

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
COMISSÃO DE GRADUAÇÃO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Janira Prichula

**DIVERSIDADE E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS
DE *ENTEROCOCCUS* SP. ISOLADOS DE LEITE BUBALINO
NO SUL DO BRASIL**

Porto Alegre

2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
COMISSÃO DE GRADUAÇÃO DO CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Janira Prichula

**DIVERSIDADE E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS
DE *ENTEROCOCCUS* SP. ISOLADOS DE LEITE BUBALINO
NO SUL DO BRASIL**

Artigo apresentado à Comissão de Graduação do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial e obrigatório para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Guedes Frazzon

Porto Alegre

2012

NOTA

Este Trabalho de Conclusão de Curso está apresentado na forma de artigo, em consonância com as normas exigidas pelo periódico “**REVISTA BRASILEIRA DE CIÊNCIA VETERINÁRIA**”, apresentadas em anexo. O texto foi redigido em Língua Portuguesa, de acordo com a Decisão 01 de 2010 da Comissão de Graduação do Curso de Ciências Biológicas que regulamenta a atividade de Trabalho de Conclusão do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Ana Paula Guedes Frazzon, pela excelente orientação, pela vivência agradável, pelo carinho, por dedicar seu tempo a me ajudar, e por todos os aprendizados durante o Trabalho de Conclusão de Curso.

Ao Prof. Pedro Alves d' Azevedo pela oportunidade de fazer parte de um grupo tão rico em recursos intelectuais e afetivos, como o grupo do Laboratório de Cocos Gram-positivos da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Aos membros da Banca Examinadora, Amanda de Souza Motta e Gustavo Pelicoli Riboldi, por aceitarem o convite para fazer parte da avaliação deste trabalho.

À minha família, em especial, à minha amada irmã Jacira Prichula, por todo apoio e atenção em todos os momentos de minha vida.

Ao meu colega e namorado Fernando Bueno, pelo companheirismo, paciência e amor dedicado desde o início do curso.

À minha grande amiga e colega Naiara Aguiar Santestevan, pela amizade única que construímos ao longo do curso, também, pela disponibilidade e boa vontade na hora de me ajudar sempre que precisei durante a faculdade.

À amiga e colega de trabalho Rebeca Inhoque Pereira, que tive a sorte de me aproximar e trabalharmos juntas. Pelos momentos de troca, sugestões, carinho e muitas risadas durante todos os dias que desenvolvi a monografia.

À querida amiga Dejoara de Angelis Zvoboda pela imensa contribuição neste trabalho.

Aos meus colegas da graduação, pela amizade, pelas boas risadas e pelos momentos de descontração, que tornaram as aulas ainda mais divertidas; por terem feito cada momento dessa graduação valer à pena.

Muito Obrigada!

“Que cada um considere a si mesmo, não como um homem procurando satisfazer sua própria sede de conhecimento [...], mas como um colaborador numa grande obra comum relacionada com os interesses supremos da humanidade”.

HERMANN VON HELMHOLTZ

Físico e fisiologista alemão (1821-1894)

1 **Diversidade e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos de *Enterococcus* sp.**
2 **isolados de leite bubalino no sul do Brasil**

3
4 *Diversity and antimicrobial susceptibility profile of *Enterococcus* sp. isolated from*
5 *buffalo milk from the south of Brazil*

6
7 Janira Prichula¹, Ana Paula Guedes Frazzon²

8
9 **RESUMO**

10 O leite bubalino é reconhecido mundialmente pelo alto valor biológico de seus
11 constituintes. Em vista disso, a procura por produtos derivados de leite de búfala tem
12 aumentado no mercado, consideravelmente, nas últimas décadas. Este trabalho teve
13 como objetivo avaliar a diversidade e o perfil de suscetibilidade de *Enterococcus* sp.
14 isolados de leite bubalino no sul do Brasil. Bactérias do gênero enterococos foram
15 selecionadas e isoladas de quatro amostras de um *mix* de leite de búfala cedidas pela
16 *Cooperativa Sulriograndense de Bubalinocultores Ind. Com. Ltda.* Os enterococos
17 isolados foram identificados em nível de espécie através de suas características
18 fenotípicas e seus perfis de suscetibilidade foram analisados através do método de
19 disco-difusão em ágar. Oitenta bactérias foram isoladas do leite bubalino, sendo 63,75%
20 *Enterococcus faecalis*, 28,75% *Enterococcus faecium*, 2,5% *Enterococcus durans*,
21 3,75% *Enterococcus* sp. e 1,25% *Lactococcus* sp. A maioria dos isolados de

¹ Universidade Federal do Rio Grande de Sul (UFRGS); Instituto de Biociências; Porto Alegre; Rio Grande do Sul; Brasil.

² Universidade Federal do Rio Grande de Sul (UFRGS); Instituto de Ciências Básicas da Saúde; Departamento de Microbiologia; Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. Autor para correspondência. E-mail: ana.frazzon@ufrgs.br

22 enterococos foi suscetível aos antimicrobianos testados, entretanto 13,9% foram
23 resistentes a nitrofurantoína, 12,7% a tetraciclina, 1,3% a eritromicina, 1,3% a
24 norfloxacina, 1,3% a cloranfenicol e 1,3% a estreptomicina. O leite bubalino apresentou
25 uma diversidade de espécie de enterococos semelhante às obtidas em outros estudos
26 com alimentos de origem animal. Contudo, a presença de *E. faecalis* multirresistentes
27 isoladas nesse estudo alerta para a importância da cadeia alimentar na disseminação de
28 resistência aos antimicrobianos de uso clínico fora de ambientes nosocomiais.

29 **PALAVRAS-CHAVE:** diversidade, enterococos, leite bubalino, resistência

30

31

SUMMARY

32 Buffalo milk is recognized worldwide for the high biological value of its constituents.
33 As a result, the demand for products derived from buffalo milk has increased in the
34 market considerably in recent decades. This study aimed to assess the diversity and
35 susceptibility profile of *Enterococcus* sp. isolated from buffalo milk in the south of
36 Brazil. Bacteria of the genus *Enterococcus* were selected and isolated from four samples
37 of a mix of buffalo milk provided by the *Cooperative Sulriograndense Bubalinocultores*
38 *Ind. Com Ltda.* Enterococci isolates were identified to the species level by phenotypic
39 characteristics and their susceptibility profiles were analyzed using the disk diffusion
40 method in agar. Eighty bacteria were isolated from buffalo milk, 63.75% belonging to
41 *Enterococcus faecalis*, 28.75% to *Enterococcus faecium*, 2.5% to *Enterococcus durans*,
42 3.75% to *Enterococcus* sp and 1.25% to *Lactococcus* sp. Most enterococci isolates
43 were susceptible to the antibiotics tested, however 13.9% were resistant to
44 nitrofurantoin, 12.7% to tetracycline, 1.3% to erythromycin, 1.3% to norfloxacin, 1.3%
45 to chloramphenicol and 1.3% to streptomycin. The diversity of enterococci species from

46 buffalo milk were very similar to those obtained in other studies with animal foods,
47 however the presence of *E. faecalis* multiresistant isolated in this study highlights the
48 importance of the food chain in the dissemination of antimicrobial resistance outside of
49 nosocomial environments.

