

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Franciele Caroline Adam

**DETERMINAÇÃO DE CMY-2 EM ISOLADOS DE *Escherichia coli* PROVENIENTES  
DE FRANGO DE CORTE**

Porto Alegre

2018

Franciele Caroline Adam

**DETERMINAÇÃO DE CMY-2 EM ISOLADOS DE *Escherichia coli* PROVENIENTES  
DE FRANGO DE CORTE**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Área de habilitação: Microbiologia

Orientador: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Andreza Francisco Martins  
Co-orientador: MSc Silvia Adriana Mayer Lentz

Porto Alegre

2018

CIP - Catalogação na Publicação

Adam, Franciele Caroline

Determinação de CMY-2 em isolados de Escherichia coli provenientes de frango de corte / Franciele Caroline Adam. -- 2018.

55 f.

Orientadora: Andreza Francisco Martins.

Coorientadora: Silvia Adriana Mayer Lentz.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Resistência aos antimicrobianos. 2. CMY-2. 3. AmpC Beta-Lactamases. 4. Cefalosporinases. 5. Frango de corte. I. Martins, Andreza Francisco, orient. II. Lentz, Silvia Adriana Mayer, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Franciele Caroline Adam

**DETERMINAÇÃO DE CMY-2 EM ISOLADOS DE *Escherichia coli* PROVENIENTES  
DE FRANGO DE CORTE**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Aprovado em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Juliana Caierão – UFRGS

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Fabiana Quoos Mayer – IPVDF

---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Andreza Francisco Martins – UFRGS (orientador)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora, Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Andreza Francisco Martins, por ter confiado a mim esse projeto e fornecido todo o suporte para a sua realização, por toda a paciência e disponibilidade para me receber e tirar minhas dúvidas. A oportunidade de trabalhar com seu grupo de pesquisa foi enriquecedora e fundamental na minha formação profissional como biomédica.

A minha coorientadora, Silvia, por toda a paciência para me ensinar as técnicas realizadas, assim como pela disponibilidade para me acompanhar e me ajudar sempre que foi necessário.

A todas as meninas que integram nosso grupo de pesquisa (Gabriele, Roberta, Silvia, Rafaela, Thaianne e Juliana), agradeço pela paciência para me ensinarem sobre os diferentes projetos e diferentes técnicas. Vocês contribuíram muito para a minha formação, e sou muito grata por isso. Agradeço em especial a Roberta, minha biomédica mais querida do mundo, que na reta final do trabalho não mediu esforços em me ajudar para que os testes acabassem de acordo com o cronograma; sem tua ajuda eu jamais teria conseguido, muito obrigada por me auxiliar tanto na bancada quanto tirando minhas dúvidas via mensagens.

A todo o pessoal do Laboratório de Microbiologia Aplicada, presentes no meu dia-a-dia, que me proporcionaram boas risadas e um ambiente bom de trabalhar. Se eu não me desesperei com todos os problemas que surgiram é porque vocês me ajudaram a ficar mais tranquila.

Aos meus queridos colegas de curso Lucas, Alexandre, Jeferson, Paula, Letícia, Martina, Mônia, Giovana e Gabriel, por todo o companheirismo nessa jornada que não foi nada fácil. Chegar até aqui com a amizade de vocês é recompensador e me deixa muito feliz.

Agradeço ao meu amor, Roberto, por toda a paciência que teve comigo nessa etapa, e por seu esforço de me tranquilizar mesmo nos dias mais difíceis. Tua positividade, teu amor e teu apoio foram essenciais.

Agradeço principalmente aos meus pais, Claudete e Lauri, por todo o apoio que sempre forneceram para que eu realizasse meus sonhos. Se hoje estou prestes a me formar em uma das melhores universidades do país é porque vocês não mediram esforços para me ajudar a chegar até aqui, e isso foi essencial. Se cheguei até aqui, foi por vocês. Obrigada.

## RESUMO

A resistência antimicrobiana é um dos maiores problemas de saúde da atualidade pois afeta e restringe as opções terapêuticas para diversas infecções. As enterobactérias são microrganismos gram-negativos ubiqüitários, sendo a *E. coli* a principal bactéria colonizadora do trato gastrointestinal de humanos e de animais. Essa família de microrganismos frequentemente possui cefalosporinas, seja no cromossomo ou em elementos genéticos móveis. Como exemplo podemos citar as AmpC  $\beta$ -lactamases, que são cefalosporinas que conferem resistência contra penicilinas, primeira, segunda e terceira gerações de cefalosporinas, e que são resistentes à inibição por ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. CMY-2 é a AmpC  $\beta$ -lactamase mais comum em animais, mas sua prevalência mundial ainda é baixa em comparação com os genes de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBLs). Assim, o objetivo do trabalho foi determinar a presença de *bla*<sub>CMY-2</sub> em isolados de *E. coli* provenientes de frango de corte, visto que os animais podem servir como reservatório deste e de outros genes de resistência. Foram analisados 33 isolados através do teste de disco difusão, para determinar o perfil de susceptibilidade contra ceftazidima, cefotaxima, meropenem, imipenem, ciprofloxacino, cefepime, doxicilina, amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina/sulbactam, piperacilina/tazobactam, amicacina, gentamicina, sulfametoxazol/trimetoprima e ampicilina; e de microdiluição em caldo, para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para ceftazidima e cefotaxima. A técnica de PCR foi utilizada para detectar o gene *bla*<sub>CMY-2</sub>. Dos 33 isolados analisados, 25 (75,76%) foram positivos para *bla*<sub>CMY-2</sub>. Todos os isolados exibiram perfil multirresistente, além de todos terem apresentado resistência a ceftazidima e cefotaxima. Tanto o CIM50 quanto o CIM90 de ceftazidima foram de 64  $\mu$ g/mL, enquanto que para cefotaxima o CIM50 foi de 16  $\mu$ g/mL e o CIM90 foi de 32  $\mu$ g/mL. Oito isolados foram negativos para *bla*<sub>CMY-2</sub> mas apresentaram perfil de resistência contra as cefalosporinas de terceira geração, indicando que podem possuir outro mecanismo associado. A detecção do gene nos isolados provenientes dos frangos de corte sugere que esses animais podem estar servindo como reservatório genético dessa AmpC  $\beta$ -lactamase. O número de isolados positivos para *bla*<sub>CMY-2</sub> encontrados em nosso trabalho foi superior ao encontrado em outros estudos realizados no Brasil e no mundo, mostrando que a disseminação do gene vem aumentando gradativamente.

Palavras-chave: Resistência aos antimicrobianos. CMY-2. AmpC  $\beta$ -lactamases. Cefalosporinas. Frango de corte.

## ABSTRACT

Antimicrobial resistance is one of the biggest health concerns currently, because it affects and restricts therapeutic options for several infections. *Enterobacteriaceae* are ubiquitous gram-negative microorganisms, with *E. coli* being the main colonizing bacteria in humans and animals gastrointestinal tract. This family of microorganisms often carries cephalosporinase genes, either on chromosome or on mobile genetic elements. As an example we can cite AmpC  $\beta$ -lactamase, which are cephalosporinases that confer resistance against penicillins, first, second and third generation of cephalosporins, and which are resistant to inhibition by clavulanic acid, sulbactam and tazobactam. CMY-2 is the most common AmpC  $\beta$ -lactamases in animals, but its worldwide prevalence is still low comparing with extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) genes. The purpose of this research was to determine the presence of *bla*<sub>CMY-2</sub> in *E. coli* isolates from broiler chicken, since these animals may serve as reservoirs for this and for others resistance genes. Thirty-three isolates were analyzed by disc-diffusion method, to determine the susceptibility profile against ceftadizime, cefotaxime, meropenem, imipenem, ciprofloxacin, cefepime, doxicillin, amoxicillin/clavulanic acid, ampicillin/sulbactam, piperacillin/tazobactam, amikacin, gentamycin, sulfamethoxazole/trimethoprim and ampicillin; and by microdilution broth, to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) against ceftazidime and cefotaxime. The PCR technique was used to detect *bla*<sub>CMY-2</sub>. From 33 isolates analyzed, 25 (75, 76%) were *bla*<sub>CMY-2</sub> positive. All isolates showed multidrug-resistant profiles, and they all were resistant to ceftazidime and cefotaxime. For ceftazidime, both MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> were 64  $\mu$ g/mL, whereas for cefotaxime MIC<sub>50</sub> was 16  $\mu$ g/mL and MIC<sub>90</sub> was 32  $\mu$ g/mL. Eight isolates *bla*<sub>CMY-2</sub> negative showed a resistant profile to third generation cephalosporins, indicating that they may express different resistant mechanisms. Finding this gene in broiler chicken isolates suggests that these animals may serve as genetic reservoir of this AmpC  $\beta$ -lactamase. The number of *bla*<sub>CMY-2</sub> producer isolates found in our work was higher than those found in other researches performed in Brazil and worldwide, showing that the spread of this gene has been increasing gradually.

Keywords: Antimicrobial resistance. CMY-2. AmpC  $\beta$ -lactamases. Cephalosporinase. Broiler chicken.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO COMPREENSIVA .....</b>	<b>8</b>
1.1	ENTEROBACTÉRIAS .....	9
1.1.1	<i>Escherichia coli</i> .....	9
1.2	RESISTÊNCIA AOS BETA-LACTÂMICOS.....	10
1.2.1	AmpC $\beta$ -lactamases.....	12
	1.2.1.2 CMY-2 .....	13
1.3	JUSTIFICATIVA .....	14
1.4	OBJETIVOS.....	15
1.4.1	Objetivo geral.....	15
1.4.2	Objetivos específicos.....	15
<b>2</b>	<b>ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>31</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>32</b>
	<b>APÊNDICE A – PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR .....</b>	<b>36</b>
	<b>ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA VETERINARY MICROBIOLOGY .....</b>	<b>39</b>



## 1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

A resistência antimicrobiana é a capacidade dos microrganismos resistirem aos efeitos dos antimicrobianos, dificultando o tratamento de infecções. Ela restringe as opções terapêuticas disponíveis para o tratamento, além de aumentar os custos relacionados às internações (LEVY; MARSHALL, 2004).

Diferentes fatores contribuem para esse processo adaptativo dos microrganismos, incluindo a interação entre humanos, animais e ambiente (KÖCK et al., 2017). Essa interconexão entre esses três grupos é refletida no conceito “One Health” (BUTAYE et al., 2014). O “One Health” correlaciona a saúde humana, animal e o ambiente num só contexto. Utiliza uma abordagem colaborativa, trabalhando multidisciplinarmente, para entender como as doenças se disseminam entre os diferentes temas (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2017).

