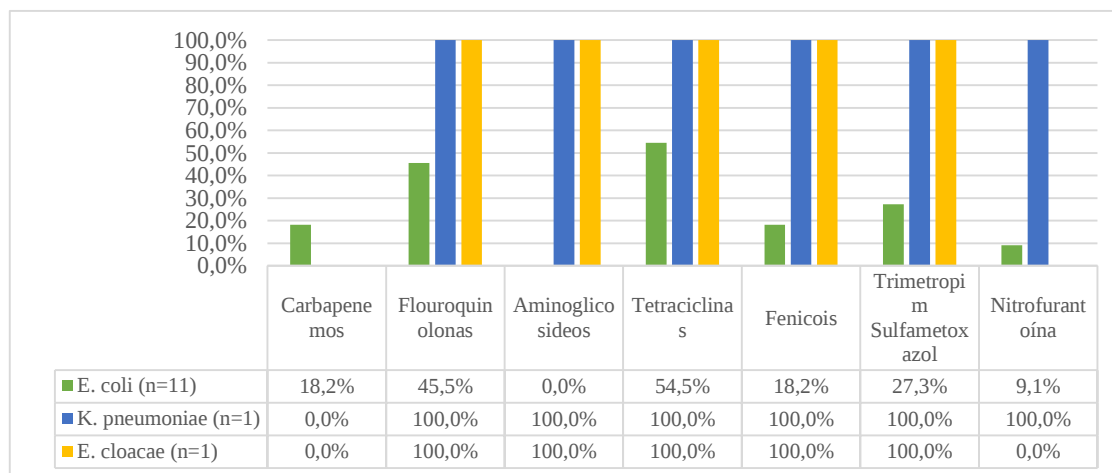


Figura 7 – Perfil de resistência dos isolados clínicos às várias classes de antibióticos estudados

Tabela 10 – Perfil de resistência dos isolados clínicos identificados como *E. coli* às várias classes de antibióticos utilizados

	Total Resistência	Frequência Resistência (%)	Total Sensíveis	Frequência Sensíveis (%)	Total resistência Intermédia	Frequência Intermédios (%)
AMC	11	100,0	0	0,0	0	0,0
AMP	11	100,0	0	0,0	0	0,0
CTX	11	100,0	0	0,0	0	0,0
CAZ	8	72,7	2	18,2	1	9,1
FEP	5	45,5	5	45,5	1	9,1
FOX	7	63,6	2	18,2	2	18,2
NA	5	45,5	4	36,4	2	18,2
CIP	4	36,4	2	18,2	5	45,5
LEV	5	45,5	2	18,2	4	36,4
ENR	5	45,5	3	27,3	3	27,3
AK	1	9,1	6	54,5	4	36,4
CN	0	0,0	10	90,9	1	9,1
FOT	0	0,0	11	100,0	0	0,0
TE	6	54,5	5	45,5	0	0,0
STX	3	27,3	8	72,7	0	0,0
MEM	0	0,0	9	81,8	2	18,2
IMP	2	18,2	5	45,5	4	36,4
ERT	3	27,3	7	63,6	1	9,1
C	2	18,2	9	81,8	0	0,0
F	1	9,1	9	81,8	1	9,1

Legenda: NA: ácido nalidixico; AK: amicacina; AMC: amoxiciclina/ ácido clavulânico; AMP: ampicilina; FEP: cefepime; CTX: cefotaxima; FOX: ceftaxima; CAZ: ceftazidima; CIP: ciprofloxacina; C: cloranfenicol; ENR: enrofloxacin; ERT: ertapenemo; FOS: fosfomicina; CN: gentamicina, IMP: imipenemo; LEV: levofloxacina; MEM: meropenemo; F: nitrofurantoina; TE: tetraciclina e SXT: trimetropim/sulfametoxazole.

Relativamente, às estirpes de *E. coli* isoladas, o grupo filogenético mais comumente identificado correspondeu ao grupo B₁ em, aproximadamente 54,5% (6/11) dos casos, seguido do grupo D em 27,3% (3/11) dos isolados, e 9,1% foram identificados como grupo A (1/11) e outro como grupo B₂ (1/11). Dos genes identificados, em 36,4% (4/11) dos isolados foi identificado o gene *bla*_{TEM-1}, em 27,3% (3/11) o gene *bla*_{CTX-M-15}. Dos indicadores da presença de genes *AmpC* (*bla*_{CIT}), foi identificado o gene *bla*_{CMY-2} em, aproximadamente, 18,2% (2/11) dos casos. Relativamente à carbapenemases foi identificada a presença do gene *bla*_{OXA-244} tipo em 18,2% (2/11). A caracterização genética de todas as estirpes encontra-se representada na figura 8.

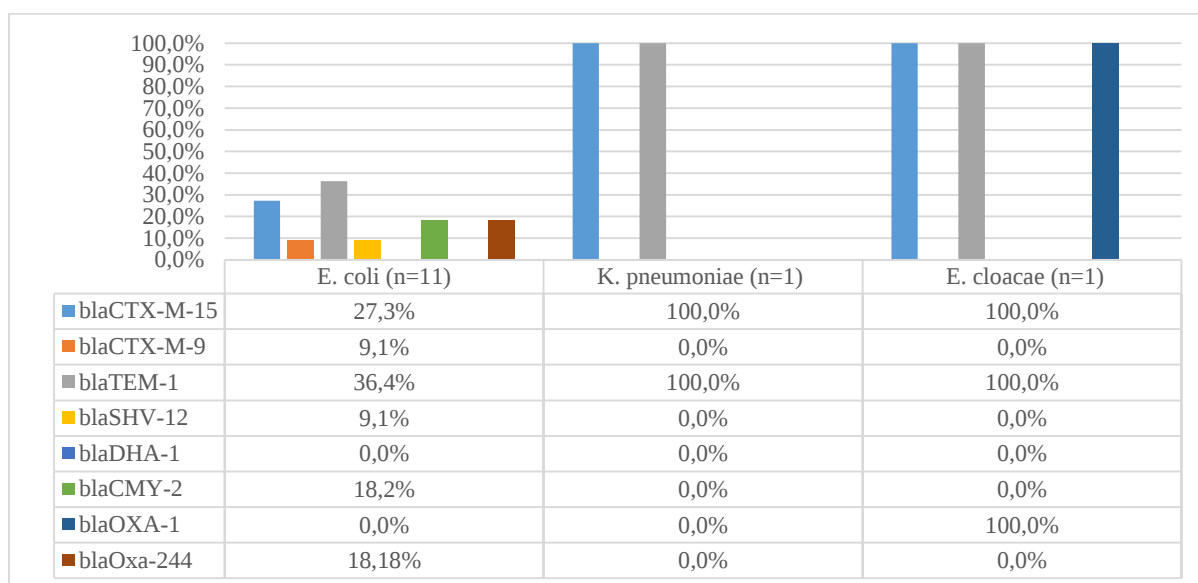


Figura 8 – Representação gráfica da distribuição dos genes identificados por espécie de bactéria em percentagem.

A tabela 11 representa isolados de Enterobacterales produtoras de ESBLs/ *pAmpC*, os resultados obtidos em termos de perfil de resistência, genes de resistência identificados e, caso se aplique, o grupo filogenético correspondente.

É de salientar que alguns dos isolados demonstraram a presença de vários genes em simultâneo e resistência diversas classes de antibióticos o que lhes confere um fenótipo MDR: neste estudo, 46,1% (6/13) dos isolados evidenciou perfil MDR, entre os quais 30,7% (4/13), corresponderam a *E.coli*, 7,7% (1/13) 1 a *K. pneumoniae* e 7,7% (1/13) *E. cloacae* (figura 9). Através da análise da figura 10, 92,3% (12/13) dos isolados são compatíveis com Enterobacterales produtoras de ESBL e/ou *pAmpC*.

Tabela 11 – Caracterização das amostras quanto à espécie de bactéria, grupo filogenético, determinantes e perfil de resistência

ID	Bactéria identificada	Grupo filogenético	Determinantes de RAM	Perfil de RAM	Perfil MDR
FMVULusofona (Z2.06)	<i>E. coli</i>	D ₂	n.d	AMP; AMC; CTX; CAZ; FOX; TE.	Não
FMVULusofona (Z2.15)	<i>E. coli</i>	B ₁	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	AMP; AMC; CTX; CAZ; FOX; FEP; NA; ENR; CIP; LEV; TE, STX; C.	Sim
FMVULusofona (Z2.16)	<i>E. coli</i>	B ₁	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{OXA-244} tipo	AMP; AMC; CTX; CAZ; FOX; FEP; IMP; ERT;	Não
FMVULusofona (Z2.22)	<i>E. coli</i>	B ₁	n.d	AMC; AMP; CTX;	Não
FMVULusofona (Z2.24)	<i>E. coli</i>	A	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{OXA-244} tipo	AMP; AMC; CTX; NA; ENR; CIP; LEV; IMP, ERT;	Não
FMVULusofona (Z2.29)	<i>E. coli</i>	B ₂	n.d	AMP; AMC; CTX; TE	Não
FMVULusofona (Z2.35)	<i>E. coli</i>	B ₁	<i>bla</i> _{TEM-1} + <i>bla</i> _{SHV-12}	AMP; AMC; CTX; CAZ; TE	Não
FMVULusofona (Z2.41)	<i>E. cloacae</i> *	n.d	<i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{OXA-1}	AMP; AMC; CTX; CAZ; FOX; FEP; ENR; CIP; CN; TE; STX; C	Sim
FMVULusofona (Z2.49)	<i>E. coli</i>	B ₁	<i>bla</i> _{CTX-M-9} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CMY-2}	AMP; AMC; CTX; CAZ; FOX; FEP; NA; ENR; CIP; LEV; TE, STX;	Sim
FMVULusofona (Z2.50)	<i>E. coli</i>	D ₂	<i>bla</i> _{CMY-2}	AMP; AMC; CTX; CAZ; FOX;	Não
FMVULusofona (Z2.58a)	<i>E. coli</i>	D ₂	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	AMP; AMC; CTX; CAZ; FOX; FEP; NA; ENR; CIP; LEV; AK; TE; STX; C;	Sim
FMVULusofona (Z2.58b)	<i>K. pneumoniae</i> **	n.d	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	AMP; AMC; CTX; CAZ; FEP; NA; ENR; CIP; LEV; CN; TE; STX; C; F;	Sim
FMVULusofona (Z2.64)	<i>E. coli</i>	B ₁	n.d	AMP; AMC; CTX; CAZ; FOX; FEP; NA; ENR; CIP; LEV; IMP; ERT; F;	Sim