50 **KEYWORDS:** diversity, enterococci, buffalo milk, resistance

51

52 **INTRODUÇÃO**

53 O interesse pela criação de búfalos verificado no Brasil, nas últimas décadas,
54 decorre da rusticidade, inerente a esta espécie, que implica em maior resistência a
55 doenças, menor exigência quanto à qualidade das pastagens e menor custo de produção
56 quando comparados aos bovinos (Amaral e Escrivão, 2005). No Rio Grande do Sul, o
57 crescimento da demanda por produtos lácteos processados com leite de búfala tem
58 aumentado cerca de 30% ao ano (Cooperbúfalo, 2012).

59 O leite bubalino é reconhecido mundialmente pelo valor biológico de seus
60 constituintes, visto que apresentam elevado teor de proteínas e minerais, e menor índice
61 de colesterol do que o leite bovino (Amaral et al., 2005). Além disso, o rendimento
62 industrial do leite de búfala na elaboração de laticínios é 40% superior ao leite bovino
63 (Embrapa, 2012).

64 *Enterococcus* sp. são cocos Gram-positivos, catalase negativos, capazes de
65 tolerar variações de temperatura (10 - 45°C), pH (4,5 - 10) e altas concentrações de sais
66 (Teixeira et al., 2011). Estas bactérias são amplamente distribuídas na natureza,
67 compreendendo 46 espécies (Euzéby, 2012), sendo *E. faecalis* e *E. faecium* as mais
68 frequentes em alimentos, plantas, ambiente e trato gastrointestinal de humanos e
69 animais (Pangallo et al., 2004; d' Azevedo et al., 2006; Riboldi et al., 2008).

70 Os enterococos são bactérias ácido láticas que podem ser encontradas no leite e
71 são muito utilizadas na fabricação de alimentos fermentados, como culturas *starter*,
72 probióticos (Franz et al., 2003; Gomes et al., 2010) e inibidores de *Listeria*
73 *monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*, devido à produção de bacteriocinas (Giraffa,
74 2002; Morais et al., 2012). No entanto, os enterococos também podem ser indicadores
75 de contaminação fecal na produção e processamento de alimentos; bem como podem ser
76 reservatórios de genes de resistência, capazes de se disseminar na cadeia alimentar,
77 contribuindo para a propagação da resistência a antibióticos na população humana.
78 Estudos epidemiológicos salientam que, pela sua natureza oportunista, os enterococos
79 têm emergido como patógenos associados com infecções nosocomiais (Gales et al.,
80 2009; Bender et al., 2009; Lin et al., 2012).

81 Mesmo sabendo-se dos benefícios do leite bubalino e da sua significância no
82 mercado, a literatura ainda é escassa no que se refere à qualidade microbiológica desse
83 produto. Nesse sentido, este trabalho avaliou a diversidade e o perfil de suscetibilidade
84 de *Enterococcus* sp. isolados de leite bubalino no sul do Brasil.

85

86 MATERIAL E MÉTODOS

87 As quatro amostras de leite bubalino cru refrigerado utilizadas nesse estudo
88 foram cedidas pela *Cooperativa Sulriograndense de Bubalinocultores Ind. Com. Ltda*,
89 no período de junho a agosto de 2012. Estas amostras continham uma mistura de leites
90 de búfalas de várias propriedades, e foram transportadas até o laboratório em caixas
91 isotérmicas contendo gelo reciclável, sendo mantidas na refrigeração até o momento das
92 análises. Os experimentos de seleção e isolamento das bactérias foram realizados no
93 Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da

94 Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). A caracterização fenotípica das
95 espécies e os testes de determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos foram
96 realizados no Laboratório de Cocos Gram-positivos da Universidade Federal de
97 Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA).

98 Os ensaios de seleção e de isolamento de enterococos foram realizados com a
99 diluição das amostras de leite bubalino em meio seletivo Caldo Azida Dextrose (DAB -
100 *Dextrose Azida Broth*, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Em tubos contendo 9 mL
101 de DAB foi noculado 1 mL de leite, estes tubos foram incubados na estufa por 24 horas,
102 a 35°C ±2°C. Após o período de incubação, foram realizadas diluições seriadas até 10⁻⁵,
103 sendo cada uma das 5 diluições plaqueadas em triplicata em ágar Infusão Cérebro
104 Coração (BHI- *Brain Heart Infusion*, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) acrescido
105 de 6,5% de NaCl (Merk Indústrias Químicas S.A., RJ, Brasil). As placas foram
106 incubadas por 24 horas, a 35°C ±2°C. Após o período de incubação, cerca de 25
107 colônias, foram selecionadas aleatoriamente, das 4 amostras de leite, e foram semeadas
108 em Ágar Bile Esculina (BEA- *Bile Esculin Agar*, Difco Laboratories, Detroit, MI,
109 USA). Os isolados que apresentavam capacidade de hidrolisar esculina na presença de
110 sais biliares foram semeados em ágar BHI. Posteriormente, verificou-se a produção da
111 enzima catalase utilizando peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% (v/v) e a capacidade
112 desses microrganismos de multiplicar-se a 10°C e 45°C, durante 24 horas de cultivo.

113 Os isolados que apresentaram resultado negativo para produção da enzima
114 catalase e que apresentaram crescimento a 10°C e 45°C foram mantidos em ágar BHI, e
115 submetidos à identificação microscópica preliminar através da verificação das
116 características morfo-tintoriais em esfregaços corados pelo método de Gram, para evitar
117 possíveis contaminações futuras. Em seguida, cada isolado foi mantido sob a forma de

118 suspensão em solução contendo 10% de Skin Milk (Difco Laboratories, Detroit, MI,
119 USA) e glicerol a 10% (v/v), e armazenados em criotubos a – 20°C.