Fundamentalmente, as bactérias apresentam suscetibilidade a novos antimicrobianos, mas em decorrência de sua utilização começam a emergir cepas resistentes, que apresentam concentrações inibitórias mínimas maiores, e a pressão seletiva exercida sobre o microrganismo favorece a multiplicação das cepas resistentes em detrimento das suscetíveis ao fármaco (KÖCK et al., 2017; MARTINEZ, 2014). Os genes de resistência podem ser transferidos entre diferentes populações bacterianas horizontalmente, o que permite a troca de elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons, de uma bactéria para outra, permitindo que se disseminem rapidamente (LEVY; MARSHALL, 2004). O processo de transferência pode ocorrer entre diferentes espécies nos mais variados ecossistemas.

Com a utilização irracional dos antimicrobianos, que não só são empregados no tratamento de doenças, mas na prevenção, controle, e melhoramento do ganho de peso animal, os animais de produção podem servir como reservatórios de genes de resistência (MCEWEN; COLLIGNON, 2018). O uso indiscriminado estimula a seleção e disseminação de cepas resistentes, possibilitando a transferência aos seres humanos através do contato direto e/ou alimentação (TOLLEFSON; KARP, 2004).

## 1.1 ENTEROBACTÉRIAS

As enterobactérias são bacilos Gram-negativos anaeróbios facultativos que se locomovem por flagelo e que não formam esporos. Formam um dos grupos bacterianos mais importantes, fazendo parte da microbiota do trato gastrintestinal de humanos e animais, e são o maior grupo e o mais heterogêneo entre os bacilos Gram-negativos de importância clínica. São fermentadoras de glicose, reduzem nitrato a nitrito, são catalase-positivas e oxidase-negativas (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Estes microrganismos são ubiqüitários, sendo encontrados no solo, na água e na vegetação. São responsáveis por causar diversas infecções clínicas em humanos, como bacteremias, infecções do trato urinário e infecções intestinais (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014). Algumas bactérias da família Enterobacteriaceae, como todos os sorotipos de *Shigella* e alguns de *Salmonella* estão sempre associadas a doenças humanas, enquanto outras, como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, são microrganismos comensais que podem causar infecções oportunistas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). As infecções podem se originar de reservatórios animais, de humanos carreadores, ou por transmissão endógena do microrganismo, por exemplo, por ruptura intestinal (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

As enterobactérias possuem fímbrias que auxiliam na aderência a superfícies e mucosas. A troca de informação genética entre as bactérias Gram-negativas pode ocorrer através de *pili* sexuais, que são projeções da superfície da célula doadora que entram em contato com a célula receptora, permitindo a troca de genes de resistência e de outros fatores de virulência (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

### 1.1.1 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é um bacilo Gram-negativo anaeróbio facultativo. É geralmente móvel, possui flagelos e fímbrias. É fermentadora de lactose, o que dá a coloração rosa característica às colônias no ágar MacConkey; os testes do indol e do vermelho de metila são

positivos, enquanto os testes de Voges-Proskauer e da utilização do citrato são negativos. Não é produtora de H<sub>2</sub>S, não hidrolisa a uréia, e é produtora de lisina descarboxilase (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014; QUINN et al., 2007).

A *E. coli* é a bactéria mais abundante da microbiota do intestino delgado de homens e animais (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014). Sua presença na água e nos alimentos é um indicador de contaminação fecal. É o patógeno mais comum das infecções do trato urinário, como a cistite e a pielonefrite; podendo causar gastroenterite, infecções extra-intestinais, meningites e sepse (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014). As linhagens de *E. coli* que colonizam o trato gastrointestinal não possuem virulência para desenvolver infecções nesse local, mas na presença de uma perfuração intestinal, por exemplo, podem causar infecções oportunistas extra-intestinais. Já as linhagens toxigênicas possuem fatores de virulência que favorecem a colonização das mucosas, permitindo o desenvolvimento de patologias mais graves (QUINN et al., 2007; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

## 1.2 RESISTÊNCIA AOS BETA-LACTÂMICOS

Os  $\beta$ -lactâmicos são antimicrobianos que inibem a síntese de peptidoglicano da parede celular bacteriana pela inibição da transpeptidase ou por ligação as proteínas de ligação de penicilinas (PLP) (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012). A utilização indiscriminada desses antimicrobianos estimulou as bactérias a desenvolverem mecanismos de resistência a essas drogas. Os principais mecanismos são a diminuição da absorção do fármaco pela perda de porinas, modificação da proteína alvo de ligação do fármaco, hiperexpressão de bombas de efluxo e mecanismos enzimáticos de degradação (GIEDRAITIENĖ et al., 2011).

As porinas são proteínas transmembrana formadoras de canais, e são responsáveis por permitir que os antimicrobianos entrem na célula bacteriana (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012); a perda das porinas impede a absorção adequada do antimicrobiano pela falta dessas proteínas. A ocorrência de mutações nas proteínas ligantes do fármaco diminui a afinidade deste por seu receptor alvo, impedindo que ele exerça seu efeito sobre a bactéria (LEVY; MARSHALL, 2004). As bombas de efluxo são responsáveis por retirar o fármaco do interior celular, impedindo que o fármaco consiga atuar (GIEDRAITIENĖ et al., 2011). Por fim, os mecanismos enzimáticos são os mais importantes, envolvendo enzimas capazes de degradar

ou inativar o fármaco, e dessas enzimas, as  $\beta$ -lactamases são as mais prevalentes (GIEDRAITIENĖ et al., 2011).

As  $\beta$ -lactamases são enzimas responsáveis pela hidrólise dos  $\beta$ -lactâmicos e podem ser classificadas de duas principais formas. Segundo Ambler, (1980), elas são divididas em 4 classes. As classes A, C e D incluem as enzimas que hidrolisam uma serina residual no sítio ativo, enquanto a classe B são metalo-proteinases dependentes de zinco para facilitar a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico. Já Bush e Jacoby, (2010) classificam estas enzimas conforme sua funcionalidade. São divididas em 3 grupos: no grupo 1 se encontram as cefalosporinases, mais ativas sobre as cefalosporinas e resistentes aos inibidores de  $\beta$ -lactamases; no grupo 2 estão as  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBLs), que são ativas contra as cefalosporinas de primeira à quarta gerações, e suscetíveis aos inibidores de  $\beta$ -lactamases; e no grupo 3 as metalo- $\beta$ -lactamases (MBLs), capazes de hidrolisar os carbapenêmicos (BATCHELOR; THRELFALL; LIEBANA, 2005; BUSH; JACOBY, 2010; LIEBANA et al., 2013).

As MBLs necessitam de um íon zinco como cofator em seu sítio ativo para hidrolisar o seu substrato, que são os carbapenêmicos, e não são inibidas por ácido clavulânico ou tazobactam. Podem ser inibidas por quelantes de íons metálicos, como o EDTA e ácido dipicolínico. Algumas enzimas desse grupo incluem IMP, VIM e NDM. Outras carbapenemases de importância clínica que não estão nesse grupo são a OXA e a KPC (BUSH; JACOBY, 2010).

As ESBLs apresentam atividade tanto contra as penicilinas como também contra as cefalosporinas de espectro estendido, como cefotaxima e ceftazidima. Dentre as enzimas pertencentes a esse grupo podemos citar TEM-2, SHV-1, CTX-M, entre outras. São sensíveis às cefamicinas e aos carbapenêmicos, assim como aos inibidores de  $\beta$ -lactamases. As cepas produtoras de ESBLs podem ser multirresistentes, pois os plasmídeos que carregam os genes de ESBLs podem carrear também genes que conferem resistência a outras classes de antimicrobianos, como aos carbapenêmicos, fármacos que costumam ser usados para tratar infecções graves causadas por bactérias produtoras de ESBLs (ALVES et al., 2004; BUSH; JACOBY, 2010).

Genes que codificam cefalosporinases frequentemente são encontrados nos cromossomos de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, além de serem adquiridos nos elementos genéticos móveis por transferência gênica horizontal. Eles conferem resistência às

cefalosporinas e, em menor proporção, às penicilinas. Não são inibidos pelo ácido clavulânico ou pelo tazobactam. As AmpC  $\beta$ -lactamases estão incluídas neste grupo.

### 1.2.1 AmpC $\beta$ -lactamases

As AmpC  $\beta$ -lactamases são cefalosporinases encontradas no DNA cromossômico de muitas bactérias Gram-negativas, como a *Escherichia coli*. São enzimas capazes de degradar as penicilinas, as cefalosporinas, as cefamicinas, e em menor taxa, os monobactâmicos. Não são capazes de degradar a 4ª geração de cefalosporinas (cefepime) e nem os carbapenêmicos (EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS (BIOHAZ), 2011; JACOBY, 2009). São resistentes à inibição por ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam, embora existam estudos mostrando que pode ocorrer a inativação de  $\beta$ -lactamases da classe C por tazobactam (BABINI et al., 1998; BONOMO et al., 2001). Segundo a classificação funcional de Bush e Jacoby, as enzimas cefalosporinases se enquadram no grupo 1; e segundo a classificação de Ambler, pertencem a classe molecular C (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY, 2010).

Tem ocorrido um aumento dos relatos de genes AmpC encontrados em plasmídeos, o que significa que a disseminação destes genes pode ser facilitada pela transferência de elementos genéticos móveis. Dos genes AmpC encontrados em plasmídeos, o CMY-2 é o mais comum (EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS (BIOHAZ), 2011; JACOBY, 2009). Outros exemplos de genes AmpC promotores de resistência às cefalosporinas são FOX, MOX, DHA, ACC, MIR, ACT e LAT (BATCHELOR; THRELFALL; LIEBANA, 2005).

A resistência causada por enzimas do tipo AmpC pode ocorrer não só pelo mecanismo de resistência adquirida, que envolve a troca de elementos genéticos móveis entre as bactérias, como também por resistência cromossômica, que envolve a expressão do gene *ampC* por indução pela proteína AmpR, cujo gene fica adjacente ao *ampC* (BATCHELOR; THRELFALL; LIEBANA, 2005). O mecanismo de indução, entretanto, não ocorre em *Escherichia coli*, pois o gene *ampR* não fica adjacente ao *ampC*, não sendo possível induzir a expressão de AmpC. O mecanismo pode funcionar quando ocorre mutação no promotor do gene *ampR*, levando a uma hiper-expressão da proteína que acaba por induzir resistência em *E. coli* (PARTRIDGE, 2015).