Legenda: * *E. cloacae* é intrinsecamente resistentes à AMP, AMC, e cefalosporinas de primeira geração e FOX; ** *K. pneumoniae* é intrinsecamente resistente à AMP (CLSI 2024). NA: ácido nalidixico; AK: amicacina; AMC: amoxiciclina/ ácido clavulânico; AMP: ampicilina; FEP: cefepime; CTX: cefotaxima; FOX: ceftazidima; CAZ: ceftazidima; CIP: ciprofloxacina; C: cloranfenicol; ENR: enrofloxacin; ERT: ertapenemo; CN: gentamicina, IMP: imipenemo; LEV: levofloxacina; MDR: multirresistente; F: nitrofurantoina; RAM: resistência a antibióticos; TE: tetraciclina e SXT: trimetopim/sulfametoxazole; n.d: não definido

5. Discussão

A ILC é uma complicação cirúrgica preocupante em medicina veterinária que pode comprometer o sucesso cirúrgico, levando a aumento do tempo de recuperação, hospitalização e, por vezes, à necessidade de intervenções futuras, acrescentando nos custos para o cliente.

O objetivo deste estudo foi caracterizar uma população a nível fecal, especificamente no contexto de COL e perceber se a colonização prévia com Enterobacterales produtoras de ESBLs e/ou *pAmpC* constituíam um fator de risco para o desenvolvimento de ILC. Compreender o risco para os animais colonizados é crucial para melhorar o resultado cirúrgico e desenvolver e implementar estratégias preventivas.

O aumento da prevalência da RAM torna este estudo fundamental, dado que por um lado os animais de companhia são elementos importantes como modelos de estudo, uma vez que atuam como reservatórios para bactérias resistentes e, consequentemente os seus genes de resistência podem ser transmitidos para animais, humanos e meio ambiente (Caliskan-Aydogan & Alocilja, 2023; Werhahn Beining *et al.*, 2023). Por outro, os animais de companhia, tal como acontece no ser humano, são vulneráveis à colonização por bactérias resistentes que dificultam a terapia e reduzem a eficácia dos antibióticos mais utilizados. O uso descontrolado e incorreto de antibiótico tanto em medicina veterinária como humana são fatores que contribuíram para uma evolução acelerada de estirpes bacterianas MDR (Pomba *et al.*, 2017). Isto significa que infeções previamente controladas com antibióticos de primeira linha, necessitam de tratamento com classes de antibióticos de uso mais restrito, tornando a ILC um desafio terapêutico.

Em medicina veterinária a ILC não só afeta o tempo de recuperação do paciente como também a sua qualidade de vida no pós-operatório, levando a desconforto, dor, aumento da morbilidade, comprometendo por isso o seu bem-estar geral (Onyekwelu *et al.*, 2017). É ainda importante referir que nestas situações ocorre simultaneamente um transtorno emocional e financeiro para os tutores, o que pode levar a decisões difíceis face a prolongamento do tratamento e recusa de terapias mais invasivas. Em casos mais graves de ILC pode resultar em eutanásia. Desta forma, prevenir a ILC é imprescindível para salvaguardar o bem-estar, preservar o laço humano-animal e minimizar o risco de transmissão de estirpes resistentes. No caso específico de procedimentos ortopédicos limpos, o desenvolvimento de ILC pode ter implicações profundas, como sepsis, formação de abscessos, deiscência de sutura, exacerbando o problema inicial podendo levar a amputação (Suranigi *et al.*, 2021). No caso de procedimentos com aplicação de implantes metálicos, o desenvolvimento de ILC pode estar associado à

formação de biofilmes. Os biofilmes desempenham um papel importante para o desenvolvimento e persistência de ILC. Representam um conjunto organizado de microrganismos que aderem a uma superfície (implante) e produzem uma matriz extracelular protetora que dificulta a ação do sistema imunitário do hospedeiro e impedem a penetração do antibiótico (Blondel, Machet, Wildemann, Abidine, Swider, 2024). Por estes motivos a incidência de ILC em casos de colocação de implantes metálicos é bastante problemática, podendo exigir a remoção do implante para possibilitar o tratamento e evitar infecções recorrentes ou crônicas.

No caso de a matriz ser composta por Enterobacterales produtoras de ESBLs e /ou *pAmpC*, ocorre a combinação da resistência antibiótica com a proteção da própria matriz, tornando um cenário extremamente preocupante, uma vez que limita gravemente as opções de tratamento. Desta forma, a ILC por Enterobacterales produtoras de ESBLs e /ou *pAmpC*, incluindo estirpes MDR, por serem mais complexas de tratar, levam ao atraso da cicatrização da ferida cirúrgica, obrigam à utilização de outras classes de antibióticos que por sua vez e se usados de forma indiscriminada levam a aumento da RAM.

A incidência de ILC em medicina veterinária é bastante variável (0,8% a 30%) (Suranigi *et al.*, 2021; Välikki *et al.*, 2020; Williams, 2018), uma vez que está dependente de diversos fatores pelo que varia de acordo com o delineamento de cada estudo: Neste estudo a maioria dos animais correspondeu a cães de diversas raças pertencentes sobretudo a tutores privados. Foram avaliadas diversas variáveis de forma a caracterizar a população e perceber se poderiam representar um fator de risco para o desenvolvimento de ILC.

A idade não esteve associada ao desenvolvimento de ILC, contrariamente ao identificado noutros estudos. Onde os animais com maior risco correspondem aos pacientes com idade inferior a 6 e superior a 12 anos (Hagen *et al.*, 2020) e noutro estudo, em que por cada ano adicional, o risco de desenvolvimento de ILC era 1,5 vezes superior (Aiken *et al.*, 2015). A ausência de associação poderá dever-se à disparidade dos dados, originando resultados muito amplos.

A duração anestésica não foi identificada como fator de risco para o desenvolvimento de ILC contrariamente ao estudo de Pratesi *et al.* (2015), em que os autores concluíram que a duração anestésica aumenta o desenvolvimento de ILC em 2% por cada minuto de anestesia adicional. Relativamente à duração do procedimento cirúrgico, este não demonstrou relação para o desenvolvimento de ILC. No entanto, num estudo desenvolvido por Stetter *et al.* (2021), verificaram que a incidência de ILC aumenta quanto maior a duração do procedimento.

Uma vez que, no presente estudo foram avaliados diversos procedimentos cirúrgicos, com técnica e duração distintas, obteve-se resultados bastante variáveis, impossibilitando estabelecer uma tendência.

A hipotensão cirúrgica bem como a presença de implantes não revelaram estar associadas ao desenvolvimento de ILC, contrariamente ao identificado pelo estudo de Turk *et al.* (2015).

Na análise estatística, a correlação entre o grupo de animais no qual houve administração de antibiótico prévia (até 12 meses) e desenvolvimento de resistências foi fraca, contrariamente ao verificado por outros estudos (Menezes *et al.*, 2023; Ortiz-Díez *et al.*, 2023; Werhalm *et al.*, 2023) que verificaram que a prescrição prévia de antibiótico aumenta a prevalência de resistências numa população.

Por outro lado, não se verificaram diferenças significativas relativamente ao desenvolvimento de resistências entre o grupo de animais ao qual foi prescrito antibiótico até 12 meses e o grupo em que não recebeu antibióticos.

De acordo com os resultados obtidos, nenhum dos pacientes que participaram no estudo evidenciou ILC nem a nível macroscópico, nem radiográfico durante as consultas de seguimento, incluindo os animais que se encontravam colonizados com Enterobacterales produtoras de ESBLs e/ou *pAmpC*.

Uma vez que, neste estudo não ocorreu nenhum caso de ILC, não foi possível estabelecer uma análise estatística inferencial que correlacionasse a presença e ausência de resistências com o desenvolvimento de ILC.