120 Posteriormente, foi realizada a caracterização fenotípica das espécies. Os
121 isolados foram caracterizados presuntivamente em nível de espécie por testes
122 fisiológicos convencionais seguindo as recomendações propostas no *Manual of Clinical*
123 *Microbiology* (Teixeira et al., 2011). Esses ensaios incluíram testes para verificar a
124 capacidade dos isolados de utilizar piruvato, hidrolisar arginina, produzir pigmento,
125 tolerar o telurito de potássio, produzir ácidos a partir de diversas fontes de carboidratos
126 (L-arabinose, manitol, metil- α -D-glicopiranosídeo (MGP), D-rafinose, sacarose, D-
127 sorbitol e D-sorbose) e teste de motilidade. Os testes realizados para avaliar a produção
128 de pigmento e a motilidade dos isolados foram realizados apenas nos casos em que estes
129 testes fossem definitivos para identificar alguns isolados. Os ensaios foram realizados
130 com cultivos recentes dos isolados em ágar BHI, obtidos após incubação a 35°C \pm 2°C,
131 por 24 horas, com os quais foram preparadas suspensões bacterianas em solução salina a
132 0,85% esterilizada, com turbidez semelhante à da solução padrão 0,5 de McFarland
133 (aproximadamente 1 a 2 x 10⁸ UFC/mL). Cem microlitros de cada suspensão foram
134 inoculados nos tubos contendo os meios testados, e os tubos foram incubados a 35°C
135 \pm 2°C por sete dias. Diariamente, realizaram-se as leituras e interpretações, observando-
136 se a alteração da cor dos meios testados devido à mudança de pH. A produção de
137 pigmento foi observada em culturas obtidas em ágar BHI após 24h de incubação a 35°C
138 \pm 2°C, com o auxílio de um *swab* observava-se a produção de coloração amarela das
139 colônias consideradas positivas. O teste para a verificação da motilidade foi realizado
140 inoculando-se as amostras bacterianas com o auxílio de agulha bacteriológica em
141 *Motility Medium* (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), seguido de incubação a 35°C

142 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas. A observação de turvação indicou resultado positivo. Cepas padrão
143 de *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Enterococcus gallinarum* RS-64 foram
144 utilizados como controle para os testes.

145 O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos foi avaliado apenas para as
146 bactérias pertencentes ao gênero *Enterococcus* sp., através da utilização do teste de
147 difusão em ágar, conforme recomendações do *Clinical and Laboratory Standard*
148 *Institute* (CLSI, 2012). Os ensaios foram realizados com cultivos dos isolados em ágar
149 BHI, obtidos após incubação a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 24 horas, com os quais foram preparadas
150 suspensões bacterianas em solução salina a 0,85% esterilizada, com turbidez semelhante
151 à da solução padrão 0,5 de McFarland (aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8$ UFC/mL). As
152 suspensões foram semeadas, com o auxílio de *swabs* esterilizados sobre a superfície
153 seca das placas contendo Ágar Mueller-Hinton (*Mueller-Hinton Agar*, Difco
154 Laboratories, Detroit, MI, USA) para obter-se um crescimento uniforme e confluyente.
155 Em seguida, sobre a superfície dos meios inoculados, foram colocados os discos
156 contendo os seguintes antibióticos: nitrofurantoína - NIT (300 μg), tetraciclina - TET
157 (30 μg), eritromicina - ERI (15 μg), norfloxacinina - NOR (10 μg), cloranfenicol - CLO
158 (30 μg), ciprofloxacina - CIP (5 μg), ampicilina - AMP (10 μg), vancomicina - VAN
159 (30 μg) e linezolida - LIN (30 μg) (Oxoid, Vasingstoke, UK). Para detecção de níveis
160 elevados de resistência aos aminoglicosídeos (HLR-A) foram utilizados discos de
161 estreptomicina - EST (300 μg) e gentamicina - GEN (120 μg) (Oxoid, Vasingstoke, UK),
162 como preconiza o CLSI (2012). Após incubação por 24 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, foram
163 realizadas as leituras e as interpretações dos diâmetros dos halos de inibição, segundo as
164 recomendações do CLSI (2012). Para controle de qualidade dos testes de suscetibilidade

165 foram utilizadas as seguintes amostras padrão *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e
166 *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

167

168 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

169 A partir da seleção e isolamento de enterococos das quatro amostras (A, B, C e
170 D) de leite bubalino recebidas da *Cooperativa Sulriograndense de Bubalinocultores*
171 *Ind. Com. Ltda.* foram isoladas um total de 80 bactérias. Dezesete bactérias foram
172 isoladas da Amostra A, 18 da Amostra B, 24 da Amostra C e 21 da Amostra D. Essas
173 bactérias foram capazes de crescer em DAB, em ágar BHI acrescido de 6,5% NaCl e
174 hidrolisaram esculina na presença de sais biliares. Além disso, apresentaram resultado
175 negativo para o teste da catalase, cresceram a uma temperatura ótima de 35°C, contudo,
176 foram capazes também de crescer em uma faixa entre 10°C e 45°C. Através do método
177 de Gram, foi possível confirmar que todos os isolados testados eram cocos Gram-
178 positivos, que ocorrem isolados, arranjados aos pares ou em cadeias curtas,
179 características típicas apresentadas por enterococos (Murray, 1990; Oplustil et al., 2004;
180 Teixeira et al., 2011).

181 As 80 bactérias isoladas das amostras de leite bubalino foram identificadas em
182 nível de espécie através de seus perfis fenotípicos. Destas, 43,75% (35/80) pertenciam à
183 espécie *Enterococcus faecalis*, 25% (20/80) *Enterococcus faecium*, 20% (16/80) *E.*
184 *faecalis* atípicos, 3,75% (3/80) *E. faecium* atípicos, 2,5% (2/80), *Enterococcus durans*,
185 1,25% (1/80) *Lactococcus* sp. e 3,75% (3/80) foram identificados como *Enterococcus*
186 sp. Na amostra A, 16 bactérias foram identificados como *E. faecium* e uma bactéria
187 como *E. faecalis* atípico. Na amostra B, 7 isolados pertenciam a espécie *E. faecalis*, 5 *E.*
188 *faecalis* atípicos, 2 *Enterococcus durans*, 1 *Lactococcus* sp. e 3 isolados não foram

189 possíveis de serem identificados em nível de espécie. Já na amostra C foram
 190 encontradas 17 *E. faecalis* e 7 *E. faecalis* atípicos. Na amostra D, 11 bactérias foram
 191 identificadas como *E. faecalis*, 4 *E. faecium*, 3 *E. faecalis atípicos* e 3 *E. faecium*
 192 atípicos. O perfil fenotípico das bactérias que apresentaram características atípicas pode
 193 ser visualizado na Tabela 1.