### 1.2.1.2 CMY-2

A *bla*<sub>CMY-2</sub> é a AmpC β-lactamase plasmidial mais comum no mundo, tendo em vista sua ampla disseminação geográfica (JACOBY, 2009). Tem sido encontrada em bactérias de origem humana e de origem animal. É uma cefalosporinase pertencente a classe molecular C de Ambler, e não sofre inibição pelos inibidores de β-lactamases (JACOBY, 2009). Ainda que seja capaz de hidrolisar penicilinas e cefalosporinas até a terceira geração, o seu substrato de preferência é a ceftazidima (PHILIPPON; ARLET; JACOBY, 2002).

Embora a prevalência de AmpC β-lactamases seja baixa, tem se notado o aumento de casos identificados com o decorrer dos anos, sendo que a maioria deles corresponde a enzimas do tipo CMY-2, e os estudos epidemiológicos demonstraram que, dentre as AmpC β-lactamases identificadas em bactérias como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, mais de 80% correspondem a CMY-2 (DENISUIK et al., 2013; MIRÓ et al., 2013; PASCUAL et al., 2015). Além das AmpC β-lactamases terem sido identificadas na população humana, já é de conhecimento sua presença em bovinos, suínos e aves, visto que o número de relatos de isolamento de bactérias carreadoras do gene *bla*<sub>CMY-2</sub> em animais de produção ao redor do mundo também tem aumentado (BEN SALLEM et al., 2012; FANG et al., 2015; PARK et al., 2012).

No Brasil, o primeiro relato da presença de CMY-2 ocorreu em um isolado clínico de *E. coli* resistente a carbapenêmicos em São Paulo (PAVEZ et al., 2008). Ainda assim, são poucos os estudos reportando a detecção do gene *bla*<sub>CMY-2</sub>, sendo que os trabalhos mais atuais apontaram a presença de CMY-2 em isolados de *Salmonella sp.* provenientes de carne de frango e também de peru, e os isolados carreadores dos genes foram encontrados, em sua maioria, no estado de São Paulo (ALVES et al., 2004; CAMPANA et al., 2013; CUNHA et al., 2017; DA SILVA et al., 2017; MONTE et al., 2017; MOURA et al., 2018). O que todos os estudos têm em comum é a baixa prevalência de CMY-2.

### 1.3 JUSTIFICATIVA

O uso indiscriminado de antimicrobianos tanto na medicina humana quanto na medicina animal propicia a emergência e disseminação dos microrganismos resistentes. O contato entre os animais e os produtores permite que os genes de resistência de origem humana sejam transferidos para o animal de produção, assim como os genes de origem animal podem ser transferidos para os seres humanos; além do contato direto, essa troca também pode ocorrer através do meio ambiente e da cadeia alimentar.

O monitoramento de bactérias carreadoras de genes de resistência, como as AmpC  $\beta$ -lactamases, presentes em animais de produção é de extrema importância, pois caracteriza esses animais como reservatórios de genes de resistência antimicrobiana. Estudos na área de resistência antimicrobiana são importantes para que sejam estabelecidas medidas preventivas contra a disseminação da resistência para os mais variados segmentos do planeta, sendo eles ambientais ou animais.

## 1.4 OBJETIVOS

### 1.4.1 Objetivo geral

Determinar a presença da AmpC  $\beta$ -lactamase CMY-2 em isolados de *Escherichia coli* provenientes de frangos de corte.

### 1.4.2 Objetivos específicos

1. Estabelecer o perfil de susceptibilidade dos isolados aos antimicrobianos;
2. Padronizar a reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para o gene *bla*<sub>CMY-2</sub>;
3. Determinar a presença do gene *bla*<sub>CMY-2</sub> nos isolados do estudo;
4. Correlacionar os resultados do teste de susceptibilidade aos  $\beta$ -lactâmicos com a detecção do gene *bla*<sub>CMY-2</sub>.



## **2 ARTIGO CIENTÍFICO**

Artigo científico elaborado segundo as normas da revista *Veterinary Microbiology*.  
Normas disponíveis em: <<https://www.elsevier.com/journals/veterinary-microbiology/0378-1135/guide-for-authors>>.

## **Presença de CMY-2 em isolados de *Escherichia coli* provenientes de frango de corte no sul do Brasil**

Franciele Caroline Adam<sup>1</sup>, Silvia Adriana Mayer Lentz<sup>1,2</sup>, Roberta Taufer Boff<sup>1,2</sup>, Andreza Francisco Martins<sup>1,2,3\*</sup>

1. Laboratório de Microbiologia Aplicada, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil. Endereço: Sarmiento Leite, 500/1201; Fone: 90050-170; Porto Alegre, RS, Brasil.

2. Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Endereço: Sarmiento Leite, 500/1201; Fone: 90050-170; Porto Alegre, RS, Brasil.

3. Departamento de Microbiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil. Endereço: Sarmiento Leite, 500/1201; Fone: 90050-170; Porto Alegre, RS, Brasil.

\*Autor correspondente. E-mail: andrezafm20@gmail.com. Endereço: Sarmiento Leite, 500/1201, Porto Alegre, RS, Brasil. Fone: 90050-170.

### **Resumo**

A prevalência das AmpC  $\beta$ -lactamases tem aumentado no mundo todo, sendo que as enzimas do tipo CMY-2 correspondem a cerca de 80% das AmpC  $\beta$ -lactamases. A CMY-2 é uma cefalosporinase que não é inibida pelos inibidores de  $\beta$ -lactamases, e vem causando preocupação, visto que é capaz de degradar os  $\beta$ -lactâmicos utilizados na medicina humana e na animal, levando à restrição terapêutica no tratamento de infecções principalmente quando associada a outros genes de resistência, como as ESBLs. Sua presença em animais de produção já foi descrita em diversos estudos, e isso pode indicar que os animais podem estar servindo como reservatório para o gene. O objetivo do trabalho foi determinar a presença de CMY-2 em isolados de *Escherichia coli* provenientes de frango de corte no Brasil. Foram analisados 33 isolados de *E. coli* provenientes de suabe cloacal das aves, coletados em 2015; o

perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos foi determinado pelo teste de disco-difusão, de acordo com o CLSI; e a técnica de PCR *in house* foi utilizada para detecção do gene. Um total de 25 (75,76%) dos 33 isolados foram positivos para CMY-2. Todos os isolados apresentaram multirresistência, sendo 100% deles resistentes a cefotaxima e a ceftazidima. Obtivemos um alto índice de CMY-2, resultado incomum em comparação com dados da literatura. Estes dados causam preocupação e ressaltam a importância dos órgãos de saúde pública investirem em medidas para regular o uso de antimicrobianos e prevenirem a disseminação da resistência.

**Palavras-chave:** resistência aos antimicrobianos; CMY-2; AmpC  $\beta$ -lactamases; cefalosporinas.

## 1 Introdução

Os  $\beta$ -lactâmicos são antimicrobianos muito importantes para o tratamento de diversas infecções (Essack, 2001). Por esse motivo, o aumento da resistência contra esses fármacos preocupa os órgãos de saúde, pois restringe as opções terapêuticas para o tratamento de infecções que costumavam responder bem a esses antimicrobianos.

A pesquisa para detecção da presença de genes de resistência codificadores de  $\beta$ -lactamases em bactérias tem sido realizada extensivamente no mundo todo. As ESBLs e as AmpC  $\beta$ -lactamases são os principais tipos de  $\beta$ -lactamases encontrados, e elas estão fortemente associadas com infecções causadas por microrganismos Gram-negativos, como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Liebana et al., 2013).

As AmpC  $\beta$ -lactamases são cefalosporinas que atuam sobre as penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda e terceira gerações, monobactâmicos e cefamicinas, além de não sofrerem os efeitos dos inibidores de  $\beta$ -lactamases (Jacoby, 2009). A CMY-2 é a

AmpC plasmidial mais prevalente (Miró et al., 2013). Em estudos prévios, foi descrita em *E. coli* colonizante de animais de produção, como frangos e suínos, e também de pacientes com suspeita de infecção urinária (Park et al., 2012; Fang et al., 2015; Rocha et al., 2016).

Neste estudo, realizou-se a pesquisa de *bla*<sub>CMY-2</sub> em isolados de *E. coli* provenientes de frango de corte na região Sul do Brasil. Além disso, foi determinado o perfil de susceptibilidade dos isolados frente a diversas classes de antimicrobianos e correlacionou-se os resultados de susceptibilidade para cefalosporinas com a presença do gene.

## **2 Materiais e métodos**

### **2.1 Amostras**

Os 33 isolados de *Escherichia coli* selecionados neste estudo fazem parte do banco de amostras do Laboratório de Microbiologia Aplicada da UFRGS. A totalidade das amostras (340) foi originalmente coletada através da realização de suabe cloacal em aves, em um abatedouro frigorífico existente no RS, entre agosto e outubro de 2015. De acordo com os boletins sanitários dos animais, as aves foram provenientes de 17 lotes, de 12 unidades produtoras diferentes, e não receberam cefalosporinas de terceira geração. Para a realização deste estudo, selecionamos pelo menos 1 isolado de cada lote, que apresentaram crescimento em caldo TSB contendo ceftazidima e que foram negativos à pesquisa dos genes de ESBLs (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>CTX-M</sub>) realizada previamente. Estes isolados estavam estocados em caldo BHI com glicerol à 16% em temperatura de -20°C.

Os isolados foram inoculados em 3 mL de Caldo Triptona de Soja (TSB – KASVI®), e a incubação ocorreu por 24 horas a 37 °C. Após o crescimento em caldo, foi realizada semeadura por esgotamento em Ágar MacConkey (KASVI®) e as placas foram incubadas por 18 a 24 horas à 37 °C.

## 2.2 Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizado pelo método de Kirby-Bauer por disco-difusão em Ágar Mueller-Hinton (KASVI<sup>®</sup>) conforme o protocolo do CLSI, 2017. A suspensão das colônias bacterianas foi feita em solução salina na escala 0,5 McFarland. A suspensão foi inoculada em Ágar Mueller-Hinton com um suabe estéril e em seguida foram aplicados os discos de antimicrobianos. *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foram utilizadas como controle de qualidade do experimento.