Apesar da sua prevalência elevada de animais colonizados com Enterobacterales produtoras de ESBLs e/ou *pAmpC*, a ausência de ILC é contrária ao espectável:

A prescrição de antibiótico pós-operatório não foi protocolada. Esta dificuldade em controlar o tratamento pós-operatório pode ter influenciado a incidência de ILC neste estudo, constituindo por isso um viés para estes resultados. No estudo desenvolvido por Aiken *et al.* (2015) e Pratesi *et al.* (2015), verificaram que a prescrição de antibiótico no período pós – operatório apresenta um efeito protetor sobre a incidência de ILC. Contudo, o presente estudo enquadra casos em contexto clínico real, tendo sido a prescrição de antibiótico uma decisão do médico-cirurgião responsável em cada CAMV. Portanto seria benéfico em estudos futuros ter uma abordagem mais controlada do uso de antibiótico pós-operatório de modo a não influenciar os resultados e permitir estabelecer comparações diretas.

É possível considerar que as técnicas de antissepsia protocoladas, incluindo o antisséptico utilizado (clorhexidina e álcool) foram eficazes na diminuição da contaminação da pele. No entanto, um estudo (Leshem, Gilron, Azrad, Peretz, 2022), indica que atualmente começa a existir diminuição de suscetibilidade à clorhexidina em bactérias Gram-negativas e especialmente em Enterobacterales produtoras de ESBLs, sendo um fator a ter em consideração no futuro durante a preparação do paciente cirúrgico.

É possível ainda, que o protocolo profilático tenha sido eficaz para as estirpes não resistentes ao antibiótico, no entanto não se pode desvalorizar o facto de caso tivesse havido contaminação por parte de Enterobacterales produtoras de ESBLs e/ou *pAmpC* este seria ineficaz. Existe, também a possibilidade de as bactérias resistentes e MDR não terem contaminado o campo antes, durante e após o procedimento cirúrgico.

A presença de bactérias resistentes às C3G, representa uma ameaça grave e catastrófica pois, por um lado apresentam um amplo espectro de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, pelo que são resistentes à maioria dos protocolos profiláticos utilizados em procedimentos ortopédicos (cefalosporinas de primeira geração como a cefazolina), pelo que em casos de contaminação do local cirúrgico por estes microrganismos, o protocolo revelar-se-ia ineficaz. Este facto sublinha a importância de uma antissepsia rigorosa e criteriosa. Por outro lado, a presença de Enterobacterales MDR limita as opções de tratamento, pelo que em casos de ILC, estes pacientes tornam-se um desafio terapêutico.

A prevalência de Enterobacterales produtoras de ESBLs e/ou *pAmpC* foi elevada (20,3%) e muito semelhante a um estudo, no qual obtiveram uma prevalência de 20,0%, em cães submetidos a procedimentos cirúrgicos (Belas, Correia, Marques, Gama, Pomba, 2021). Contudo existem diversos estudos com valores bastante variáveis, alguns com prevalência ligeiramente superior a 25,0% (Ortiz-Díez *et al.*, 2023) em Espanha e 25,2% (Belas *et al.*, 2014) em Portugal. Outro estudo realizado por Menezes *et al.* (2023), evidenciou uma prevalência de 12,7% em Portugal e 8,5% no Reino Unido. Isto ocorre, devido ao delineamento de cada estudo, por exemplo é essencial saber a dimensão da amostra, se os animais selecionados para cada estudo são saudáveis ou apresentam doenças concomitantes, se procederam a toma prévia (até quatro semanas) de antibiótico.

Neste estudo, além da resistência aos β -lactâmicos, as estirpes isoladas apresentaram resistência a outras classes de antibióticos, adquirindo um perfil MDR. A toma de antibiótico é um fator de risco preponderante para o aumento da prevalência de bactérias MDR (Menezes *et al.*, 2023).

A colonização com Enterobacterales produtoras de ESBLs e/ou *pAmpC* além de representarem um risco a nível individual, constituem ameaça para outros animais, humanos e ambiente (Tseng *et al.*, 2023). Neste estudo, o grupo filogenético mais comumente identificado correspondeu ao grupo B₁ (54,5%) que engloba estirpes comensais. Em estudos semelhantes, o mais comumente identificado foi o grupo filogenético D associado a estirpes patogénicas (Belas *et al.*, 2022) e A e B₁ pertencente a estirpes comensais (Menezes *et al.*, 2023).

Neste estudo, os genes mais comumente isolados corresponderam ao *bla*_{TEM-1} e *bla*_{CTX-M-15} o que está de acordo com outros estudos (Belas *et al.*, 2021). É importante referir que foram identificados genes que conferem resistência aos carbapenemos – *bla*_{OXA-244}_{tipo}. As estirpes portadoras deste gene pertenciam a grupos filogenéticos comensais (A e B₁). Neste estudo, este gene foi identificado em dois animais de associação/canil. Como referido por Belas *et al.* (2014), e Werhahn Beining *et al.*, (2023) estes estabelecimentos representam um fator de risco para o aparecimento de bactérias MDR.

A enzima OXA-244 é uma variante da OXA-48 que difere apenas num único aminoácido. Foi descrita pela primeira vez em 2011 em Espanha (Pitout, Peirano, Kock, Strydom & Matsumura, 2019). Exibe atividade ligeiramente menor contra os carbapenemos comparativamente com a OXA-48 (Gonzalez *et al.*, 2024). Em humanos é identificada mais comumente em amostras fecais (Reichert *et al.*, 2024) e de urina (Lindemann *et al.*, 2023).

A OXA-244 foi identificada pela primeira vez, em animais num estudo no Egito em 2020 (Khalifa *et al.*, 2020) num cão saudável a partir de uma amostra nasal.

Em animais de companhia existem diversos estudos publicados na qual foram identificadas diversas carbapenemases OXA (Brilhante *et al.*, 2020; Rincón-Real & Suárez-Alfonso, 2022) Contudo, para conhecimento da autora, não existem casos descritos de animais saudáveis colonizados com o gene *bla*_{OXA-244}_{tipo} em Portugal e na Europa, assim este estudo representa o primeiro relato.

Encontram-se codificadas em plasmídeos pelo que a sua transmissão se encontra facilitada e pode ocorrer de forma bastante rápida. Assim, os animais deste estudo constituem reservatórios de bactérias e genes altamente resistentes com potencial zoonótico, sendo por isso, considerados um problema de biossegurança.

Outras carbapenemases têm sido cada vez mais identificadas em animais de companhia (0,25% a 21,6%), tendo o maior surto ocorrido num Hospital veterinário na Suíça em 2018, com uma prevalência de 21,7% (Rincón-Real & Suárez-Alfonso, 2022). Esta situação

salienta a importância do contexto hospitalar para a disseminação de estirpes e genes resistentes para animais, humanos e meio ambiente.

As limitações deste estudo foram a dimensão reduzida da amostra (n=64) que afeta o poder estatístico e impede generalizar os resultados para uma população maior. Uma dimensão de amostra superior proporcionaria resultados mais robustos e aumentaria a confiança das associações observadas entre a colonização com Enterobacterales produtoras de ESBLs e/ou *pAmpC*.

Outra limitação importante a referir está relacionada com a heterogeneidade dos resultados: o tipo e a duração de antibióticos utilizados foram bastante variáveis, o que impossibilita perceber se existe relação entre ambas as variáveis. Para além disso, neste estudo foram recolhidos dados sobre diversas variáveis que podem constituir fator de risco para o desenvolvimento de ILC, foram estudados diversos procedimentos cirúrgicos que por si só apresentam duração de anestesia e cirurgia distintos e manipulação tecidual diferente. Ou seja, para obter uma amostragem mais homogênea seria necessário optar por um procedimento específico cirúrgico específico (TPLO, THR, resolução de fraturas), pois desta forma, a duração de anestesia, e cirurgia e traumatismo do tecido tornaria a população mais uniforme.

Apesar de não ter sido possível estabelecer uma correlação, é crucial sublinhar a importância individual: comprometimento do sucesso cirúrgico e bem-estar animal; do risco de biossegurança: pela transmissão de estirpes resistentes ou MDR a animais, humanos e ambiente é crucial estabelecer medidas que tenham como objetivo minimizar a incidência de ILC. Um dos pontos-chave para diminuir a incidência de ILC é restringir o uso de antibiótico pós-operatório para os pacientes que se encontrem colonizados com estirpes resistentes ou MDR.

Assim seria pertinente implementar a realização de culturas intraoperatórias de forma a identificar a estirpe presente no local cirúrgico de forma a selecionar a terapia pós-cirúrgica mais adequada se necessária e prevenir o uso desnecessário de antibióticos de largo espectro e consequentemente aumento e disseminação de resistências. Tornam-se medidas chave que devem ser sempre aplicadas para qualquer intervenção cirúrgica.

6. Conclusão

Apesar dos resultados não terem permitido estabelecer uma correlação entre a colonização de Enterobacterales produtoras de ESBLs e/ou *pAmpC* com o desenvolvimento de ILC, este estudo demonstra que 20,3% dos animais encontravam-se colonizados com bactérias resistentes a C3G antes de serem submetidos a procedimentos cirúrgicos. Além do risco individual pela dificuldade terapêutica, estes animais representam um risco para a saúde pública, uma vez que as espécies de bactérias isoladas apresentam a capacidade de contaminar o ambiente hospitalar, nomeadamente equipamentos, superfícies e pessoal médico. É ainda de salientar que foi identificado o gene *bla*_{OXA-244}tipo, pela primeira vez em Portugal e na Europa.