Tabela 1: Características fenotípicas atípicas de bactérias isoladas de leite bubalino no sul do Brasil

Espécies	Características fenotípicas ^a									
	MAN	SOR	ARG	ARA	SBL	RAF	SAC	PIR	MGP	TEL
<i>E. faecalis</i> ^I	+	-	+	+ ^b	+	-	+	+	-	+
<i>E. faecalis</i> ^{II}	+	-	+	-	+	-	- ^b	+	-	- ^b
<i>E. faecalis</i> ^{III}	+	-	+	+ ^b	+	+ _b	+	+	-	+
<i>E. faecium</i> ^{IV}	+	-	+	+	-	+	+	+ ^b	-	-

^a MAN, manitol; SOR, sorbose; ARG, arginina; ARA, arabinose; SBL, sorbitol; RAF, rafinose; SAC, sacarose; PIR, piruvato; MGP, metil- α -D-glicopiranosídeo; TEL, telurito de potássio. ^b Características atípicas. ^I Fenótipo atípico encontrado na amostra A e C. ^{II} Fenótipo atípico encontrado na amostra B. ^{III} Fenótipo atípico encontrado na amostra D. ^{IV} Fenótipo atípico encontrado na amostra D.

194 As frequências de espécies de enterococos observadas no presente estudo estão
 195 em concordância com os dados da literatura que registram a maior frequência de *E.*
 196 *faecalis* e *E. faecium* em alimentos de origem animal (Cortés et al., 2006; Tebaldi et al.,
 197 2008; Riboldi et al., 2008; Ruzauskas, et al., 2009). A predominância de *E. faecalis* em
 198 amostras de leite também já foi relatada em outros trabalhos que avaliaram leite bovino
 199 pasteurizado (Fracalanza et al., 2007), leite bovino cru proveniente de tanques de
 200 refrigeração (Tebaldi et al., 2008) e amostras de leite bovino e produtos lácteos em
 201 Portugal (Lopes et al., 2005). Contudo, não há trabalhos na literatura que relatem a
 202 diversidade de enterococos em leite de búfala para que se possa comparar com os
 203 achados desse estudo.

204 A presença de um isolado pertencente ao gênero *Lactococcus* sp. nas amostras
205 de leite de búfala avaliadas nesse estudo, pode ser justificada pelo fato dessa bactéria
206 também ser um coco Gram-positivo, catalase negativa e produtora de ácido lático,
207 comumente encontrada em amostras de leite (Viani e Lázaro, 2003; Riboldi et al.,
208 2008).

209 A caracterização fenotípica dos enterococos isolados neste trabalho evidenciou
210 uma alta variabilidade fisiológica de *E. faecalis* e de *E. faecium*. As atípicas fisiológicas
211 detectadas neste estudo podem ser justificadas, visto que o método empregado para
212 identificar as espécies de enterococos é baseado no perfil fenotípico de enterococos
213 oriundos de amostras clínicas. Entretanto, atípicas também já foram encontradas em
214 outros trabalhos que analisaram enterococos de origem clínica (Resende, 2012); bem
215 como em estudos com enterococos presentes em alimentos de origem animal, esse fato
216 pode ser explicado, pelo menos em parte, pela adaptação metabólica ao substrato
217 oferecido (Fracalanza, 2007).

218 Os resultados do perfil de suscetibilidade das espécies de *Enterococcus* sp.
219 isoladas de leite bubalino demonstraram uma elevada frequência de isolados suscetíveis
220 aos 11 antimicrobianos testados, conforme verificado na Tabela 2. Esta alta frequência
221 de cepas de enterococos sensíveis pode ser explicada pela rusticidade do gado bubalino
222 o qual apresentam uma maior resistência às doenças infecciosas (Amaral e Escrivão,
223 2005).

224 É importante ressaltar que, dos 79 enterococos testados, 13,9% (11/79)
225 apresentaram resistência à nitrofurantoína, 12,7% (10/79) à tetraciclina, 1,3% (1/79) ao
226 cloranfenicol, 1,3% (1/79) à estreptomicina, 1,3% (1/79) à norfloxacina e 1,3% (1/79) à
227 eritromicina. Quarenta e sete (59,5%) isolados apresentaram resistência intermediária à

228 norfloxacina, 58,2% (46/79) à ciprofloxacina, 51,9% (41/79) à eritromicina e 6,3%
 229 (5/79) à nitrofurantoína.

Tabela 2: Perfil de suscetibilidade das espécies de *Enterococcus* sp. isoladas de leite bubalino no sul do Brasil

Ag. Antimic. ^a	Percentual de enterococos resistentes								
	<i>E. faecalis</i> (n= 51)			<i>E. faecium</i> (n= 23)			Outros <i>Enterococcus</i> sp. (n= 5)		
	S	I	R	S	I	R	S	I	R
NIT	88,2	-	11,8	78,3	21,7	-	-	-	100
TET	80,4	-	19,6	100	-	-	100	-	-
ERI	45,1	52,9	2	34,8	65,2	-	100	-	-
NOR	17,6	80,4	2	73,9	26,1	-	100	-	-
EST	98	-	2	100	-	-	100	-	-
CLO	98	-	2	100	-	-	100	-	-
CIP	27,5	72,5	-	60,9	39,1	-	100	-	-
AMP	100	-	-	100	-	-	100	-	-
VAN	100	-	-	100	-	-	100	-	-
GEN	100	-	-	100	-	-	100	-	-
LIN	100	-	-	100	-	-	100	-	-

^a Agentes Antimicrobianos; NIT, nitrofurantoína; TET, tetraciclina; ERI, eritromicina; NOR, norfloxacina; EST, estreptomicina; CLO, cloranfenicol; CIP, ciprofloxacina; AMP, ampicilina; VAN, vancomicina; GEN, gentamicina; LIN, linezolida.

230 Enterococos resistentes a antimicrobianos isolados de alimentos têm sido
 231 relatados em estudos no Brasil e também em outros países (Lopes et al., 2005; Cortés et
 232 al., 2006; Fracalanza et al., 2007; Cassenego et al.; 2011). Espécies de enterococos
 233 resistentes à nitrofurantoína, um antibiótico utilizado para tratamento de infecções no
 234 trato genitourinário, também foram identificadas em enterococos isolados de queijos e
 235 repolho em Porto Alegre (Riboldi et al., 2008).