Os antimicrobianos utilizados foram: ceftazidima (30 µg - BD<sup>®</sup>), cefotaxima (30 µg - BD<sup>®</sup>), meropenem (10 µg - BD<sup>®</sup>), imipenem (10 µg - BD<sup>®</sup>), ciprofloxacino (5 µg - BD<sup>®</sup>), cefepime (30 µg - BD<sup>®</sup>), doxiciclina (30 µg - BD<sup>®</sup>), amoxicilina/ácido clavulânico (20 µg/10 µg - BD<sup>®</sup>), ampicilina/sulbactam (10 µg/10 µg - BD<sup>®</sup>), piperacilina/tazobactam (100 µg/10 µg - BD<sup>®</sup>), amicacina (30 µg - BD<sup>®</sup>), gentamicina (10 µg - BD<sup>®</sup>), sulfametoxazol/trimetoprima (1,25 µg/23,75 µg - BD<sup>®</sup>) e ampicilina (10 µg - OXOID<sup>®</sup>). Os resultados foram interpretados segundo o CLSI 2017, classificando os isolados em resistentes (R), intermediários (I) ou sensíveis (S).

Para determinar a concentração mínima inibitória para as cefalosporinas, cefotaxima (Sigma<sup>®</sup>) e ceftazidima (ABL<sup>®</sup>), utilizou-se a técnica de microdiluição em caldo conforme preconiza o CLSI, 2017. Preparou-se uma suspensão das colônias bacterianas em solução salina 0,9% na escala 0,5 MacFarland. A partir dessa suspensão, foi preparado um inóculo à 1% em Caldo Mueller-Hinton Cátion Ajustado (BD<sup>®</sup>). A microdiluição foi realizada com os antimicrobianos em uma faixa de concentração de 0,25 – 128 µg/mL para a ceftazidima e de 0,125 – 64 µg/mL para a cefotaxima, em duplicata. *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle de qualidade.

### 2.3 Pesquisa genotípica para detecção do gene *bla*<sub>CMY-2</sub>

A detecção do gene *bla*<sub>CMY-2</sub> foi realizada pela técnica de PCR. O DNA das amostras foi extraído por lise térmica, em 1000 µL de tampão TE (Tris-EDTA, pH 7,8), a 80 °C por 20 minutos seguidos de -20 °C também por 20 minutos. Após, foram centrifugados a 5000rpm por 4 minutos, e o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para um novo tubo.

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram CMY-2F 5'-ATGATGAAAAAATCGTTATGCTGC-3' e CMY-2R 5'-GCTTTTCAAGAATGCGCCAGG-3', baseados no trabalho de Dierikx et al., 2010, e o fragmento possui um tamanho de 1094pb. Cada 25 µL de reação continha tampão de reação 1x (quatroG<sup>®</sup>), 0,48 µM de cada um dos primers (invitrogen<sup>®</sup>), 2,4 mM de dNTP (quatroG<sup>®</sup>), 2,8 mM de MgCl<sub>2</sub> (quatroG<sup>®</sup>), 2,5 U de Taq Platinum (invitrogen<sup>®</sup>) e 10 ng de DNA. As condições de amplificação foram de 94 °C por 3 minutos; seguidos por 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 57 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto; e extensão final de 72 °C por 10 minutos. A amplificação ocorreu no termociclador Thermal Cycler Applied Biosystems ProFlex PCR System. Para observação dos produtos da PCR, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1,5%. Após a corrida eletroforética o gel foi observado em transiluminador. O controle negativo utilizado foi água ultrapura e o controle positivo foi a cepa de *E. coli* SL215, que faz parte do banco de amostras do Laboratório de Microbiologia Aplicada, e que teve seu genoma completo previamente sequenciado, evidenciando a presença do gene *bla*<sub>CMY-2</sub>.

### 3 Resultados

No disco difusão, todos os 33 isolados apresentaram sensibilidade ao meropenem, ampicilina e piperacilina/tazobactam (figura 1A), e resistência a amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina e cefotaxima (figura 1B). Trinta isolados (90,91%) foram resistentes à ceftazidima e três (9,09%) apresentaram resultado intermediário, não havendo nenhum

isolado sensível a ceftadizima. Segundo a definição de Magiorakos et al., 2011, que classifica multirresistência como a não sensibilidade de um isolado a pelo menos 1 antimicrobiano de 3 ou mais categorias diferentes de antimicrobianos, 100% dos isolados foram considerados multirresistentes e o perfil de resistência mais encontrado foi amoxicilina/ácido clavulânico, ampicilina, doxicilina, sulfametoxazol/trimetoprima, ciprofloxacino, ceftazidima e cefotaxima, presente em 9 das 33 amostras analisadas (27,27%) (tabela 1).

A microdiluição mostrou que todos os isolados apresentaram resistência contra ceftadizima e cefotaxima (tabela 1), sendo que para ceftazidima obteve-se MIC50 e MIC90 de 64 µg/mL, e para cefotaxima obteve-se MIC50 de 16 µg/mL e MIC90 de 32 µg/mL. O gene *bla<sub>CMY-2</sub>* foi encontrado em 25 isolados (75,76%), sendo que todos eles foram resistentes tanto a cefotaxima quanto a ceftazidima. Apenas o lote 10 não teve isolados positivos para *bla<sub>CMY-2</sub>*, mas os animais são provenientes do mesmo produtor do lote 11, que apresentou isolados positivos. Todos os produtores tiveram isolados positivos para *bla<sub>CMY-2</sub>*. Os 8 isolados negativos para o gene também foram resistentes a essas cefalosporinas.

#### **4 Discussão**

Este estudo demonstrou que apesar dos animais não terem sido expostos à cefalosporinas de terceira geração, segundo os boletins sanitários, todos apresentaram resistência contra ceftazidima e contra cefotaxima. Essa é uma situação preocupante já que fontes desconhecidas podem estar induzindo a seleção destas cepas resistentes.

Considerou-se a possibilidade de que outros lotes de animais possam ter recebido cefalosporinas, selecionando cepas resistentes que se disseminaram no ambiente, bem como a permanência de possíveis resíduos de antimicrobianos. Assim, a falta de boas práticas de produção poderia contribuir para que os genes de resistência se disseminassem para outros lotes de animais (Sunde et al., 2017).

O gene *bla*<sub>CMY-2</sub> foi detectado em um grande número de amostras (75,76%), o que foi inesperado, pois a prevalência do gene costuma ser baixa, cerca de 1,6% em estudo realizado com carne suína na Alemanha (Schill et al., 2017), e de 3% em perus de produção no Brasil (da Silva et al., 2017). Todos os isolados de *E. coli* do trabalho em que o gene *bla*<sub>CMY-2</sub> foi detectado apresentaram resistência às cefalosporinas de terceira geração, indicando que essas bactérias estavam expressando o gene. É importante salientar que os isolados analisados são de diferentes lotes de animais e de diferentes produtores, o que exclui a possibilidade de terem sido avaliados clones genéticos.

Já havia conhecimento de que os isolados deste trabalho eram negativos para os genes de ESBLs (*bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>TEM</sub>). Portanto, a resistência dos isolados que não continham CMY-2 pode ter ocorrido pela presença de outro mecanismo não avaliado. Como exemplo, outro gene da família AmpC, como o DHA-1, que é o segundo mais prevalente depois de CMY-2, e que é capaz de conferir resistência as cefalosporinas de terceira geração (Jacoby, 2009) poderia estar presente nesses isolados. O gene *bla*<sub>DHA-1</sub> já foi descrito em isolados clínicos de *E. coli*, na Europa e na Índia, e em isolados de *Salmonella* spp. provenientes de uma granja de frangos na Coreia do Sul (Pham et al., 2010; Rayamajhi et al., 2010; Ingti et al., 2017).

Outra possibilidade seria a presença de mecanismos não enzimáticos, como a perda das porinas OmpF e/ou OmpC da parede celular bacteriana, através de mutação cromossômica que tenha desencadeado a diminuição da expressão dos genes codificadores dessas proteínas (De La Cruz and Calva, 2010; Mahendran et al., 2010; Lovelle et al., 2011); ou ainda a possibilidade dessas bactérias estarem colocando os antimicrobianos para fora da célula através de bombas de efluxo na membrana celular, mecanismo comum em microrganismos multirresistentes por ter a habilidade de bombear uma variedade de antimicrobianos para o ambiente extracelular (Piddock, 2006; Lim and Nikaido, 2010).



Desde a primeira detecção de *bla*<sub>CMY-2</sub> no Brasil, por Pavez et al., 2008, ainda são poucos os estudos sobre a prevalência do gene no país. Nos trabalhos disponíveis, todos demonstraram uma prevalência baixa para *bla*<sub>CMY-2</sub> (Alves et al., 2004; Campana et al., 2013; da Silva et al., 2017). Este trabalho é o primeiro a detectar alta prevalência de *bla*<sub>CMY-2</sub> no Brasil.

## 5 Conclusão

A prevalência de CMY-2, ainda que seja menor em comparação com genes de ESBLs, vem aumentando no mundo todo. Os altos índices encontrados no estudo alertam para o fato dos frangos, mas não exclusivamente esses animais, estarem servindo como reservatórios genéticos dessa AmpC. A resistência antimicrobiana é um problema de saúde pública, e demanda que os órgãos governamentais imponham fiscalizações efetivas no controle do uso de antimicrobianos tanto na veterinária e agricultura quanto na população em geral.