Estes resultados evidenciam a importância da utilização de antissepsia rigorosa, técnica cirúrgica adequada e anestesia controlada e a vigilância ativa dos pacientes para controlo de infeção a nível individual bem como implementar medidas de prevenção com o objetivo de minimizar a transmissão de estirpes resistentes e melhorar a saúde animal, humana e preservar a sustentabilidade ambiental.

7. Referências Bibliográficas

- Aiken, M. J., Hughes, T. K., Abercromby, R. H., Holmes, M. A., & Anderson, A. A. (2015). Prospective, Randomized Comparison of the Effect of Two Antimicrobial Regimes on Surgical Site Infection Rate in Dogs Undergoing Orthopedic Implant Surgery. *Veterinary surgery*: VS, 44(5), 661–667. <https://doi.org/10.1111/vsu.12327>
- Allerton, F., Prior, C., Bagcigil, A. F., Broens, E., Callens, B., Damborg, ... Jessen, L. R. (2021). Overview and Evaluation of Existing Guidelines for Rational Antimicrobial Use in Small-Animal Veterinary Practice in Europe. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(4), 409. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10040409>
- Alnajar, S., & Gupta, R. S. (2017). Phylogenomics and comparative genomic studies delineate six main clades within the family Enterobacteriaceae and support the reclassification of several polyphyletic members of the family. *Infection, Genetics and Evolution*, 54, 108–127. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.06.024>
- Alshaikh, S. A., El-Banna, T., Sonbol, F., & Farghali, M. H. (2024). Correlation between antimicrobial resistance, biofilm formation, and virulence determinants in uropathogenic *Escherichia coli* from Egyptian hospital. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 23(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s12941-024-00679-2>
- Antimicrobial Resistance Division (AMR), Impact Initiatives and Research Coordination (IRC). (2024). WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance, *World Health Organization*, 1-12.
- Bajaj, P., Singh, N. S., & Viridi, J. S. (2016). *Escherichia coli* β -Lactamases: What Really Matters. *Frontiers in microbiology*, 7, 417. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00417>
- Belas, A., Correia, J., Marques, C., da Gama, L. T., Pomba, C. (2021). ESBL/AmpC-Producing Enterobacteriaceae Fecal Colonization in Dogs after Elective Surgery. *Microbiology Research*, 12(4), 907-915. <https://doi.org/10.3390/microbiolres12040067>
- Belas, A., Marques, C., Menezes, J., da Gama, L. T., Cavaco-Silva, P., & Pomba, C. (2022). ESBL/pAmpC-Producing *Escherichia coli* Causing Urinary Tract Infections in Non-Related Companion Animals and Humans. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(5), 559. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11050559>
- Belas, A., Menezes, J., Gama, L. T., & Pomba, C. (2020). Sharing of Clinically Important Antimicrobial Resistance Genes by Companion Animals and Their Human

Household Members. *Microbial drug resistance* (Larchmont, N.Y.), 26(10), 1174–1185. <https://doi.org/10.1089/mdr.2019.0380>

Belas, A., Salazar, A. S., Gama, L. T., Couto, N., & Pomba, C. (2014). Risk factors for faecal colonisation with *Escherichia coli* producing extended-spectrum and plasmid-mediated AmpC β -lactamases in dogs. *The Veterinary record*, 175(8), 202. <https://doi.org/10.1136/vr.101978>

Bergvall, K., Greko, C., Larsson, C., Mannerfelt, T., Odensviks, K., (2009) The Swedish Guidelines for the clinical use of antibiotics in the treatment of dogs and cats (2nd ed.) *Swedish Veterinary Association*.

Blondel, M., Machet, C., Wildemann, B., Abidine, Y., & Swider, P. (2024). Mechanobiology of bacterial biofilms: Implications for orthopedic infection. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 42(8), 1861–1869. <https://doi.org/10.1002/jor.25822>

Bogaerts, P., Huang, T. D., Bouchahrouf, W., Bauraing, C., Berhin, C., El Garch, F., ... ComPath Study Group (2015). Characterization of ESBL- and AmpC-Producing Enterobacteriaceae from Diseased Companion Animals in Europe. *Microbial drug resistance* (Larchmont, N.Y.), 21(6), 643–650. <https://doi.org/10.1089/mdr.2014.0284>

Brilhante, M., Menezes, J., Belas, A., Feudi, C., Schwarz, S., Pomba, C., & Perreten, V. (2020). OXA-181-Producing Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Sequence Type 410 Isolated from a Dog in Portugal. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 64(4), e02298-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.02298-19>

Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(3), 969–976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>

Caliskan-Aydogan, O., & Alocilja, E. C. (2023). A Review of Carbapenem Resistance in Enterobacterales and Its Detection Techniques. *Microorganisms*, 11(6), 1491. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11061491>

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

Chou, P.-Y., Robinson, D., Kapatkin, A. S., Epstein, S. E., Giuffrida, M. A., & Byrne, B. A. (2020). Susceptibility of Incisional Site Staphylococcus spp. to Three Common

Perioperative Antimicrobials in Dogs Undergoing Clean Orthopaedic Procedures. *VCOT Open*, 03(02), e158–e163. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1716847>

Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental microbiology reports*, 5(1), 58–65. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>

Clermont, O., Condamine, B., Dion, S., Gordon, D. M., & Denamur, E. (2021). The E phylogroup of *Escherichia coli* is highly diverse and mimics the whole E. coli species population structure. *Environmental microbiology*, 23(11), 7139–7151. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15742>

Clermont, O., Olier, M., Hoede, C., Diancourt, L., Brisse, S., Keroudean, M., ... Denamur, E. (2011). Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds. *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 11(3), 654–662. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.02.005>

CLSI. (2024). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: *CLSI M100*. Clinical and Laboratory Standards Institute, 34.

Dhammi, I. K., Ul Haq, R., & Kumar, S. (2015). Prophylactic antibiotics in orthopedic surgery: Controversial issues in its use. *Indian journal of orthopaedics*, 49(4), 373–376. <https://doi.org/10.4103/0019-5413.159556>

Doumith, M., Day, M. J., Hope, R., Wain, J., & Woodford, N. (2012). Improved multiplex PCR strategy for rapid assignment of the four major *Escherichia coli* phylogenetic groups. *Journal of clinical microbiology*, 50(9), 3108–3110. <https://doi.org/10.1128/JCM.01468-12>

Drieux, L., Brossier, F., Sougakoff, W., & Jarlier, V. (2008). Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14 Suppl 1, 90–103. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01846.x>

Edelstein, M., Pimkin, M., Palagin, I., Edelstein, I., & Stratchounski, L. (2003). Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrobial*

agents and chemotherapy, 47(12), 3724–3732. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.12.3724-3732.2003>

Fossum, T. W. (2019). Surgical Infections and Antibiotic Selection. In *Small Animal Surgery* (5th ed., pp. 79–89). Elsevier, Inc.

Gehlen, H., Klein, K. S., Merle, R., Lübke-Becker, A., & Stoeckle, S. D. (2023). Does colonization with MRSA, ESBL - producing Enterobacteriaceae, and/or Acinetobacter baumannii - increase the risk for postoperative surgical site infection?. *Veterinary medicine and science*, 9(2), 729–737. <https://doi.org/10.1002/vms3.1073>

Gonzalez, C., Oueslati, S., Rima, M., Nermont, R., Dortet, L., Hopkins, K. L., Iorga, B. I., Bonnin, R. A., & Naas, T. (2024). Molecular, Genetic, and Biochemical Characterization of OXA-484 Carbapenemase, a Difficult-to-Detect R214G Variant of OXA-181. *Microorganisms*, 12(7), 1391. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12071391>

Gonzalez, O. J., Renberg, W. C., Roush, J. K., KuKanich, B., & Warner, M. (2017). Pharmacokinetics of cefazolin for prophylactic administration to dogs. *American journal of veterinary research*, 78(6), 695–701. <https://doi.org/10.2460/ajvr.78.6.695>

Gupta, G., Tak, V., & Mathur, P. (2014). Detection of AmpC β Lactamases in Gram-negative Bacteria. *Journal of laboratory physicians*, 6(1), 1–6. <https://doi.org/10.4103/0974-2727.129082>

Hagen, C. R. M., Singh, A., Weese, J. S., Marshall, Q., Linden, A. Z., & Gibson, T. W. G. (2020). Contributing factors to surgical site infection after tibial plateau leveling osteotomy: A follow-up retrospective study. *Veterinary surgery: VS*, 49(5), 930–939. <https://doi.org/10.1111/vsu.13436>

Jacoby G. A. (2009). AmpC beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews*, 22(1), 161–182. <https://doi.org/10.1128/CMR.00036-08>

Janda, JM., Abbott, SL., (2021). The changing face of the family Enterobacteriaceae (order: “Enterobacterales”): new members, taxonomic issues, geographic expansion, and new diseases and disease syndromes. In *Journal of Clinical Microbiology* (Vol. 21, Issue 1, pp. 46–76). <https://doi.org/10.1128/jcm.21.1.46-76.1985>

Jessen L., Damborg P., Spohr A., Sørensen T., Langhorn R., Goericke-Pesch S., (2019). Antibiotic Use Guidelines for Companion Animal Practice (2nd ed.). *The Danish Small Animal Veterinary Association*.