236 Dados da literatura relatam a existência de cepas de enterococos resistentes à
 237 tetraciclina em alimentos (Fracalanza et al., 2007; Ruzauskas, et al., 2009) e na clínica
 238 médica (Bender et al., 2009). Este estudo reitera estes dados, visto que 10 (12,7%)
 239 bactérias isoladas do leite de búfala foram resistentes à tetraciclina. Apesar de ter seu

240 uso banido como promotor de crescimento em animais na Europa, a tetraciclina
241 continua sendo utilizada para o tratamento e a prevenção de infecções em animais na
242 clínica veterinária (Lukášová e Sustácková, 2003).

243 Elevados percentuais de resistência intermediária à eritromicina (51,9%) foram
244 detectados entre os isolados de leite bubalino. Estes resultados estão de acordo com os
245 dados descritos por Fracalanza et al. (2007), que também obtiveram percentuais
246 expressivos (58,2%) de resistência intermediária envolvendo enterococos em leite
247 bovino pasteurizado e carne de frango. Já, com relação à resistência intermediária à
248 norfloxacin (59,5%) e à ciprofloxacina (58,2%) neste estudo, comparando, ainda, com
249 o estudo de Fracalanza et al. (2007), os resultados não são semelhantes, apenas 3,2% e
250 13,8% dos enterococos, apresentaram resistência intermediária à norfloxacin e à
251 ciprofloxacina, respectivamente.

252 As fluoroquinolonas são antimicrobianos sintéticos, de amplo espectro, ativas
253 contra uma grande variedade de bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e
254 micoplasmas de importância na medicina veterinária, empregados para o tratamento de
255 diversas doenças infecciosas, como em casos de inflamação da glândula mamária
256 (mastite). Segundo Viani e Lázaro (2003), o uso indiscriminado de antibióticos em
257 dosagens inadequadas, principalmente em casos de mastite, favorece o desenvolvimento
258 de cepas patogênicas multirresistentes, cuja ocorrência na glândula mamária vem sendo
259 observada frequentemente em casos de mastite subclínica bubalínica causada por
260 *Enterococcus gallinarum*.

261 A análise dos perfis de resistência, de acordo com as espécies de enterococos
262 encontradas no leite bubalino, demonstrou percentuais menos elevados de resistência
263 para *E. durans*. Os dois isolados de *E. durans* e os três isolados pertencentes ao gênero

264 *Enterococcus* sp, não identificados em nível de espécie, apresentaram resistência à
265 nitrofurantoína e susceptibilidade aos demais antimicrobianos testados. A resistência a
266 nitrofurantoína também já foi encontrada em estudos com *E. durans* isolados de leite de
267 cabra (Cortés, 2006). Constatou-se também que 65,2% (15/23) dos *E. faecium* isolados
268 do leite bubalino apresentaram resistência intermediária à eritromicina, 39,1% (9/23) à
269 ciprofloxacina, 26,1% (6/23) à norfloxacina e 21,7% (5/23) à nitrofurantoína.

270 Em relação aos *E. faecalis*, 11,8% (6/51) apresentaram resistência a
271 nitrofurantoína, 19,6% (10/51) à tetraciclina e 2% (1/51) foram resistentes à
272 eritromicina, norfloxacina, estreptomicina e cloranfenicol. É importante salientar que 3
273 (5,9%) dos *E. faecalis* apresentaram resistência à tetraciclina e resistência intermediária
274 a pelo menos dois antibióticos de classes diferentes, e um dos isolados de *E. faecalis* foi
275 resistente a 5 classes diferentes de antimicrobianos testadas: a tetraciclina, eritromicina,
276 norfloxacina, estreptomicina e cloranfenicol. Este dado é bastante preocupante, uma vez
277 que bactérias multirresistentes podem representar reservatórios de genes de resistência,
278 sendo capazes de realizar trocas de material genético com as células da microbiota do
279 trato gastrointestinal do hospedeiro, e, assim, se disseminar na cadeia alimentar. Isso
280 demonstra que os alimentos desempenham um papel importante na propagação de cepas
281 resistentes a antibióticos de uso clínico para a população humana (Giraffa, 2002;
282 Ruzauskas, et al., 2009).

283

284 **CONCLUSÕES**

285 O leite bubalino apresentou uma diversidade de espécie de enterococos
286 semelhantes às obtidas em outros estudos com alimentos de origem animal, com
287 predomínio de *E. faecalis* e *E. faecium*.

288 Apesar dos elevados percentuais de enterococos suscetíveis aos antibióticos
289 testados, a presença de *E. faecalis* multirresistentes isoladas nesse estudo alerta para a
290 importância da cadeia alimentar na disseminação de resistência aos antimicrobianos de
291 uso clínico fora de ambientes nosocomiais.

292

293 REFERÊNCIAS

294 AMARAL, F.R.; CARVALHO, L.B.; SILVA, N.; BRITO, J.R.F. Qualidade do leite de
295 búfalas: composição. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 29, n. 2, p.
296 106-110, 2005.

297 AMARAL, F.R.; ESCRIVÃO, S.C. Aspectos Relacionados à búfala leiteira. *Revista*
298 *Brasileira de Reprodução Animal*, v. 29, n. 2, p. 111-117, 2005.

299 BENDER, E.A.; FREITAS, A.L.P.; REITER, K.C.; LUTZ, L.; BARTH, A.L.
300 Identification, antimicrobial resistance and genotypic characterization of
301 *Enterococcus* spp. isolated in Porto Alegre, Brazil. *Brazilian Journal of*
302 *Microbiology*, v. 40, p. 693-700, 2009.

303 CASSENEGO, A.P.V. d' AZEVEDO, P.A.; RIBEIRO, A.M.L.; FRAZZON, J.; VAN
304 DER SAND, S.T.; FRAZZON, A.P.G. Species distribution and antimicrobial
305 susceptibility of enterococci isolated from broilers infected experimentally with
306 *Eimeria* spp. and fed with diets containing different supplements. *Brazilian*
307 *Journal of Microbiology*, v. 42, n.2, p. 480-488, 2011.

308 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for
309 antimicrobial susceptibility testing: 22st informational supplement M100-S22.
310 Wayne, PA: CLSI; 2012.

311 COOPERBÚFALO. *Cooperativa Sulriograndense de Bubalinocultores Ind. Com. Ltda*,
312 2012. Disponível em: <http://www.cooperbufalo-rs.com.br/>. Acesso em: 14 nov.
313 2012.