## Referências

- Alves, M., Junior, D.S., Ferreira, S., Carvalho, G., 2004. Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL): um Importante Mecanismo de Resistência Bacteriana e sua Detecção no Laboratório Clínico. *NewsLab* 63, 152–174.
- Campana, E.H., Barbosa, P.P., Fehlberg, L.C.C., Gales, A.C., 2013. Frequency of plasmid-mediated AmpC in enterobacteriaceae isolated in a Brazilian teaching hospital. *Brazilian J. Microbiol.* 44, 477–480. doi:10.1590/S1517-83822013000200023
- CLSI, 2017. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.
- da Silva, K.C., Cunha, M.P.V., Cerdeira, L., de Oliveira, M.G.X., de Oliveira, M.C.V., Gomes, C.R., Lincopan, N., Knobl, T., Moreno, A.M., 2017. High-virulence CMY-2-

- and CTX-M-2-producing avian pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from commercial turkeys. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 87, 64–67.  
doi:10.1016/j.diagmicrobio.2016.10.001
- De La Cruz, M.Á., Calva, E., 2010. The complexities of porin genetic regulation. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 18, 24–36. doi:10.1159/000274309
- Dierikx, C., van Essen-Zandbergen, A., Veldman, K., Smith, H., Mevius, D., 2010. Increased detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry. *Vet. Microbiol.* 145, 273–278.  
doi:10.1016/j.vetmic.2010.03.019
- Essack, S.Y., 2001. The development of beta-lactam antibiotics in response to the evolution of beta-lactamases. *Pharm. Res.* 18, 1391–1399. doi:10.1023/A:1012272403776
- Fang, L.X., Sun, J., Li, L., Deng, H., Huang, T., Yang, Q.E., Li, X., Chen, M.Y., Liao, X.P., Liu, Y.H., 2015. Dissemination of the chromosomally encoded CMY-2 cephalosporinase gene in *Escherichia coli* isolated from animals. *Int. J. Antimicrob. Agents* 46, 209–213.  
doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.04.003
- Ingti, B., Paul, D., Maurya, A.P., Bora, D., Chanda, D.D., Chakravarty, A., Bhattacharjee, A., 2017. Occurrence of bla DHA-1 mediated cephalosporin resistance in *Escherichia coli* and their transcriptional response against cephalosporin stress: a report from India. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 16, 13. doi:10.1186/s12941-017-0189-x
- Jacoby, G.A., 2009. AmpC  $\beta$ -Lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* doi:10.1128/CMR.00036-08
- Liebana, E., Carattoli, A., Coque, T.M., Hasman, H., Magiorakos, A.P., Mevius, D., Peixe, L., Poirel, L., Schuepbach-Regula, G., Torneke, K., Torren-Edo, J., Torres, C., Threlfall, J., 2013. Public health risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum  $\beta$ -

- lactamases or AmpC  $\beta$ -lactamases in food and food-producing animals: An EU perspective of epidemiology, analytical methods, risk factors, and control options. *Clin. Infect. Dis.* 56, 1030–1037. doi:10.1093/cid/cis1043
- Lim, S.P., Nikaido, H., 2010. Kinetic parameters of efflux of penicillins by the multidrug efflux transporter AcrAB-TolC of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 1800–1806. doi:10.1128/AAC.01714-09
- Lovelle, M., Mach, T., Mahendran, K.R., Weingart, H., Winterhalter, M., Gameiro, P., 2011. Interaction of cephalosporins with outer membrane channels of *Escherichia coli*. Revealing binding by fluorescence quenching and ion conductance fluctuations. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 13, 1521–1530. doi:10.1039/C0CP00969E
- Magiorakos, A., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., Hindler, J.F., 2011. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance.
- Mahendran, K.R., Kreir, M., Weingart, H., Fertig, N., Winterhalter, M., 2010. Permeation of antibiotics through *Escherichia coli* OmpF and OmpC porins: Screening for influx on a single-molecule level. *J. Biomol. Screen.* 15, 302–307. doi:10.1177/1087057109357791
- Miró, E., Agüero, J., Larrosa, M.N., Fernández, A., Conejo, M.C., Bou, G., González-López, J.J., Lara, N., Martínez-Martínez, L., Oliver, A., Aracil, B., Oteo, J., Pascual, A., Rodríguez-Baño, J., Zamorano, L., Navarro, F., 2013. Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC  $\beta$ -lactamases and carbapenemases in *Enterobacteriaceae* isolates from 35 hospitals in Spain. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 32, 253–259. doi:10.1007/s10096-012-1737-0
- Park, Y.S., Adams-Haduch, J.M., Rivera, J.I., Curry, S.R., Harrison, L.H., Doi, Y., 2012.

- Escherichia coli Producing CMY-2  $\beta$ -Lactamase in Retail Chicken, Pittsburgh, Pennsylvania, USA. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 515–516. doi:10.3201/eid1803.111434
- Pavez, M., Neves, P., Dropa, M., Matté, M.H., Grinbaum, R.S., Elmor De Araújo, M.R., Mamizuka, E.M., Lincopan, N., 2008. Emergence of carbapenem-resistant Escherichia coli producing CMY-2-type AmpC  $\beta$ -lactamase in Brazil. *J. Med. Microbiol.* 57, 1590–1592. doi:10.1099/jmm.0.2008/002774-0
- Pham, J.N., Chambers, I., Poirel, L., Nordmann, P., Bell, S.M., 2010. Detection of a plasmid-mediated inducible cephalosporinase DHA-1 from Escherichia coli. *Pathology.* 42, 196–197. doi:10.3109/00313020903494961
- Piddock, L.J. V, 2006. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clin. Infect. Dis.* 19, 382–402. doi:10.1128/CMR.19.2.382
- Rayamajhi, N., Jung, B.Y., Cha, S. Bin, Shin, M.K., Kim, A., Kang, M.S., Lee, K.M., Yoo, H.S., 2010. Antibiotic resistance patterns and detection of blaDHA-1 Salmonella species isolates from chicken farms in South Korea. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 4760–4764. doi:10.1128/AEM.02536-09
- Rocha, D.A.C., Campos, J.C., Passadore, L.F., Sampaio, S.C.F., Nicodemo, A.C., Sampaio, J.L.M., 2016. Frequency of Plasmid-Mediated AmpC  $\beta$ -Lactamases in *Escherichia coli* Isolates from Urine Samples in São Paulo, Brazil. *Microb. Drug Resist.* 22, 321–327. doi:10.1089/mdr.2015.0190
- Schill, F., Abdulmawjood, A., Klein, G., Reich, F., 2017. Prevalence and characterization of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) and AmpC  $\beta$ -lactamase producing Enterobacteriaceae in fresh pork meat at processing level in Germany. *Int. J. Food*

Microbiol. 257, 58–66. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.010

Sunde, M., Ilag, H.K., Langsrud, S., Heir, E., 2017. crossm Transfer Potential of Plasmids  
Conferring 83, 1–11.

## Tabelas

Tabela 1: Características dos isolados de *E. coli* utilizados no estudo

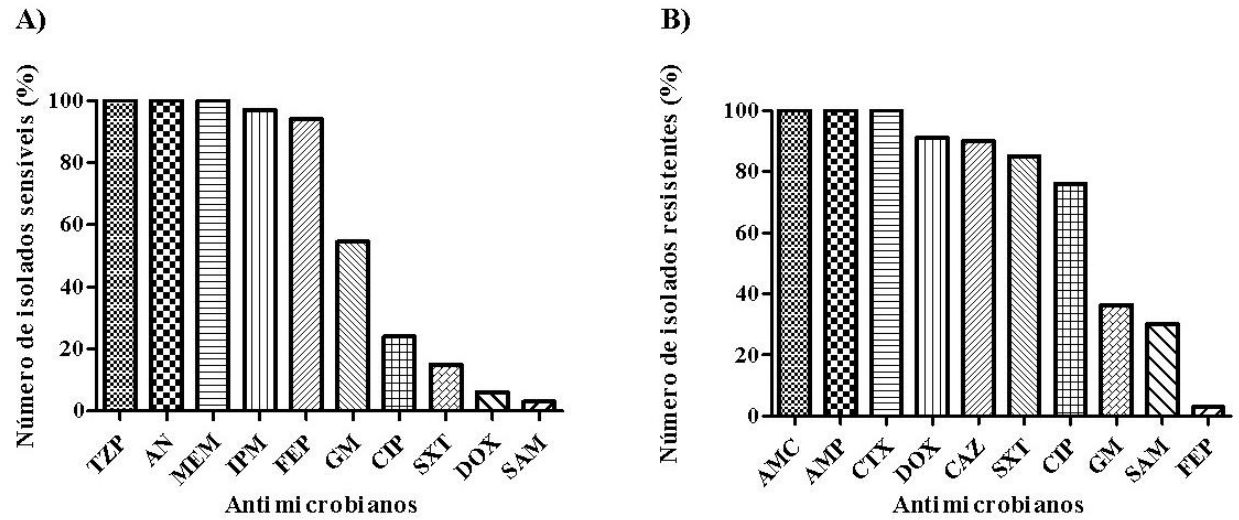
Isolados	Lote	Produtor	Perfil de resistência antimicrobiana <sup>a</sup>	MIC (µg/mL)		CMY-2
				CAZ <sup>b</sup>	CTX <sup>c</sup>	
7	2	H	AMC, AM, CAZ, CTX, SXT	16	16	+
10	2	H	AMC, AM, CAZ, CTX, CIP, DOX, SAM, SXT	32	16	+
26	1	G	AMC, AM, CTX, CIP, DOX, GM, SXT	32	16	+
27	1	G	AMC, AM, CAZ, CTX, CIP, DOX	64	16	-
81	5	I	AMC, AM, CTX, CIP, DOX, SXT	64	16	+
98	6	J	AMC, AM, CAZ, CTX, CIP, DOX, SAM, SXT	64	16	+
105	7	J	AMC, AM, CAZ, CTX, CIP, DOX, GM, SXT	32	8	+
121	7	J	AMC, AM, CAZ, CTX, CIP, GM, SAM	32	4	+
130	8	K	AMC, AM, CAZ, CTX, CIP, DOX, GM, SXT	32	16	+
137	8	K	AMC, AM, CAZ, CTX, CIP, DOX, SAM	64	16	+
145	5	I	AMC, AM, CAZ, CTX, CIP, DOX, SXT	64	16	-
152	6	J	AMC, AM, CTX, CIP, DOX, SXT	16	16	+
160	9	D	AMC, AM, CAZ, CTX, CIP, DOX, SXT	64	16	+
170	9	D	AMC, AM, CAZ, CTX, CIP, DOX, SXT	64	8	+
188	10	Y	AMC, AM, CAZ, CTX, CIP, DOX, SXT	32	16	-
190	10	Y	AMC, AM, CAZ, CTX, CIP, DOX, SAM, SXT	32	32	-
201	11	Y	AMC, AMP, D, CAZ, CTX	64	32	+
216	11	Y	AMC, AMP, D, GM, SXT, CAZ, CTX	64	16	+
218	12	X	AMC, AMP, SAM, D, GM, SXT, CIP, CAZ, CTX	64	32	+
223	12	X	AMC, AM, CAZ, CTX, CIP, GM, SXT	64	16	-
231	13	L	AMC, AM, CAZ, CTX, CIP, DOX, SXT	64	16	+
245	13	L	AMC, AM, CAZ, CTX, CIP, DOX, GM, SAM, SXT	32	16	+
247	14	L	AMC, AM, CAZ, CTX, CIP, DOX	32	16	-
250	15	Z	AMC, AM, CAZ, CTX, CIP, DOX, SXT	64	32	-
256	15	Z	AMC, AM, CAZ, CTX, DOX, SXT	128	8	+
269	14	L	AMC, AM, CAZ, CTX, CIP, DOX, SXT	64	16	+
313	16	M	AMC, AM, CAZ, CTX, DOX, GM, SAM, SXT	64	16	+
322	17	M	AMC, AM, CAZ, CTX, DOX, GM, SXT	32	16	+
324	17	M	AMC, AM, CAZ, CTX, CIP, DOX, SXT	32	8	+
334	18	N	AMC, AM, CAZ, CTX, CIP, DOX, SXT	32	16	+
337	18	N	AMC, AM, CAZ, CTX, DOX, GM, SAM, SXT	128	16	+
357	19	N	AMC, AM, CAZ, CTX, CIP, DOX, FEP, GM, SAM, SXT	32	64	+
405	16	M	AMC, AM, DOX, SXT	32	8	-

<sup>a</sup>Antimicrobianos testados: AMC – amoxicilina/ácido clavulânico, AM – ampicilina, SAM – ampicilina/sulbactam, FEP - cefepime, CAZ – ceftazidima, CTX – cefotaxima, CIP – ciprofloxacino, DOX – doxiciclina, GM – gentamicina, IPM – imipenem, SXT – sulfametoxazol/trimetoprima.