Jianhe, H., Bolin, H., Yanzhao, X., & Yawei, S. (2020). Classification and Nomenclature of Bacteria. In *Animal Microbiology* (1st ed., pp. 73–79). Alpha Science International

Kazmierczak, K. M., de Jonge, B. L. M., Stone, G. G., & Sahm, D. F. (2020). Longitudinal analysis of ESBL and carbapenemase carriage among Enterobacterales and *Pseudomonas aeruginosa* isolates collected in Europe as part of the International Network for Optimal Resistance Monitoring (INFORM) global surveillance programme, 2013-17. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 75(5), 1165–1173. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz571>

Khalifa, H. O., Oreiby, A. F., Abd El-Hafeez, A. A., Okanda, T., Haque, A., Anwar, K. ... Matsumoto, T. (2020). First Report of Multidrug-Resistant Carbapenemase-Producing Bacteria Coharboring *mcr-9* Associated with Respiratory Disease Complex in Pets: Potential of Animal-Human Transmission. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 65(1), e01890-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.01890-20>

Lagerstrom, K. M., & Hadly, E. A. (2023). Under-Appreciated Phylogroup Diversity of *Escherichia coli* within and between Animals at the Urban-Wildland Interface. *Applied and environmental microbiology*, 89(6), e0014223. <https://doi.org/10.1128/aem.00142-23>

Lee, J., Hiibel, S. R., Reardon, K. F., & Wood, T. K. (2010). Identification of stress-related proteins in *Escherichia coli* using the pollutant cis-dichloroethylene. *Journal of applied microbiology*, 108(6), 2088–2102. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04611.x>

Leshem T., Gilron S., Azrad M., Peretz A. (2022). Characterization of reduced susceptibility to chlorhexidine among Gram-negative bacteria. *Microbes and Infection*, 24 (2). <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2021.104891>.

Liakopoulos, A., Mevius, D., & Ceccarelli, D. (2016). A Review of SHV Extended-Spectrum β -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. *Frontiers in microbiology*, 7, 1374. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01374>

Lindemann, P. C., Pedersen, T., Oma, D. H., Janice, J., Grøvan, F., Chedid, G. M., ... Samuelsen, Ø. (2023). Intraregional hospital outbreak of OXA-244-producing *Escherichia coli* ST38 in Norway, 2020. *Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 28(27), 2200773. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.27.2200773>

Lyssens, A Devriendt, N Stock, E Roggeman, T & de Rooster, H. (2019). Development of surgical site infections despite perioperative antimicrobial therapy in two dogs. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, 88(2) :83-90. doi: 10.21825/vdt.v88i2.16029

Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., ... Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(3), 268–281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>.

Mairi, A., Pantel, A., Sotto, A., Lavigne, J. P., & Touati, A. (2018). OXA-48-like carbapenemases producing Enterobacteriaceae in different niches. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 37(4), 587–604. <https://doi.org/10.1007/s10096-017-3112-7>

Menezes, J., Frosini, S. M., Belas, A., Marques, C., da Silva, J. M., Amaral, A. J., ... Pomba, C. (2023). Longitudinal study of ESBL/AmpC-producing Enterobacterales strains sharing between cohabiting healthy companion animals and humans in Portugal and in the United Kingdom. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases: official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 42(8), 1011–1024.

Moxley, R. A. (2022). Family Enterobacteriaceae. In *Veterinary Microbiology* (4th ed., pp. 43–55). John Wiley & Sons.

Nojoomi, F., & Ghasemian, A. (2019). The relation of phylogroups, serogroups, virulence factors and resistance pattern of *Escherichia coli* isolated from children with septicemia. *New microbes and new infections*, 29, 100517. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2019.100517>

Onyekwelu, I., Yakkanti, R., Protzer, L., Pinkston, C. M., Tucker, C., & Seligson, D. (2017). Surgical Wound Classification and Surgical Site Infections in the Orthopaedic Patient. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons. Global research & reviews*, 1(3), e022. <https://doi.org/10.5435/JAAOSGlobal-D-17-00022>

Ortiz-Díez, G., Mengíbar, R. L., Turrientes, M. C., Artigao, M. B., Gallifa, R. L., Tello, A. M., ... Santiago, T. A. (2023). Prevalence, incidence and risk factors for acquisition and colonization of extended-spectrum beta-lactamase- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from dogs attended at a veterinary hospital in Spain. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 92, 101922. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2022.101922>

Padmavathy, B., Vinoth Kumar, R., Patel, A., Deepika Swarnam, S., Vaidehi, T., & Jaffar Ali, B. M. (2012). Rapid and sensitive detection of major uropathogens in a single-pot

multiplex PCR assay. *Current microbiology*, 65(1), 44–53. <https://doi.org/10.1007/s00284-012-0126-3>

Pérez-Pérez, F. J., & Hanson, N. D. (2002). Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*, 40(6), 2153–2162. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.6.2153-2162.2002>

Pitout, J. D. D., Peirano, G., Kock, M. M., Strydom, K. A., & Matsumura, Y. (2019). The Global Ascendancy of OXA-48-Type Carbapenemases. *Clinical microbiology reviews*, 33(1), e00102-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00102-19>

Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 70(1), 119–123. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002>

Polsfuss, S., Bloemberg, G. V., Giger, J., Meyer, V., & Hombach, M. (2012). Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and CLSI screening parameters for the detection of extended-spectrum β -lactamase production in clinical Enterobacteriaceae isolates. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 67(1), 159–166. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr400>

Pomba, C., Mendonça, N., Costa, M., Louro, D., Baptista, B., Ferreira, M., ... & Caniça, M. (2006). Improved multiplex PCR method for the rapid detection of beta-lactamase genes in *Escherichia coli* of animal origin. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 56(1), 103–106. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.03.005>

Pomba, C., Rantala, M., Greko, C., Baptiste, K. E., Catry, B., van Duijkeren, E., ... Törneke, K. (2017). Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 72(4), 957–968. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw481>

Pratesi, A., Moores, A. P., Downes, C., Grierson, J., & Maddox, T. W. (2015). Efficacy of Postoperative Antimicrobial Use for Clean Orthopedic Implant Surgery in Dogs: A Prospective Randomized Study in 100 Consecutive Cases. *Veterinary surgery: VS*, 44(5), 653–660. <https://doi.org/10.1111/vsu.12326>

Reichert, F., Brinkwirth, S., Pfennigwerth, N., Haller, S., Fritsch, L. S., Eckmanns, T., ... Hans, J. B. (2024). Prolonged carriage of OXA-244-carbapenemase-producing *Escherichia coli* complicates epidemiological investigations. *International journal of medical microbiology: IJMM*, 314, 151595. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2023.151595>

Rincón-Real, A. A., & Suárez-Alfonso, M. C. (2022). Carbapenem resistance in critically important human pathogens isolated from companion animals: a systematic literature review. *Osong public health and research perspectives*, 13(6), 407–423. <https://doi.org/10.24171/j.phrp.2022.0033>

Riwu, K. H. P., Effendi, M. H., & Rantam, F. A. (2020). A Review of Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) Producing *Klebsiella pneumoniae* and Multidrug Resistant (MDR) on Companion Animals. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(7)

Rodríguez-Guerrero, E., Callejas-Rodelas, J. C., Navarro-Marí, J. M., & Gutiérrez-Fernández, J. (2022). Systematic Review of Plasmid AmpC Type Resistances in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and Preliminary Proposal of a Simplified Screening Method for ampC. *Microorganisms*, 10(3), 611. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030611>

Salgado-Caxito, M., Benavides, J. A., Adell, A. D., Paes, A. C., & Moreno-Switt, A. I. (2021). Global prevalence and molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase producing-*Escherichia coli* in dogs and cats - A scoping review and meta-analysis. *One health (Amsterdam, Netherlands)*, 12, 100236. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100236>

Sawa, T., Kooguchi, K., & Moriyama, K. (2020). Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *Journal of intensive care*, 8, 13. <https://doi.org/10.1186/s40560-020-0429-6>

Schmitt, K., Kuster, S. P., Zurfluh, K., Jud, R. S., Sykes, J. E., Stephan, R., & Willi, B. (2021). Transmission Chains of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae at the Companion Animal Veterinary Clinic-Household Interface. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 10(2), 171. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020171>

Shurina, B. A., & Page, R. C. (2021). Structural Comparisons of Cefotaximase (CTX-M-ase) Sub Family 1. *Frontiers in microbiology*, 12, 688509. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.688509>

Singh, A., & Weese, S. J. (2018). Wound Infections and Antimicrobial Use. In *Veterinary Surgery Small Animal* (2nd ed., Vol. 1, pp. 148–154). Elsevier, Inc.