314 CORTÉS, C.; DE LA FUENTE, R.; CONTRERAS, A.; SÁNCHEZ, A.; CORRALES,
315 J.C.; RUIZ-SANTA-QUITERIA, J.A.; ORDEN, J.A. Occurrence and preliminar
316 study of antimicrobial resistance of enterococci isolated from dairy goats in Spain.
317 *Internacional Journal of Food Microbiology*, v. 110, p. 100-103, 2006.

318 d'AZEVEDO, P.A.; DIAS, C.A.G.; TEIXEIRA, L. M. Genetic diversity and
319 antimicrobial resistance of enterococcal isolates from southern region of Brazil.
320 *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 48, p. 11-16, 2006.

321 EMBRAPA. *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária: Amazônia Oriental*, 2012.
322 Disponível em: <http://www.cpatu.embrapa.br/>. Acesso em: 16 nov. 2012.

323 EUZÉBY, Jean Paul. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature - Genus
324 *Enterococcus*. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/e/enterococcus.html>.
325 Acesso em: 17 nov. 2012.

- 326 FRACALANZZA, S.A.P.; Identificação, resistência a antimicrobianos e caracterização
327 molecular de enterococcus isolados de alimentos. 2007. 158 f. Tese (Doutorado) –
328 Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde – Fundação Oswaldo Cruz,
329 Rio de Janeiro, 2007.
- 330 FRACALANZZA, S.A.P.; SCHEIDEGGER, E.M.D.; SANTOS, P.F. dos; LEITE, P.C.;
331 TEIXEIRA, L.M. Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from
332 poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. *Memorial Instituto*
333 *Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 7, p. 853-859, 2007.
- 334 FRANZ, C.M.A.P.; STILES, M.E.; SCHLEIFER, K. H.; HOLZAPFEL, W. H.
335 Enterococci in foods – a conundrum for food safety. *International Journal of*
336 *Microbiology*, v. 88, p. 105-122, 2003.
- 337 GALES, A.C.; SADER, H.S.; RIBEIRO, J.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; PIGNATARI,
338 A.C. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive bacteria isolated in Brazilian
339 hospitals: participating in the SENTRY program (2005-2008). *The Brazilian*
340 *Journal of Infectious Diseases*, v. 13, n. 2, p. 90-98, 2009.
- 341 GIRRAFA, G. Enterococcus from foods. *Federation of European Microbiological*
342 *Societies - Microbiology Reviews*, v. 26, p. 163-171, 2002.
- 343 GOMES, B.C., FRANCO, B.D.G.M., DE MARTINIS, E.C.P. Dualistic aspects of
344 Enterococcus spp. in foods. *Current Research, Technology and Education Topics*
345 *in Applied Microbiology and Microbial biotechnology*, p. 1119-1125, 2010.
- 346 LIN, Y.T.; HSIEH, K.S.; CHEN, Y.S.; HUANG, I.F.; CHENG, M.F. Infective
347 endocarditis in children without underlying heart disease. *Journal of*
348 *Microbiology, Immunology and Infection*, v. XX, p. 1-8, 2012.
- 349 LOPES, M.F.S.; RIBEIRO, T.; ABRANTES, M.; MARQUES, J.J.F.; TENREIRO, R.;
350 CRESPO, M.T.B. Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical and type
351 strains of enterococci. *Internacional Journal of Food Microbiology*, v. 103, p. 191-
352 198, 2005.
- 353 LUKÁSOVÁ, J.; SUSTÁCKOVÁ, A. Enterococci and antibiotic resistance. *Acta*
354 *Veterinaria Brno*, v. 72, p. 315-323, 2003.
- 355 MORAES, P.M.; PERIN, L.M.; TODOROV, S.D.; SILVA Jr., A.; FRANCO,
356 B.D.G.M.; NERO, L.A. Bacteriocinogenic and virulence potential of
357 *Enterococcus* isolates obtained from raw milk and cheese. *Journal of Applied*
358 *Microbiology*, v. 113, p. 318-328, 2012.
- 359 MURRAY, B.E. The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology*
360 *Reviews*, vol. 3, n. 1, p. 46-65, 1990.
- 361 OPLUSTIL, C.P.; ZOCCOLI, C.M.; TOBOUTI, N.R.; SINTO, S.I. Procedimentos
362 Básicos em Microbiologia Clínica. 2 ed. Brasil: São Paulo, 2004, 340p.
- 363 PANGALLO, D., HARICHOVÁ, J., KARELOVÁ, E., DRAHOVSKÁ, H.,
364 CHOVANOVÁ, K., FERIANC, P., TURNA, J.; TIMKO, J. Molecular
365 investigation of enterococci isolated from different environmental sources.
366 *Biologia*, v. 59, n. 6, p. 829-837, 2004.
- 367 RESENDE, M.C.C. Caracterização Fenotípica e Molecular de *Enterococcus* isolados na
368 cidade de Porto Alegre. 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-

- 369 graduação em Ciências da Saúde – Universidade Federal de Ciências da Saúde de
370 Porto Alegre, Porto Alegre, 2012.
- 371 RIBOLDI, G.P.; FRAZZON, J.; d' AZEVEDO, P.A.; FRAZZON, A.P.G.
372 Antimicrobial resistente profile of *Enterococcus* sp. isolated from food in
373 southern Brazil. *Brasilian Journal of Microbiology*, v. 40, p. 125-128, 2009.
- 374 RUZAUSKAS, M.; VIRGAILIS, M.; SIUGZDINIENE, R.; SUZIEDELIENE, E.;
375 SEPUTIENEE, V.; DAUGELAVICCIUS, R.; ZIENIUS, D.; SENGAUT, J.;
376 PAVILONIS, A. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from
377 livestock in Lithuania. *Veterinarsky Arhiv*, v. 79, n. 5, p. 439-449, 2009.
- 378 TEBALDI, V.M.R.; OLIVEIRA, T.L.C.; BOARI, C.A; PICCOLI, R.H. Isolamento de
379 coliformes, estafilococos e enterococos de leite cru provenientes de tanques de
380 refrigeração por expansão comunitários: identificação, ação lipolítica e
381 proteolítica. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, n. 3, p. 753-760, 2008.
- 382 TEIXEIRA L.M.; CARVALHO, M.G.; SHEWMAKER, P.L. & FACKLAM, R.R.
383 *Enterococcus*. In: VERSALOVIC, J.; CARROLL, K.C.; FUNKE, G.;
384 JORGENSEN, J.H.; LANDRY, M.L.; WARNOCK, D.W. Manual of Clinical
385 Microbiology 10th ed., Washington, DC: American Society for Microbiology
386 Press, 2011, p 350-364.
- 387 VIANNI, M.C.E.; LÁZARO, N.S. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos em
388 amostras de cocos Gram-positivos, catalase negativos, isoladas de mastite
389 subclínica bubalina. *Pesquisa veterinária Brasileira*, v. 23, n. 2, p. 47-51, 2003.