<sup>b</sup>Ceftazidima

<sup>c</sup>Cefotaxima

## Figuras



**Figura 1:** resultados do teste de disco-difusão. **A)** número de isolados sensíveis (em %) aos antimicrobianos testados, e **B)** número de isolados resistentes (em %) aos antimicrobianos testados.

TZP: piperacilina/tazobactam; AN: amicacina; MEM: meropenem; IPM: imipenem; FEP: cefepime; GM: gentamicina; CIP: ciprofloxacino; SXT: sulfametoxazol/trimetoprima; DOX: doxicilina; SAM: ampicilina/sulbactam; AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; AMP: ampicilina; CTX: cefotaxima; CAZ: ceftazidima.

### 3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram o porquê é tão importante investir em medidas para reduzir a resistência antimicrobiana, que está disseminada por todos os lugares do mundo. O fato de todos os isolados terem apresentado multirresistência contra antimicrobianos utilizados diariamente na prática clínica humana, assim como na veterinária é preocupante. Além disso, as cefalosporinas de terceira geração, que são recomendadas para o tratamento de infecções humanas, não foram capazes de atuar nesses microrganismos, pois nenhum dos isolados foi suscetível a essa classe de antimicrobianos.

Obtivemos uma alta prevalência do gene CMY-2 em nosso estudo, justificando por que as *Escherichia coli* foram resistentes as cefalosporinas. O Brasil ainda carece de estudos sobre as AmpC  $\beta$ -lactamases, e esse é um importante resultado que poderá contribuir com estudos futuros para determinar a prevalência de CMY-2 no país, assim como também para que seja possível começar a traçar as regiões com índices mais elevados da presença do gene.

Aumentando o número de lotes de animais a serem analisados, provenientes de produtores diferentes e de regiões diferentes do país, e pesquisando por outros genes de AmpC  $\beta$ -lactamases, seria possível enriquecer os dados gerados nesse trabalho, assim como auxiliar na disseminação do conhecimento sobre a presença de CMY-2.



## REFERÊNCIAS

1. ALVES, Manuel et al. Betalactamases de Espectro Ampliado (ESBL): um Importante Mecanismo de Resistência Bacteriana e sua Detecção no Laboratório Clínico. **NewsLab**, v. 63, p. 152–174, 2004.
2. AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 289, n. 1036, p. 321–31, 1980. Disponível em:  
<<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00958979009408200>>
3. BABINI, G. S. et al. Unusual tazobactam-sensitive AmpC beta-lactamase from two Escherichia coli isolates. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 41, n. 2, p. 115–118, 1998.
4. BATCHELOR, Miranda; THRELFALL, E. John; LIEBANA, Ernesto. Cephalosporin resistance among animal-associated Enterobacteria: a current perspective. P. 403–418, 2005.
5. BEN SALLEM, Rym et al. Prevalence and Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)– and CMY-2–Producing Escherichia coli Isolates from Healthy Food-Producing Animals in Tunisia. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 12, p. 1137–1142, 2012. Disponível em:  
<<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/fpd.2012.1267>>
6. BONOMO, R. A. et al. Inactivation of CMY-2 beta-lactamase by tazobactam: initial mass spectroscopic characterization. **Biochim Biophys Acta**, v. 1547, n. 2, p. 196–205, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11410275>>
7. BRUNTON, Laurence L.; CHABNER, Bruce A.; KNOLLMANN, Björn C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed.: Grupo A - AMGH, 2012.
8. BUSH, Karen; JACOBY, George A. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2010.
9. BUTAYE, Patrick et al. Antimicrobial resistance in bacteria from animals and the environment. **Veterinary Microbiology**, v. 171, n. 3–4, p. 269–272, 2014.
10. CAMPANA, Eloiza H. et al. Frequency of plasmid-mediated AmpC in enterobacteriaceae isolated in a Brazilian teaching hospital. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 477–480, 2013.
11. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **One Health**

- Basics**. 2017. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/onehealth/basics/index.html>>. Acesso em: 21 ago. 2017.
12. CUNHA, Marcos P. V et al. Coexistence of CTX-M-2, CTX-M-55, CMY-2, FosA3, and QnrB19 in Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli from Poultry in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, p. e02474-16, 2017. Disponível em: <<http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.02474-16>>
  13. DA SILVA, Ketrin Cristina et al. High-virulence CMY-2- and CTX-M-2-producing avian pathogenic Escherichia coli strains isolated from commercial turkeys. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 87, n. 1, p. 64–67, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.10.001>>
  14. DENISUIK, Andrew J. et al. Molecular epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-, AmpC  $\beta$ -lactamase- and carbapenemase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolated from Canadian hospitals over a 5 year period: CANWARD 2007-11. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 68 Suppl 1, n. September, p. 57–65, 2013.
  15. EFSA PANEL ON BIOLOGICAL HAZARDS (BIOHAZ). Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and/or AmpC  $\beta$ -lactamases in food and food-producing animals. **EFSA Journal**, v. 9, n. 8, p. 2322, 2011. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2011.2322>>
  16. FANG, Liang Xing et al. Dissemination of the chromosomally encoded CMY-2 cephalosporinase gene in Escherichia coli isolated from animals. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 46, n. 2, p. 209–213, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.04.003>>
  17. GIEDRAITIENĖ, Agnė et al. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. **Medicina (Kaunas, Lithuania)**, v. 47, n. 3, p. 137–46, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21822035>>
  18. JACOBY, George A. AmpC  $\beta$ -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, 2009.
  19. KÖCK, Robin et al. Antimicrobial resistance at the interface of human and veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v. 200, p. 1–5, 2017.
  20. LEVY, Stuart B.; MARSHALL, Bonnie. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nat.Med.**, v. 10, n. 1078–8956 (Print), p. S122–S129, 2004. Disponível em: <[c:%5CKARSTEN%5CPDFs%5CAntibiotika-PDFs%5CAnti-2004%5CLEvy - Marshall-Antibacterial resistance worldwide- causes challenges and responses.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1451111/pdf/00000607-200410000-00001.pdf)>

21. LIEBANA, Ernesto et al. Public health risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases or AmpC  $\beta$ -lactamases in food and food-producing animals: An EU perspective of epidemiology, analytical methods, risk factors, and control options. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 7, p. 1030–1037, 2013.
22. MARTINEZ, Jose L. General principles of antibiotic resistance in bacteria. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 11, n. 1, p. 33–39, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ddtec.2014.02.001>>
23. MCEWEN, Scott A.; COLLIGNON, Peter J. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. **Microbiology Spectrum**, v. 6, n. 2, p. 1–26, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29600770>><<http://www.asmscience.org/content/journal/microbiolspec/10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017>>
24. MIRÓ, E. et al. Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC  $\beta$ -lactamases and carbapenemases in Enterobacteriaceae isolates from 35 hospitals in Spain. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 32, n. 2, p. 253–259, 2013.
25. MONTE, Daniel Farias et al. Chicken Meat as a Reservoir of Colistin-Resistant Escherichia coli Strains Carrying *mcr-1* Genes in South America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 5, p. e02718-16, 2017. Disponível em: <<http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.02718-16>>
26. MOURA, Quézia et al. Virulent nontyphoidal Salmonella producing CTX-M and CMY-2  $\beta$ -lactamases from livestock, food and human infection, Brazil. **Virulence**, v. 9, n. 1, p. 281–286, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1279779>>
27. MURRAY, Patrick R.; ROSENTHAL, Ken S.; PFALLER, Michael A. **Microbiologia Médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.
28. PARK, Yoon Soo et al. Escherichia coli Producing CMY-2  $\beta$ -Lactamase in Retail Chicken, Pittsburgh, Pennsylvania, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 515–516, 2012. Disponível em: <[http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/18/3/11-1434\\_article.htm](http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/18/3/11-1434_article.htm)>
29. PARTRIDGE, Sally R. Resistance mechanisms in Enterobacteriaceae. **Pathology**, v. 47, n. April, p. 276–284, 2015.
30. PASCUAL, Vanesa et al. Epidemiology and risk factors for infections due to AmpC  $\beta$ -lactamase-producing Escherichia Coli. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 3, p. 899–904, 2015.
31. PAVEZ, Mónica et al. Emergence of carbapenem-resistant Escherichia coli producing

- CMY-2-type AmpC  $\beta$ -lactamase in Brazil. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 12, p. 1590–1592, 2008.
32. PHILIPPON, Alain; ARLET, Guillaume; JACOBY, George A. Plasmid-Determined AmpC-Type-Beta-Lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 1, p. 1–11, 2002.
33. QUINN, P. J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. 1. ed. Porto Alegre.
34. TOLLEFSON, Linda; KARP, Beth E. Human health impact from antimicrobial use in food animals. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 34, n. 11, p. 514–521, 2004.  
Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15620055>>
35. TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