Spurbeck, R. R., Dinh, P. C., Jr, Walk, S. T., Stapleton, A. E., Hooton, T. M., Nolan, L. K., ... Mobley, H. L. (2012). *Escherichia coli* isolates that carry vat, *fyuA*, *chuA*, and *yfcV* efficiently colonize the urinary tract. *Infection and immunity*, 80(12), 4115–4122. <https://doi.org/10.1128/IAI.00752-12>

Sternberg-Lewerin, S., Boqvist, S., Nørstebø, S. F., Grönthal, T., Heikinheimo, A., Johansson, ... Wasteson, Y. (2022). Nordic Vets against AMR-An Initiative to Share and

Promote Good Practices in the Nordic-Baltic Region. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(8), 1050. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081050>

Stetter, J., Boge, G. S., Grönlund, U., & Bergström, A. (2021). Risk factors for surgical site infection associated with clean surgical procedures in dogs. *Research in veterinary science*, 136, 616–621. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2021.04.012>

Suranigi, S. M., Ramya, S. R., Sheela Devi, C., Kanungo, R., & Najimudeen, S. (2021). Risk factors, bacteriological profile and outcome of surgical site infections following orthopaedic surgery. *Iranian journal of microbiology*, 13(2), 171–177. <https://doi.org/10.18502/ijm.v13i2.5976>

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.1, 2023. <http://www.eucast.org>

Touchon, M., Perrin, A., de Sousa, J. A. M., Vangchhia, B., Burn, S., O'Brien, C. L.,...Rocha, E. P. (2020). Phylogenetic background and habitat drive the genetic diversification of *Escherichia coli*. *PLoS genetics*, 16(6), e1008866. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008866>

Tseng, C. H., Liu, C. W., & Liu, P. Y. (2023). Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBL) Producing Bacteria in Animals. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 12(4), 661. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040661>

Tudu, R., Banerjee, J., Habib, M., Bandyopadhyay, S., Biswas, S., Kesh, S. S.,...Polley, S. (2022). Prevalence and molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* isolated from dogs suffering from diarrhea in and around Kolkata. *Iranian journal of veterinary research*, 23(3), 237–246. <https://doi.org/10.22099/IJVR.2022.42543.6176>

Turk, R., Singh, A., & Weese, J. S. (2015). Prospective surgical site infection surveillance in dogs. *Veterinary surgery: VS*, 44(1), 2–8. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2014.12267.x>

Urban-Chmiel, R., Marek, A., Stępień-Pyśniak, D., Wieczorek, K., Dec, M., Nowaczek, A., & Osek, J. (2022). Antibiotic Resistance in Bacteria-A Review. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(8), 1079. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081079>

Välkki, K. J., Thomson, K. H., Grönthal, T. S. C., Junnila, J. J. T., Rantala, M. H. J., Laitinen-Vapaavuori, O. M., & Mölsä, S. H. (2020). Antimicrobial prophylaxis is considered sufficient to preserve an acceptable surgical site infection rate in clean orthopaedic and

neurosurgeries in dogs. *Acta veterinaria Scandinavica*, 62(1), 53.
<https://doi.org/10.1186/s13028-020-00545-z>

Van Duin, D., & Doi, Y. (2017). The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Virulence*, 8(4), 460–469.
<https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1222343>

Werhahn Beining, M., Hartmann, M., Luebke-Becker, A., Guenther, S., Schaufler, K., Hille, K., & Kreienbrock, L. (2023). Carriage of Extended Spectrum Beta Lactamase-Producing *Escherichia coli*: Prevalence and Factors Associated with Fecal Colonization of Dogs from a Pet Clinic in Lower Saxony, Germany. *Animals: an open access journal from MDPI*, 13(4), 584. <https://doi.org/10.3390/ani13040584>

Williams, J. (2018). The why and how of antimicrobial prophylaxis. *BSAVA Companion*, (11), 4 – 7. <https://doi.org/10.22233/20412495.1118.4>

Woodford, N., Fagan, E. J., & Ellington, M. J. (2006). Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 57(1), 154–155. <https://doi.org/10.1093/jac/dki412>

8. Anexos

Anexo A

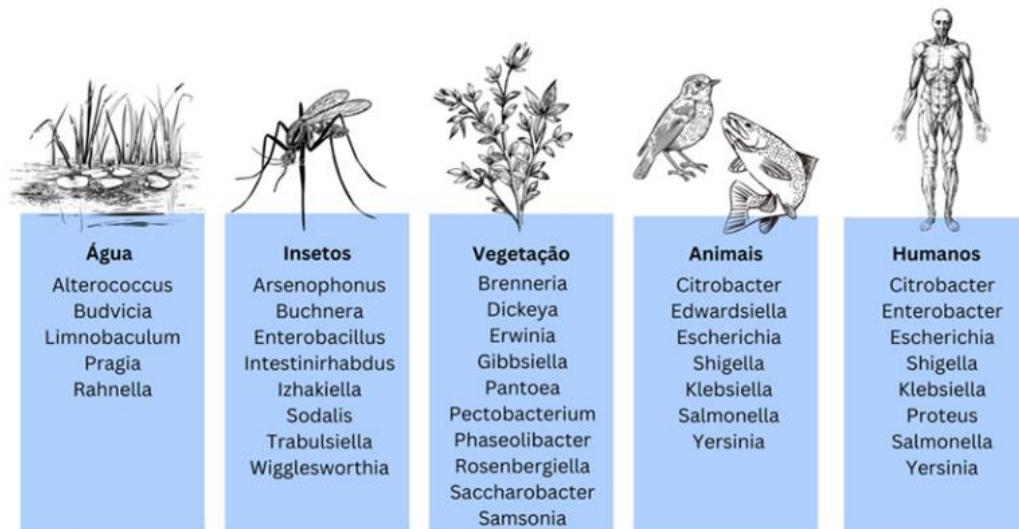


Figura A1 – Distribuição de diversas espécies de Enterobacterales pelos vários nichos ecológicos. (Adaptado de Moxley, 2022).

Anexo B

Tabela B1 – Estudos de prevalência de Enterobacterales produtoras de ESBLs e pAmpC em animais de companhia.

Ano	País	Tipologia estudo	Animal	Mecanismo de resistência	%ESBL/AmpC	Beta lactamase	Espécie	Filogruppo	Fatores de risco	Referência
2023	Alemanha	Transversal	Cão (1000)	ESBL	8,9%	n.a	<i>E. coli</i>	n.a	Animais habitam no exterior/abrigo; Dieta com alimento comercial cru; Contacto com cachorros; Tratamento antibiótico prévio;	(Werhahn Beining <i>et al.</i> , 2023).
2023	Portugal Reino Unido	Longitudinal prospetivo	Cão (90) e gato (20)	ESBL AmpC	12,7% 8,5%	CTX-M-15 CMY- 2	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i>	A B ₂ D	Hospitalização recente (<12meses); Exposição prévia a antibióticos	Menezes <i>et al.</i> , 2023)
2023	Espanha	n.d	Cão (44)	ESBL	25%	CTX-M-9 CTX-M-1 TEM SHV	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i>	n.a	Administração de antibiótico prévio ou corticoesteróide (<1mês); Presença de doença concomitante;	Ortiz-Díez <i>et al.</i> , 2023.
2022	Portugal	Tranversal	Cão e gato (330)	ESBL AmpC	10,6%	CTX-M-15 CMY-2	<i>E. coli</i>	A B ₁ B ₂ D	n.a	Belas <i>et al.</i> , 2022).
2020	Portugal	Longitudinal	Cão (20) Gato (9)	AmpC	n.a	CMY-2 DHA-1	<i>E. coli</i>	n.a	Interação próxima com tutores	Belas <i>et al.</i> , 2020).
2014	Portugal	Transversal	Cão (151)	AmpC ESBL	25 %	CTX-M-15 CTX-M-32 CTX-M-1 CMY-2	<i>E. coli</i>	n.a	Utilização de antibióticos Animais de abrigos/canis	(Belas <i>et al.</i> , 2014)
2013	Alemanha	Longitudinal prospetivo	Cão	ESBL AmpC Carbapenemas e	n.a	CTX-M-15; CMY-2 OXA-48	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i>	n.a	n.a	Stolle, <i>et al.</i> , 2013)
2010	Rep. Checa, França, Alemanha, Hungria, Holanda, Polónia, Espanha, Suécia, Reino Unido	Longitudinal	Cão Gato (608)	ESBL AmpC	3,6%	CTX-M-1 CTX-M-32 CTX-M.15 CTX-M-14 CMY-2	<i>E. coli</i> <i>K. pneumoniae</i>	A B ₂ D	n.a	(Bogaerts <i>et al.</i> , 2015)

Legenda: n.a: não aplicável; n.d: não definido;