ANEXO 1: Normas exigidas pela REVISTA BRASILEIRA DE CIÊNCIA VETERINARIA para submissão de artigos.

DIRETRIZES PARA AUTORES

O periódico RBCV é uma publicação, com acesso e envio de artigos exclusivamente pela Internet (www.uff.br/rbcv). Editado na Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, destina-se a publicação de artigos de revisão (a convite do Conselho Editorial), relato de caso, e pesquisas originais nas seguintes seções: Tecnologia e Inspeção de Produtos de Origem Animal, Produção Animal, Medicina Veterinária Preventiva, Patologia e Análises Clínicas Veterinárias, Clínica Médica e Cirúrgica e Reprodução Animal.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Conselho Editorial, com assessoria de especialistas da área (revisores ad hoc). Os pareceres têm caráter imparcial e sigilo absoluto, tanto da parte dos autores como dos revisores, sem identificação entre eles. Os artigos, cujos textos necessitam de revisões ou correções, são devolvidos aos autores e, se aceitos para publicação, passam a ser de propriedade da RBCV. Os conceitos, informações e conclusões constantes dos trabalhos são de exclusiva responsabilidade dos autores.

Os manuscritos devem ser redigidos na forma impessoal, espaço entre linhas duplo (exceto nas tabelas e figuras), fonte Times New Roman tamanho 12, em folha branca formato A4 (21,0 X 29,7 cm), com margens de três cm, páginas numeradas seqüencialmente em algarismos arábicos, não excedendo a 20, incluindo tabelas e figuras (inclusive para artigos de revisão). As páginas devem apresentar linhas numeradas (a numeração é feita da seguinte forma: menu arquivo/configurar página/layout/números de linha.../numerar linhas). Não utilizar abreviações não-consagradas e acrônimos, tais como: "o T2 foi menor que o T4, e não diferiu do T3 e do T5". Quando se usa tal redação dificulta-se o entendimento do leitor e a fluidez do texto.

Prefere-se o uso da língua inglesa nos artigos submetidos.

Citações no texto: são mencionadas com a finalidade de esclarecer ou completar as idéias do autor, ilustrando e sustentando afirmações. Toda documentação consultada deve ser obrigatoriamente citada em decorrência aos direitos autorais. As citações de autores no texto são em letras minúsculas, seguidas do ano de publicação. Quando houver dois autores, usar "e" e, no caso de três ou mais autores, citar apenas o sobrenome do primeiro, seguido de et al. (não-italico). Menciona-se a data da publicação que deverá vir citada entre parênteses, logo após o nome do autor. As citações feitas no final do parágrafo devem vir entre parênteses e separadas por ponto e vírgula, em ordem cronológica. Deve-se evitar referências bibliográficas oriundas de publicações em eventos técnico-científicos (anais de congressos, simpósios, seminários e similares), bem como teses, dissertações e publicações na internet (que não fazem parte de periódicos científicos). Deve-se, então, privilegiar artigos publicados em

periódicos com corpo editorial (observar orientações percentuais e cronológicas no último parágrafo do item “Referências”).

Citação de citação (apud): não é aceita.

Língua: Portuguesa, Inglesa ou Espanhola.

Tabela: deve ser mencionada no texto como Tabela (por extenso) e refere-se ao conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. São construídas apenas com linhas horizontais de separação no cabeçalho e ao final da tabela. A legenda recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico (Ex.: Tabela 1. Ganho médio diário de ovinos alimentados com fontes de lipídeos na dieta). Ao final do título não deve conter ponto final. Não são aceitos quadros.

Figura: deve ser mencionada no texto como Figura (por extenso) e refere-se a qualquer ilustração constituída ou que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. Os desenhos, gráficos e similares devem ser feitos com tinta preta, com alta nitidez. As fotografias, no tamanho de 10 × 15 cm, devem ser nítidas e de alto contraste. As legendas recebem inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico (Ex.: Figura 1. Produção de leite de vacas Gir sob estresse térmico nos anos de 2005 e 2006). Chama-se a atenção para as proporções entre letras, números e dimensões totais da figura: caso haja necessidade de redução, esses elementos também são reduzidos e correm o risco de ficar ilegíveis, final do título não deve conter ponto final.

Tanto as tabelas quanto as figuras devem vir o mais próximo possível, após sua chamada no texto.

TIPOS E ESTRUTURA DE ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO:

1) **Artigos científicos:** devem ser divididos nas seguintes seções: título, título em inglês, autoria, resumo, palavras-chave, summary, keywords, introdução, material e métodos, resultados e discussão, agradecimentos (opcional) e referências;

2) **Artigos de revisão:** devem conter: título, título em inglês, autoria, resumo, palavras-chave, summary, keywords, introdução, desenvolvimento, conclusões, agradecimentos (opcional) e referências.

3) **Relatos de caso:** devem conter: título, título em inglês, autoria, resumo, palavras-chave, summary, keywords, introdução, relato do caso, discussão e conclusões, agradecimentos (opcional) e referências.

Os títulos de cada seção devem ser digitados em negrito, justificados à esquerda e em letra maiúscula.

Título: Em português (negrito) e em inglês (itálico), digitados somente com a primeira letra da sentença em maiúscula e centralizados. Devem ser concisos e indicar o conteúdo do trabalho. Evitar termos não significativos como “estudo”, “exame”, “análise”, “efeito”, “influência”, “avaliação” etc.

Autores: A nomeação dos autores deve vir logo abaixo do título em inglês. Digitar o nome completo por extenso, tendo somente a primeira letra maiúscula. Os autores devem ser separados por vírgula. Todos devem estar centralizados. (Ex.: Roberto Carlos de Oliveira). A cada autor deverá ser atribuído um número arábico sobrescrito ao final do sobrenome, que servirá para identificar as informações referentes a ele. No rodapé da primeira página deverá vir justificada a esquerda e em ordem crescente a numeração correspondente, seguida pela afiliação do autor: Instituição; Unidade; Departamento; Cidade; Estado e País. Deve estar indicado o autor para correspondência com o respectivo endereço eletrônico.