## APÊNDICE A – PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE PCR

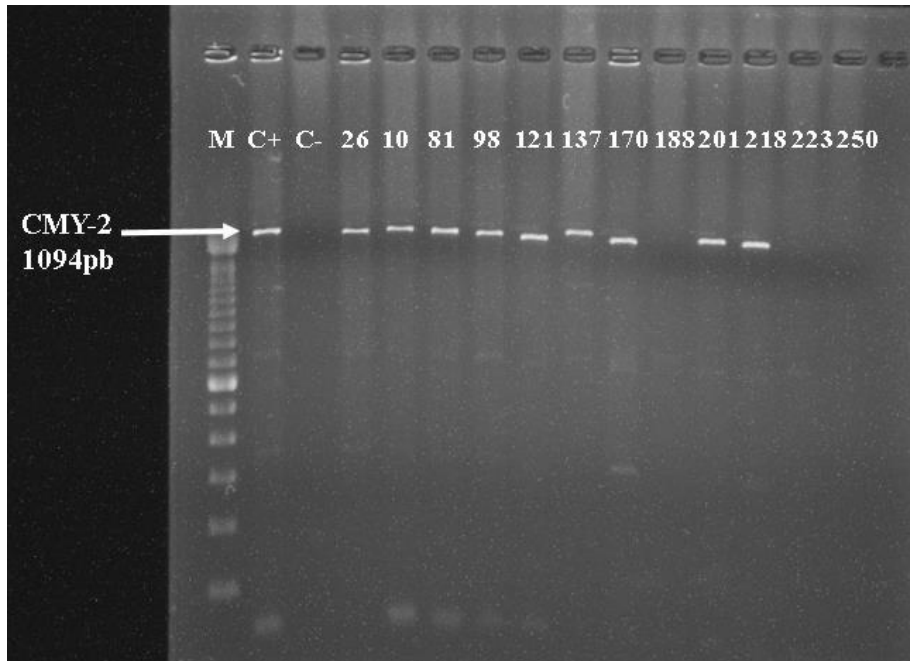
O principal desafio para a realização do trabalho foi padronizar a reação de PCR para o gene *bla<sub>CMY-2</sub>*. Dierikx et al. (2010), Fang et al. (2015), Silva et al. (2017), entre outros estudos que contêm pesquisa genotípica de CMY-2, são publicados sem conter a reação de PCR utilizada, no máximo contendo as condições de temperatura e os oligonucleotídeos iniciadores. Sabendo disto, foram cerca de três meses de trabalho para chegarmos na reação que foi utilizada, já citada na sessão Artigo Científico (página 21).

Os oligonucleotídeos iniciadores foram selecionados de acordo com Dierikx et al., 2010, bem como as condições de PCR. O tamanho do fragmento de interesse é de 1094pb. As condições de PCR e protocolo de reagentes iniciais foram os da reação 1 (Tabela A1), em que foi utilizado MasterMix para PCR convencional 2X (quatroG®). Nesta primeira reação apareceram bandas inespecíficas no controle positivo, sendo que uma banda de tamanho próximo a 300 pb ficou tão marcada quanto o fragmento de interesse. Ainda utilizando MasterMix, alterou-se a concentração de oligonucleotídeos iniciadores (reação 2) e também a temperatura de anelamento (reação 3) na tentativa de retirar as bandas inespecíficas da reação, mas o fragmento de interesse ficou ainda mais fraco em comparação com as reações anteriores.

Como a reação com MasterMix permaneceu com bandas inespecíficas, passamos a utilizar os insumos separados, tornando possível alterações não apenas da concentração dos oligonucleotídeos iniciadores como também de dNTP, MgCl<sub>2</sub> e Taq DNA-Polimerase (quatroG®). O protocolo de reagentes utilizados inicialmente foram os da reação para o gene de ESBL *bla<sub>CTX-M</sub>* (reação 4). Ainda assim, a banda inespecífica continuou a aparecer na reação. A partir dela, foi aumentada a concentração de magnésio (reação 5), o que levou a inibição da enzima pelo excesso de cofator presente, não amplificando a banda de interesse. Testes com concentrações menores de dNTP também foram realizados, como exemplifica a reação 6 da tabela A1, mas acabaram gerando um número maior de bandas inespecíficas.

A partir do momento em que foi obtida uma banda de interesse clara e evidente no gel de agarose, mas ainda com a presença da banda inespecífica na altura de 300pb, resolvemos mudar a enzima para Taq Platinum DNA-polimerase (invitrogen®), que apresenta maior especificidade e portanto, geraria menos fragmentos inespecíficos. A Taq Platinum intensificou a banda de interesse, gerando uma reação limpa de fragmentos inespecíficos e

que foi replicada tanto nos controles positivos quanto nos isolados (reação 7). A figura A1 mostra o gel de agarose com os produtos de PCR utilizados no trabalho.



**Figura A1:** gel de agarose mostrando bandas de CMY-2. M: marcador de peso molecular de 100pb; C+: controle positivo; C-: controle negativo.

**Tabela A1: Condições de PCR testadas para a padronização da reação**

<b>Reação</b>	<b>Condições de temperatura</b>
<b>Reação 1</b> MasterMix 1X, 0,4 $\mu$ M de cada primer, 10ng DNA	94°C por 3min 30 ciclos de 94°C por 1min, 58°C por 1min e 72°C por 1min 72°C por 10min
<b>Reação 2</b> MasterMix 1X, 0,72 $\mu$ M de cada primer, 10ng DNA	94°C por 3min 30 ciclos de 94°C por 1min, 58°C por 1min e 72°C por 1min 72°C por 10min
<b>Reação 3</b> MasterMix 1X, 0,72 $\mu$ M de cada primer, 10ng DNA	94°C por 3min 30 ciclos de 94°C por 1min, 60°C por 30seg e 72°C por 1min 72°C por 10min
<b>Reação 4</b> Tampão de reação 1X, 0,4 $\mu$ M de cada primer, 4mM dNTP, 2mM MgCl <sub>2</sub> , 2U Taq DNA-polimerase, 10ng DNA	94°C por 3min 30 ciclos de 94°C por 1min, 58°C por 1min e 72°C por 1min 72°C por 10min
<b>Reação 5</b> Tampão de reação 1X, 0,6 $\mu$ M de cada primer, 4mM dNTP, 3,6mM MgCl <sub>2</sub> , 2U Taq DNA-polimerase, 10ng DNA	94°C por 3min 30 ciclos de 94°C por 1min, 58°C por 1min e 72°C por 1min 72°C por 10min
<b>Reação 6</b> Tampão de reação 1X, 0,4 $\mu$ M de cada primer, 0,8mM dNTP, 2mM MgCl <sub>2</sub> , 2U Taq DNA-polimerase, 10ng DNA	94°C por 3min 30 ciclos de 94°C por 1min, 56°C por 1min e 72°C por 1min 72°C por 10min
<b>Reação 7</b> Tampão de reação 1X, 0,48 $\mu$ M de cada primer, 2,4mM dNTP, 2,8mM MgCl <sub>2</sub> , 2,5U Taq Platinum DNA-polimerase, 10ng DNA	94°C por 3min 30 ciclos de 94°C por 1min, 57°C por 1min e 72°C por 1min 72°C por 10min

## ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA VETERINARY MICROBIOLOGY

### Guide for Authors

#### Types of paper

1. Original research papers (Research Papers)
2. Review articles (Review Papers)
3. Short communications
4. Letters to the Editor

Original research papers should report the results of original research. The material must not have been previously published elsewhere. Articles must be as concise as possible, commensurate with reporting and discussing the research presented. As a general rule they should not occupy more than 12 printed journal pages, including figures, tables and references (about 30 manuscript pages, Times New Roman 12 pt, double-spaced, minimum 2 cm margins). Introduction should not exceed 2 manuscript pages. Discussion should not exceed 4 manuscript pages and the number of references should be limited to 35.

Review articles should cover subjects falling within the scope of the journal. Of particular interest are topical, short (mini) reviews in areas of current interest.

Reviews of topics in veterinary bacteriology, mycology and virology should provide short, readable, well-referenced, up-to-date overviews of current, emerging, or neglected subjects in the discipline. Syntheses of information from diverse sources, providing clarification of areas of confusion or uncertainty, are especially desirable. It is anticipated that these reviews will provide overviews of important topics to the benefit of "curious-but-busy" readers of Veterinary Microbiology.

Reviews should carry titles which are creative and provocative, but nonetheless descriptive, and emphasize current status and future directions of research. Historical vignettes are useful in setting the stage for addressing important contemporary questions, but should not ordinarily be the basis for an article. Manuscripts may include controversial views, if presented in a balanced fashion and supported by evidence; informed speculation is welcome.

Before submitting a review, authors must first contact one of the Editors with an outline of a proposed review: Ben Adler ([ben.adler@monash.edu](mailto:ben.adler@monash.edu)) or Stefan Schwarz ([stefan.schwarz@fu-berlin.de](mailto:stefan.schwarz@fu-berlin.de)) for bacteriological reviews, and Veronika von Messling ([Veronika.vonMessling@pei.de](mailto:Veronika.vonMessling@pei.de)) or X.J. Meng ([xjmeng@vt.edu](mailto:xjmeng@vt.edu)) for those on virology. It is expected that authors submitting reviews are experts in the field. This must be supported by a strong track record of publications in the area of the proposed review. The main text of a review article should be about 15 pages of double-spaced type, supported by illustrative material and references. Figures are welcome, but review articles should normally not have more than 50 references. Manuscripts should be submitted through the EVISE electronic submission system, using the article type 'Review Paper'.



Manuscripts will be processed through the normal Veterinary Microbiology review procedure, with the final decision made by the appropriate Editor.

Short communications should report the results of original research. The material must not have been previously published elsewhere. As a general rule they should not occupy more than 6 printed journal pages, including figures, tables and references (about 15 manuscript pages, Times New Roman 12 pt, double-spaced, minimum 2 cm margins). Introduction should not exceed 1 manuscript page. Discussion should not exceed 3 manuscript pages and the number of references should be limited to 25.

Letters to the Editor offering comment or useful critique on material published in the journal are welcomed. The decision to publish submitted letters rests purely with the Editor-in-Chief. It is hoped that the publication of such letters will permit an exchange of views which will be of benefit to both the journal and its readers.

### **Submission checklist**

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

#### **Ensure that the following items are present:**

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

#### *Manuscript:*

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

*Graphical Abstracts / Highlights files* (where applicable)

*Supplemental files* (where applicable)

#### Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).