Anexo C

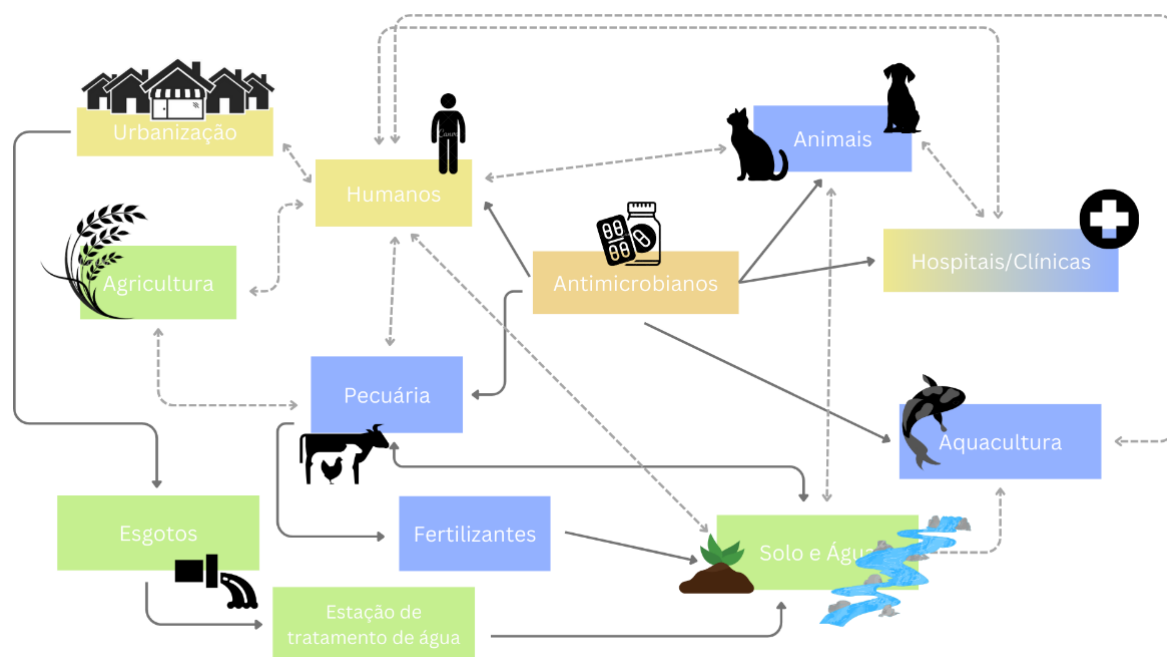


Figura C1 – Representação da disseminação de microrganismos e dos genes de RAM pelos diversos nichos ecológicos. (Adaptado de Caliskan-Aydogan & Alocilja, 2023).

Anexo D



Figura D1 - Prevalência de Enterobacteriales produtoras de ESBLs em percentagem em humanos no mundo com foco Europeu. (Adaptado de Castanheira *et al.*, 2021)

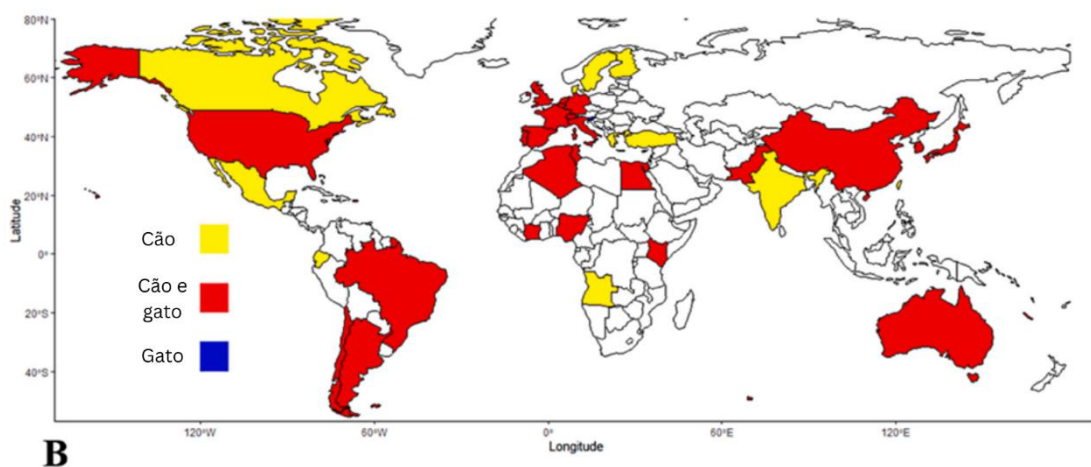


Figura D2 – Estudos realizados sobre a prevalência de Enterobacteriales produtoras de ESBLs em animais de companhia. (Adaptado de Salgado-Caxito *et al.*, 2021).

Anexo E: Tabela E1 - Listagem de estudos pertinente sobre a prevalência de ILC em animais de companhia submetidos a COL

Ano	Dimensão amostra	Tipo de estudo	Objetivo	Tipo procedimento	Fatores de risco identificados	% de ILC		AMCp	AMCpCx	Referência
2011-2015	400 cães	Prospetivo aleatório	Avaliar %ILC no período pós-cirúrgico através do prolongamento da profilaxia antimicrobiana	COL	Idade	ILCp - 5,24% TPLO - 5,13%	ILCp+Pcx - 3,54% TPLO - 2,44%	Sim	Sim	Aiken <i>et al.</i> , 2015
2012-2016	406 cães	Retrospectivo transversal	Avaliar a taxa de ILC e fatores de risco	COL	Colonização por microrganismos MDR	ILC 6,7% TPLO – 7,7% Artodese 25% Artroscopia – 11,8% Estabilização de fraturas - 6,5%		Sim cefazolina 22mg/Kg 30-60 min antes incisão + re-administração a cada 90min	Não	Välkki <i>et al.</i> , 2020
2009-2010	93 cães	n.d	Avaliar o efeito da administração de antibióticos orais para prevenção de ILC em COL	COL	Duração anestésica total	ILC – 12,9% ILCAMP – 21,3% ILC AMP – 4,3%		Sim, cefuroxima 60 min antes incisão	Sim, cefalexina 7 dias	Pratesi <i>et al.</i> , 2015
2017-2018	465 cães	n.d	Avaliar fatores de risco para o desenvolvimento de ILC	COL	Duração do procedimento cirúrgico	ILC – 5%		Sim, Antibiótico administrado 30–60 min antes da primeira incisão a cada 90-120 minutos de cirurgia..	n.d	Stetter <i>et al.</i> , 2021
2010-2011	310 cães	Prospetivo e cohort	Incidência de ILC e identificação de fatores de risco	COL	Presença de implante Hipotensão Classificação cirúrgica	ILC – 5,2% TPLO – 7,5% ILC limpa – 3,2% ILC suja – 20%		n.d	n.d	Turk <i>et al.</i> 2015
2011-2018	541 cães	Retrospectivo	Identificar fatores de risco associados a TPLO	COL	Presença de implante Idade	ILCpoc-cx – 6,6% ILC amp- 20,1% ILC TPLO -10,8%		Sim, cefazolina 60 min antes da incisão e readministração a cada 90min	Sim	Hagen, <i>et al.</i> , 2020

Legenda: AMCp – antibiótico profilático; AMCpCx – antibiótico pós-cirúrgico; COL: cirurgia ortopédica limpa; ILC: infecção do local cirúrgico; ILCp - infecção do local cirúrgico em animais submetidos a antibioterapia profilática; ILCpCx - infecção do local cirúrgico em animais submetidos simultaneamente antibioterapia profilática e pós cirúrgica; MDR: multirresistente; n.d: não definido; TPLO: Osteotomia de nivelamento do plateau tibial..

Anexo F

Questionário:

Data	CAMV	Nome animal	ID	Idade

Espécie	Raça	Inteiro/ esterilizado	Sexo	Cond. corporal

Tutor (privado/associação)	Hipoalbuminémia: Não Sim
Hospitalização antes cirurgia: Não Sim (nº dias _____)	
Fármacos imunossupressores: Não Sim (quais e data última toma)	
Antimicrobianos últimos 12 meses: Não Sim (quais e data última toma)	
Comorbidades: Não Sim (quais)	
ASA I II III IV V	
Prot. Anestésico (fármaco/dose):	
Propofol sem benzalcónio: Não Sim	
Procedimento cirúrgico:	
Implante: Não Sim (tipo implante)	
Pano cirurgia: aderente não aderente	
Anestesia regional: Não Sim (fármacos/dose)	
Temperatura intra-cirúrgica: T início CX _____ °C T fim CX _____ °C	
Hipotensão intra-cirúrgica: Não Sim	
Duração cirurgia: _____ minutos	Duração anestesia: _____ minutos
Observações:	

Seguimento (informação recolhida posteriormente):

Autotraumatismo ferida cirúrgica: Não Sim
Penso pós-operatório: Não Sim
Antimicrobiano pós-operatório: Não Sim (Qual/dose) _____

Dias	Sem SSI	SSI (selecionar**)	Cultivo (resultado)
7º dia			
30º dia			
**Critérios de diagnóstico SSI (Surgical Site Infection): a) drenagem purulenta/ seropurulenta da incisão; b) deiscência espontânea ou formação de abscesso na incisão; c) microrganismos identificados em amostra recolhida forma asséptica da incisão; d) incisão deliberadamente aberta em combinação com pelo menos um dos seguintes sinais ou sintomas: tumefação localizada, dor localizada, eritema, temperatura local aumentada ou febre (> 39°C);			

Figura F1 – Questionário utilizado para a recolha de informação demográfica, cirúrgica e anestésica sobre os animais presentes no estudo.

Anexo G

Filogrupo	Gene (pb)			
	<i>gadA</i> (373pb)	<i>chuA</i> (288 pb)	<i>yjaA</i> (211 pb)	<i>TspE4.C2</i> (152 pb)
A	+	-	-	-
	+	-	+	-
B ₁	+	-	-	+
B ₂	+	+	+	+
	+	+	+	-
	+	+	-	+
D	+	+	-	-
	+	+	-	+

Figura G1 – Representação esquemática da interpretação dos genes e respectivos filogrupos. (Adaptado de Clermont *et al.*, 2021).