Resumo e Summary: Devem conter entre 200 e 250 palavras cada um, em um só parágrafo. Não repetir o título. Cada frase deve ser uma informação e não apresentar citações. Deve se iniciar pelos objetivos, descrever o material e métodos e apresentar os resultados seguidos pelas conclusões. Toda e qualquer sigla deve vir precedida da explicação por extenso. Ao submeter artigos em outra língua, deve constar o resumo em português.

Palavras-chave e keywords: Entre três e cinco, devem vir em ordem alfabética, separadas por vírgulas, sem ponto final, com informações que permitam a compreensão e a indexação do trabalho. Não são aceitas palavras-chave que já constem do título.

Introdução: Deve conter no máximo 2.500 caracteres com espaços. Explicação de forma clara e objetiva do problema investigado, sua pertinência, relevância e, ao final, os objetivos com a realização do estudo.

Material e Métodos (exceto para artigos de revisão e relato de caso): Não são aceitos subtítulos. Devem apresentar seqüência lógica da descrição do local, do período de realização da pesquisa, dos tratamentos, dos materiais e das técnicas utilizadas, bem como da estatística utilizada na análise dos dados. Técnicas e procedimentos de rotina devem ser apenas referenciados. Conter número de protocolo de aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais da Instituição de no qual o estudo foi realizado.

Resultados e Discussão (exceto para artigos de revisão e relato de caso): Os resultados podem ser apresentados como um elemento do texto ou juntamente com a discussão, em texto corrido ou mediante ilustrações. Interpretar os resultados no trabalho de forma consistente e evitar comparações desnecessárias. Comparações, quando pertinentes, devem ser discutidas e feitas de forma a facilitar a compreensão do leitor.

Conclusões: Não devem ser repetição dos resultados e devem responder aos objetivos expressos no artigo.

Desenvolvimento (exclusivo para artigos de revisão): Deve ser escrita de forma crítica, apresentando a evolução do conhecimento, as lacunas existentes e o estado atual da arte com base no referencial teórico disponível na literatura consultada.

Relato de Caso: neste tópico o autor deverá descrever detalhadamente o relato em questão, oferecendo ao leitor todas as informações necessárias para o seu perfeito entendimento.

Agradecimentos: O uso é opcional. Deve ser curto e objetivo.

Referências: Devem ser relacionadas em ordem alfabética pelo sobrenome e contemplar todas aquelas citadas no texto. Menciona-se o último sobrenome em maiúsculo, seguido de vírgula e as iniciais abreviadas por pontos, sem espaços. Os autores devem ser separados por ponto e vírgula. Digitá-las em espaço simples, com alinhamento justificado a esquerda. As referências devem ser separadas entre si (a separação deve seguir o caminho parágrafo/espacamento e selecione: depois seis pontos). No mínimo **50%** das referências devem ser de artigos publicados nos últimos dez anos. Referências de **livros, anais, internet, teses, dissertações, monografias**, devem ser evitadas.

EXEMPLOS PARA REFERÊNCIA:

Periódicos:

RODRIGUES, P.H.M; LOBO, J.R.; SILVA, E.J.A.; BORGES, L.F.O.; MEYER, P.M.; DEMARCHI, J.J.A.A. Efeito da inclusão de polpa cítrica peletizada na confecção de silagem de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum.). *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.36, n.6, p.1751 – 1760, 2007.

SOUZA, T.M.; FIGUERA, R.A.; IRIGOYEN, L.F.; BARROS, C.S.L. Estudo retrospectivo de 761 tumores cutâneos em cães. *Ciência Rural*. v. 36, n. 2, p. 555-560, 2006. Disponível em: . Acesso em 23 out. 2009.

Dissertações e Teses:

SANTOS, V.P. dos. Variações hemato-bioquímicas em equinos de salto submetidos a diferentes protocolos de exercício físico. 2006. 94 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária – Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

Livros:

LARSON, H.J. *Introduction to probability theory and statistical inference*. 3 ed. United States of America: Wiley, 1982, 656 p.

Capítulo de Livros:

HARRIS, P.A.; MAYHEW, I.G. *Musculoskeletal disease*. In: REED, S.M.; BAYLY, W.M. (eds.) *Equine Internal Medicine*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998, p. 371-426.

Anais de Congresso:

ABRAHÃO, J. S.; MARQUES, J. A.; PRUDENTE, A. C.; GROFF, A. M.; LANÇANOVA, J. J. A. G.; ROSA, L. J. Comportamento ingestivo de tourinhos mestiços submetidos a dietas com diferentes volumosos confinados aos pares. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 43. 2006. Anais... João Pessoa: SBZ, 2006. 1 CD-ROM.

O QUE ENVIAR PARA A REVISTA:

Os trabalhos para publicação são enviados exclusivamente por meio eletrônico pelo endereço www.uff.br/rbcv. Serão considerados viáveis para publicação apenas os artigos cujos autores cumprirem todas as etapas a seguir, enviando:

1. Um arquivo com o texto do artigo no campo de submissão de artigos (www.uff.br/rbcv) com as ilustrações (se houver) em P/B.
2. Formulário de Encaminhamento de Artigo, preenchido e enviado pelo e-mail do autor responsável.

INFORMAÇÕES PARA CONTATO:

Telefone: +55 21 2629-9526

E-mail: rbcv@vm.uff.br

Site: www.uff.br/rbcv

ITENS DE VERIFICAÇÃO PARA SUBMISSÃO

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

1. O artigo em anexo foi redigido de acordo com as diretrizes éticas e as Normas de Preparação de Manuscritos da Revista Brasileira de Ciência Veterinária.
2. Concordo com a transferência dos direitos sobre o presente artigo à RBCV nos termos por esta estipulados
3. O presente artigo não foi publicado ou submetido a outro periódico para publicação e não há, por parte do(s) autor(es) do artigo, qualquer impedimento à publicação do mesmo.
4. Todas as ações envolvendo a utilização de animais (especificar a espécie e quantidade) neste artigo seguiram os padrões estabelecidos pelo Comitê de Ética em Uso de Animais
5. O manuscrito foi lido e aprovado por todos os seus autores e é do conhecimento destes os termos contidos nas Normas de Editoração da RBCV especialmente, o que trata das exigências para autoria. Todos os autores bem como seus e-mail atualizados foram inseridos no momento da submissão.
6. É de minha inteira responsabilidade as informações contidas no artigo e quaisquer ações legais delas decorrentes.
7. Todos os autores, bem como os seus e-mails foram cadastrado no momento da submissão. Estou ciente em caso de não realização desta etapa o artigo será arquivado.

POLÍTICA DE PRIVACIDADE

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

Revista Brasileira de Ciência Veterinária - RBCV