## Before You Begin

### **Ethics in publishing**

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

#### ***Ethics in animal experimentation***

Circumstances relating to animal experimentation must meet the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals as issued by the Council for the International Organizations of Medical Sciences. They are obtainable from: Executive Secretary C.I.O.M.S., c/o WHO, Via Appia, CH-1211 Geneva 27, Switzerland, or at the following URL: [http://www.cioms.ch/publications/guidelines/1985\\_texts\\_of\\_guidelines.htm](http://www.cioms.ch/publications/guidelines/1985_texts_of_guidelines.htm). Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of Veterinary Microbiology.

#### ***Data accessibility***

Any new nucleotide or amino acid sequence data should be deposited in publicly accessible databases, such as GenBank, and the accession numbers should be included in the manuscript (Methods section) before it is finally accepted for publication. In addition, it is expected that any plasmids, transposons, viruses, microbial strains, or cell lines described for the first time in the paper will be made available to scientists for non-commercial purposes at reasonable cost following publication.

### **Conflict of interest statement**

Any conflicts of interest must be disclosed at the end of the submitted manuscript under the subheading 'Conflict of interest statement'.

### **Declaration of interest**

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

### **Submission declaration and verification**

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or

explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

### ***Preprints***

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

### **Authorship**

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

### **Changes to authorship**

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

### **Acknowledgements**

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an acknowledgements section at the end of the manuscript, before the references. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

### **Copyright**

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

### ***Author rights***

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

### ***Elsevier supports responsible sharing***

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

### **Role of the funding source**

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

### ***Funding body agreements and policies***

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the gold open access publication fee. Details of existing agreements are available online.

After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

### **Open access**

This journal offers authors a choice in publishing their research:

#### ***Subscription***

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.
- The Author is entitled to post the accepted manuscript in their institution's repository and make this public after an embargo period (known as green Open Access). The published journal article cannot be shared publicly, for example on ResearchGate or Academia.edu, to ensure the sustainability of peer-reviewed research in journal publications. The embargo period for this journal can be found below.

#### ***Gold open access***

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.

- A gold open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For gold open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

***Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)***

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The gold open access publication fee for this journal is **USD 3500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

***Green open access***

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

***Elsevier Researcher Academy***

[Researcher Academy](#) is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

***Language (usage and editing services)***

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

**Submission**

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset

your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

### ***Submit your article***

Please submit your article via <https://www.evise.com/profile/api/navigate/VETMIC>.

Authors should select the relevant article type (e.g. Research Paper, Review Paper, Short Communication, Letter to the Editor, Book Review), and category (e.g. Prions, Viruses, Fungi, Bacteria) for their papers as well as a set of classifications from a given list.

### **Referees**

Authors are requested to provide the names of up to 4 referees (with email addresses) whom they feel are qualified to evaluate their submission (for original research papers, review articles and short communications). Submission of such names does not, however, imply that they will definitely be used as referees.



### **Preparation**

#### ***Peer review***

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then generally sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review](#).

#### ***Use of word processing software***

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

### **Essential title page information**

- ***Title***. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- ***Author names and affiliations***. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in

front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

## **Abstract**

Manuscripts of original research papers should include a structured abstract of 250 or fewer words, organised under the sections: Problem addressed; Objective; Methods and approach; Results; Conclusions. Do not actually include section headings, but use this structure for the abstract.

### ***Graphical abstract***

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

### ***Highlights***

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

### ***Formatting of funding sources***

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

### **Nomenclature**

1. Authors and Editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature. Virologists should consult the latest Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses for proper nomenclature and spelling.
2. All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.
3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.
4. For chemical nomenclature, the conventions of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the official recommendations of the IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature should be followed.

### **Formulae**

1. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used.
2. For simple fractions use the solidus (/) instead of a horizontal line.
3. Equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. In general only equations explicitly referred to in the text need be numbered.
4. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Powers of e are often more conveniently denoted by exp.
5. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g.  $\text{Ca}^{2+}$ , not as  $\text{Ca}^{++}$ .
6. Isotope numbers should precede the symbols, e.g.  $^{18}\text{O}$ .
7. The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as  $\text{P}_2\text{O}_5$ ).

### **Footnotes**

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

1. Footnotes should only be used if absolutely essential. In most cases it should be possible to incorporate the information in normal text.
2. If used, they should be numbered in the text, indicated by superscript numbers, and kept as short as possible.

### **Artwork**



## ***Electronic artwork***

### *General points*

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

**You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

### *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

### **Please do not:**

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

1. All illustrations (line drawings and photographs) should be submitted as separate files, though they may also be embedded within the manuscript file for ease of reading during the review process.

2. Illustrations should be numbered according to their sequence in the text. References should be made in the text to each illustration.

3. Illustrations should be designed with the format of the page of the journal in mind. Illustrations should be of such a size as to allow a reduction of 50%.

4. Lettering should be big enough to allow a reduction of 50% without becoming illegible, any lettering should be in English. Use the same kind of lettering throughout and follow the style of the journal.

5. If a scale should be given, use bar scales on all illustrations instead of numerical scales that must be changed with reduction.

6. Explanations should be given in the figure legend(s). Drawn text in the illustrations should be kept to a minimum.

7. Photographs are only acceptable if they have good contrast and intensity.

### ***Color artwork***

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

### ***Illustration services***

Elsevier's WebShop offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

### ***Figure captions***

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

### **Tables**

1. Authors should take notice of the limitations set by the size and lay-out of the journal. Large tables should be avoided. Reversing columns and rows will often reduce the dimensions of a table.

2. If many data are to be presented, an attempt should be made to divide them over two or more tables.

3. Tables should be numbered according to their sequence in the text. The text should include references to all tables.

4. Tables should be provided as separate files independent of the main manuscript file.

5. Each table should have a brief and self-explanatory title.

6. Column headings should be brief, but sufficiently explanatory. Standard abbreviations of units of measurement should be added between parentheses.

7. Vertical lines should not be used to separate columns. Leave some extra space between the columns instead.

8. Any explanation essential to the understanding of the table should be given as a footnote at the bottom of the table.

## References

### *Reference links*

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

### *Data references*

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

### *Reference management software*

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/veterinary-microbiology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

### *Reference style*

1. All publications cited in the text should be presented in a list of references following the text of the manuscript. The manuscript should be carefully checked to ensure that the spelling of author names and dates are exactly the same in the text as in the reference list. For original research papers, the list should not exceed 35 references (it may be longer for review articles).

2. In the text, refer to the author's name (without initial) and year of publication, followed – if necessary – by a short reference to appropriate pages. Examples: "Since Peterson (1988) has shown that..." "This is in agreement with results obtained later (Kramer, 1989, pp.12–16)".
3. If reference is made in the text to a publication written by more than two authors, the name of the first author should be used followed by "et al.". This indication, however, should never be used in the list of references. In this list the names of first author and co-authors should be included.
4. References cited together in the text should be arranged chronologically. The list of references should be arranged alphabetically by author name, and chronologically per author. If an author's name in the list is also mentioned with co-authors, the following order should be used: publications of the single author, arranged according to publication dates – publications of the same author with one co-author – publications of the author with more than one co-author. Publications by the same author(s) in the same year should be listed as 1974a, 1974b, etc.
5. Abbreviate the titles of periodicals mentioned in the list of references; according to the List of Title Word Abbreviations mentioned below. The correct abbreviation for this journal is *Vet. Microbiol.*
6. In the case of publications in any language other than English, the original title is to be retained. However, the titles of publications in non-Latin alphabets should be transliterated, and a notation such as "(in Russian)" or "(in Greek, with English abstract)" should be added.
7. Work accepted for publication but not yet published should be referred to as "in press".
8. References concerning unpublished data and "personal communications" should not be cited in the reference list but may be mentioned in the text.
9. Web references may be given. As a minimum, the full URL is necessary. Any further information, such as Author names, dates, reference to a source publication and so on, should also be given.
10. Articles available online but without volume and page numbers may be referred to by means of their Digital Object identifier (DOI).
- 11.

Use the following system for arranging your references:

a. Data References

[dataset]Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1.  
<http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

b. For periodicals

Chin, J.C., Dai, Y., Watts, J.E., 1995. Antibody response against *Pseudomonas aeruginosa* membrane proteins in experimentally infected sheep. *Vet. Microbiol.* 43, 21–32.

c. For edited symposia, special issues, etc. published in a periodical

Caffrey, J.P., 1994. Status of bovine tuberculosis eradication programmes in Europe. In: Wood, P.R., Monaghan, M.L., Rothel, J.S. (Eds.), *Bovine Tuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 40, 1–4.

d. For books

Armitage, P., Berry, G., 1987. *Statistical Methods in Medical Research*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 94–100, 411–416.

e. For multi-author books

Butler, J.E., 1981. A concept of humoral immunity among ruminants and an approach to its investigation. In: Butler, J.E., Nielson, K., Duncan, J.R. (Eds.), *The Ruminant Immune System*, Plenum Press, New York, pp. 3–55.

### ***Journal abbreviations source***

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

### **AudioSlides**

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. [More information and examples are available](#). Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

### **Data visualization**

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

### **Supplementary material**

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

### **Research data**

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

### ***Data linking***

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

### ***Mendeley Data***

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

### ***Data statement***

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

### **Additional information**

1. Manuscripts should have **numbered lines** with wide margins and **double spacing** throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. **Every page of the manuscript should be numbered.** However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

2. Manuscripts in general should be organized in the following order:

Title (should be clear, descriptive and not too long)

Name(s) of author(s)

Complete postal address(es) of affiliations

Full telephone and fax numbers and e-mail address of the corresponding author

Present address(es) of author(s) if applicable

Complete correspondence address including e-mail address to which the proofs should be sent

Abstract

Keywords (indexing terms), normally 3 – 6 items.

Introduction

Methods, techniques

Results

Discussion

Conclusion

Acknowledgements and any additional information concerning research grants, etc.

References

Tables

Figure captions

Tables (separate file(s))

Figures (separate file(s))

3. Titles and subtitles should not be run within the text. They should be typed on a separate line, without indentation. Use lower-case letter type.

4. SI units should be used.

5. Elsevier reserves the privilege of returning to the author for revision accepted manuscripts and illustrations which are not in the proper form given in this guide.



## After Acceptance

### Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

### Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

**Additional information**

Authors can also keep track of the progress of their accepted article, and set up e-mail alerts informing them of changes to their manuscript's status, by using the "Track your accepted article" option on the journal's homepage. For privacy, information on each article is password-protected. The author should key in the "Our Reference" code (which is in the letter of acknowledgement sent by the Publisher on receipt of the accepted article) and the name of the corresponding author.