ESBLs/pAmpC PRODUCING ENTEROBACTEREALES IN FECAL SAMPLES OF COMPANION ANIMALS FROM A HOSPITAL SETTING – IN VIVO STUDY



I. Chambino¹, J. dos Santos^{1,2,3,4}, L. Ribeiro¹, L. Martins¹, P. Cabral^{1,2,3}, D. Cardoso^{1,2,3}, L. Chambel², S. Campos^{1,2}, R. Onça¹, J. Martins^{1,2,3,4}, A. Belas^{1,2,6}

¹ Faculty of Veterinary Medicine, Lusófona University Center, Lisbon, Portugal

² Veterinary and Animal Research Center (CECAV), UTAD, Vila Real, Portugal

³ Associate Laboratory for Animal and Veterinary Sciences (AL-AVMS), 1600-471 Lisbon, Portugal

⁴ Center for the Research and Technology of Agro-Environmental and Biological Sciences (CITA), 1149-015, Vila Real, Portugal

⁵ VetGest – Veterinary Hospital, Celis, Portugal

⁶ OneVet Group – Cascais, Portugal

⁷ Veterinary and Animal Research Center (CECAV), Lusófona University Center, Lisbon, Portugal

BACKGROUND

The extended and irresponsible usage of antibiotics has lead, over the years, to an increase of antibiotic resistance and multidrug resistance (MDR) bacteria. Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) and plasmid mediated AmpC (pAmpC) (*Bajaj, Singh & Virdi, 2016*) currently, represent a serious threat to Human health, considering it leads to therapeutic failure of many diseases and also reduce treatment options (*Riwu, Effendi, & Rantam, 2020*)(*Sawa, Kooguchi, & Moriyama, 2020*). In addition, CoVID-19 pandemic has led to an increase of interactions between humans and their companions animals contributing to a possible widespread of these MDR bacteria (*Langford et al., 2022*). The aim of this study was to evaluate and characterize the presence of ESBL/pAmpC producing Enterobacterales in fecal samples of companion animals undergoing clean orthopedic surgical procedures.

METHODS

During March until June of 2023, fecal swab samples (n=64) from companion animals (dogs and cats) were collected from three different Veterinary Hospitals in Lisbon area, Portugal. An inquiry was performed regarding general information about the patient, for example: age, body condition, sex, Medical conditions such as possible underlying comorbidities, previous antimicrobial administration (up to 12 months), with the objective of identifying possible risk factors for the appearance of ESBLs/pAmpC.

Fecal swab samples were inoculated on MacConkey agar plates supplemented with 1.5 µg/mL cefotaxime and 1.0 µg/mL meropenem. Antimicrobial susceptibility testing and interpretation were performed using the disk diffusion method according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines.

After performing a presumptive identification, bacterial species and the presence of β-lactamase genes (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{DHA-1}, *bla*_{CMY-2}) were confirmed by PCR.

Phylogenetic typing was performed in all third generation cephalosporin resistant (3GC-resistant) *Escherichia coli* isolates to determine the main phylogenetic groups (A, B1, B2, and D) by PCR. Presumptive bacteria species identification, were also confirmed by PCR.

This project was approved by Bioethics and Animal Welfare Ethics Commission (CEBEA).

RESULTS

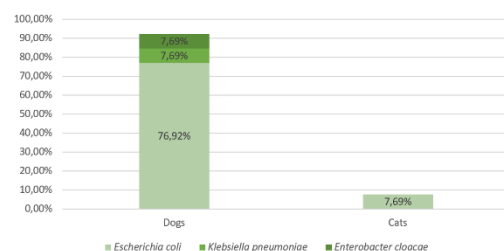


Figure 1 - Distribution of ESBL-producing Enterobacterales isolates by animal species

In this study, 85.9% (n=55/64) animals belonged to private owners, meanwhile 4.7% (n=3/64) belonged to shelters. Approximately, 20.3% (n=13/64) of the companion animals were colonized with ESBL-producing Enterobacterales. Out of these, 92.3% (n = 12/13) were dogs and 20% of cats (n=1/13). About 84.6% (n=11/13) were identified as *Escherichia coli*, 7.7% (n=1/13) as *Klebsiella pneumoniae* and 7.7% (n=1/13) as *Enterobacter cloacae*. Figure 1 demonstrates further distribution of Enterobacterales species by companion animal species.

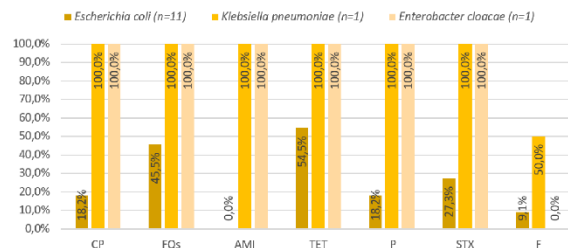


Figure 2 - Percentages of resistance to different classes of antibiotics by bacteria isolates.

Legend: CP - Carbapenems; FQs - Fluoroquinolones; AMI - Aminoglycosides; TET - Tetracycline; P - Phenolics; STX - trimethoprim/sulfamethoxazole; F - Nitrofurantoin.

3GC-resistant *E. coli* were also resistant to carbapenems (18.2%, n= 2/11), fluoroquinolones (45.5%, n=5/11), tetracyclines (54.5%, n=6/11), trimethoprim/sulfamethoxazole (27.3%, n =3/11), phenolics (18.2%, n=2/11), nitrofurantoin (9.1%, n = 1/11). Regarding, *K. pneumoniae* and *E. cloacae* isolates demonstrated resistance to fluoroquinolones, aminoglycosides, tetracyclines, trimethoprim/sulfamethoxazole and phenolics. *K. pneumoniae* also shown resistance to nitrofurantoin (Figure 2).

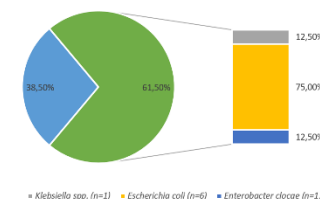


Figure 3 - Distribution of MDR bacteria by species.

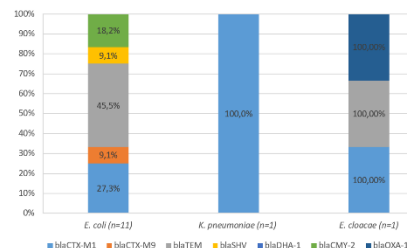


Figure 4 - Identification of β-lactamase encoding genes in 3GC resistance bacteria isolates.

About, 45.5% of the *E. coli* isolates (n = 5/11) harbored the *bla*_{TEM} gene, 27.3% (n=3/11) harbored the *bla*_{CTX-M1} gene, 9.1% (n = 1/11) harbored the *bla*_{CTX-M9} gene, 9.1% the *bla*_{SHV} gene (n = 1/11) and 9.1% (n = 1/11) carried the combination of *bla*_{CTX-M1} group+*bla*_{TEM} genes and the combination of *bla*_{TEM}+*bla*_{SHV} genes. Approximately, 18.2% (n=2/11) of isolates harbored *bla*_{CMY-2} gene. Regarding *K. pneumoniae* and *E. cloacae* isolates both were positive for *bla*_{CTX-M1} gene. Meanwhile *E. cloacae* also harbored both *bla*_{TEM} and *bla*_{OXA-1} genes. (Figure 4)

Moreover, *E. coli* isolates belonged mainly to B1 phylogenetic group (54.5%, n= 6/11) followed by group-D (27.3%, n=3/11) and (9.1%, n=1/11) were identified as group-A and group-B2.

Among 3GC-resistant *E. coli* isolates, 63.6% (n=7/11) were ESBL-producers and 18.2% (n=2/11) were pAmpC beta-lactamases producers.

CONCLUSION

The results obtained in this study demonstrated the existence of MDR bacteria in companions animals. These isolates showed the diversity of genes responsible for such resistance. Thus the combination of more than one family of genes due to horizontal transfer, miss use of antibiotics leads to the emergence of MDR bacteria. This study could be helpful for infection management and prevention. It is a priority for health care providers to prevent transmission and widespread of MDR bacteria by implementing a variety of safety measures such as: active surveillance by rapid diagnosis, using standard precautions (hand hygiene, protective equipment) and proper decontamination methods.

References

- Bajaj, P., Singh, N. S., & Viri, J. S. (2016). *Escherichia coli* β-Lactamases: What Really Matters. *Frontiers in microbiology*, 7, 417.
- Langford, B. J., Soucy, J. R., Leung, V., So, M., Kwan, A. T. H., Portnoy, J. S., Bertagnolo, S., Raybarran, S., MacFadden, D. R., & Daneman, N. (2022). Antibiotic resistance associated with the COVID-19 pandemic: a systematic review and meta-analysis. *Clinical microbiology and infection: the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 25(3), 302–309.
- Riwu, K. H. P., Effendi, M. H., & Rantam, F. A. (2020). A Review of Extended Spectrum β-Lactamase (ESBL) Producing *Klebsiella pneumoniae* and Multidrug Resistant (MDR) on Companion Animals. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(7).
- Sawa, T., Kooguchi, K., & Moriyama, K. Molecular diversity of extended spectrum β-lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *Japanese case report*, 13 (2020). <https://doi.org/10.1186/s40550-020-00425-6>

Funding: This study was funded by Cooperativa de Formação e Animação Cultural CRL (COFAC), Universidade Lusófona.



O conteúdo desta dissertação de mestrado foi apresentado sob a forma de Poster científico submetido e selecionado a concurso no XIX Congresso Internacional Veterinário Montenegro, a 13 e 14 de outubro de 2023, Portugal.