

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

**Avaliação do Perfil de Atividade de Azitromicina frente a
Isolados Bacterianos Provenientes de Processos Infecciosos em
Animais de Companhia**

Ingrid Annes Pereira

2007



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE ATIVIDADE DE
AZITROMICINA FRENTE A ISOLADOS BACTERIANOS
PROVENIENTES DE PROCESSOS INFECCIOSOS EM
ANIMAIS DE COMPANHIA**

INGRID ANNES PEREIRA

Sob a Orientação da Professora
Miliane Moreira Soares de Souza

Dissertação submetida
como requisito parcial
para obtenção do grau
de **Mestre** em
Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2007

636.089

P436a

T

Pereira, Ingrid Annes, 1982-

Avaliação do perfil de atividade de azitromicina frente a isolados bacterianos provenientes de processos infecciosos em animais de companhia / Ingrid Annes Pereira. - 2007.

87 f. : il.

Orientador: Miliane Moreira Soares de Souza.

Dissertação (mestrado)- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária.

Bibliografia: f. 47-57.

1. Animais domésticos - Doenças - Tratamento - Teses. 2. Animais domésticos - Infecções- Teses. 3. Animais domésticos - Infecções - Efeito das drogas - Teses. 4. Azitromicina - Teses. I. Souza, Miliane Moreira Soares de, 1970-II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Veterinária. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

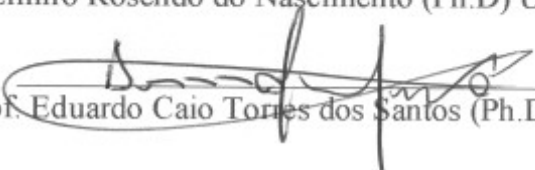
INGRID ANNES PEREIRA

Dissertação submetida ao Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre**, em 28 de fevereiro de 2007.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 28/02/07.


Prof. Miliane Moreira Soares de Souza (Ph.D) UFRRJ – Brasil


Prof. Elmiro Rosendo do Nascimento (Ph.D) UCLA, Davis – USA


Prof. Eduardo Caio Torres dos Santos (Ph.D) UFRJ – Brasil

**Ofereço este trabalho à
minha família, meu amor,
meus amigos e à minha
Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro.**

Agradecimentos

*“Coloquei toda a minha esperança no Senhor,
Ele se inclinou para mim e ouviu meu grito de socorro.
Ele me tirou de um poço de destruição, de um atoleiro de lama,
Pôs meus pés sobre uma rocha e firmou-me num lugar seguro.
Pôs um novo cântico na minha boca,
Um hino de louvor ao nosso Deus!
Senhor meu Deus! Quantas maravilhas tens feito!
Eu queria proclamá-las, mas são por demais numerosas!
Então disse: Aqui estou!
Tenho grande alegria em fazer a tua vontade, ó Deus meu.”*
Salmos 40.

Agradeço a Deus por ter me acompanhado em cada passo desse mestrado, por me fazer entender que sem Ele nada tem valor. Hoje sei que tenho uma vida nova e novos motivos para permanecer no caminho que o Senhor tem pra mim. Agradeço cada lágrima e cada dor, pois todo meu sofrimento foi uma grande oportunidade para conhecer e vivenciar de todo o seu amor. Ao olhar para trás e pensar no que já passou, ganho forças para crer que o que vem pela frente são tuas agradáveis e perfeitas promessas. Obrigada Pai, pois sei que cuidas de mim e que as minhas fraquezas jamais poderão me separar dos teus planos. Sobre mim está a vontade do Senhor!

À minha mãe, Guaraciara Annes Pereira, por toda sua dedicação e trabalho. Por todas as madrugadas acordadas, trabalhando para que eu pudesse chegar até aqui! Muito obrigada pelo apoio, pela força, pelos incentivos, pelas alegrias e pelas brigas, sei o quanto tudo isso foi necessário para que pudéssemos entender o quanto nos amamos. Muitas vezes a distância e a frieza me impediu de expressar o quanto esse amor é grande. Fico feliz por ter a oportunidade de te agradecer e dizer: Eu te amo! Você é muito especial para mim!

À minha avó, Lígia Fernandes Annes, pelo seu amor incondicional, por ter sempre me acompanhado, não só nas alegrias, mas também nas tristezas, por sempre me presentear com suas palavras de carinho. Te amo demais Liginha!

Ao meu namorado, João Paulo de Almeida Coelho. Você foi uma surpresa maravilhosa que chegou de mansinho e acabou ficando. Hoje já não consigo tirar sua marca em mim, pois você ficou com cada sorriso, cada olhar e cada sonho. Muito obrigada pela compreensão nos momentos de ausência, por ter feito parte desse trabalho tanto quanto eu, pois bastava eu precisar e lá estava você. Perdão pela falta de paciência, pelo excesso de responsabilidade, pelas brigas, mas você sabe que o nosso amor superou tudo isso. Obrigada pelo incentivo e pelo seu orgulho: Essa vitória é nossa! Te amo muito!

A toda minha família em especial a minha irmã Marcelli Annes Pereira e ao meu tio Ronaldo Annes de Almeida e a minha prima Taís Carvalho Silva. Muito obrigada, pois sei que mesmo tão distantes, vai sempre existir um carinho muito grande entre nós.

A professora Miliane Moreira Soares de Souza, por se deixar ser usada por Deus em tantos momentos da minha vida. Agradeço à amiga e irmã em Cristo Miliane, pela confiança, pelas conversas, pelos conselhos e pelo carinho. Agradeço também à Miliane orientadora pelo seu exemplo de integridade, honestidade e competência, por me ensinar a crescer como profissional e a lidar com as responsabilidades. Que Deus derrame infinitas bênçãos sobre você e sua casa!

A minha amiga, Shana Mattos de Oliveira Coelho, pelo apoio e dedicação. Sei que Deus tem planos maravilhosos para sua vida e espero um dia poder retribuir todo o amor que você me proporciona diariamente durante todo o tempo em que estamos juntas. Amo você.

À amiga Lidiane de Castro Soares. Espero que a nossa amizade seja cada vez mais forte e que ainda possamos conquistar muitas vitórias juntas.

Aos estagiários do Laboratório de Bacteriologia pela lealdade e responsabilidade com que vocês se dedicaram ao estágio. Agradeço especialmente à Débora Fontes Barbosa de Oliveira, Karem Dunga Silva, Bruno Rocha Pribull e Angélica Nogueira por estar comigo em todos os experimentos dessa dissertação. Obrigada pela força.

Agradeço àqueles que em algum momento passaram pela minha vida e se instalaram trazendo muita alegria: Marcelo Gomes, Tatiani Abreu, Bruno Gomes de Castro, Verônica Cardoso, Maura Menezes, Ligia Portugal Gomes, Alana Gabriela Goñi, Rafael Dutke Baptista e Isabela Poubell.

Às amigas, Priscila Delecrode Rauta e Ana Paula Martinez pela ajuda e companhia nos dias em que estive na Universidade Estácio de Sá, foi maravilhoso estar com vocês. Muito Obrigada!

Ao apoio oferecido pelo Curso de pós-graduação em Ciências Veterinárias e aos professores que me receberam de braços abertos, apostando na minha capacidade. Em especial aos professores Maria Julia Salim e Gonzalo Efraim Moya por acompanharem nos momentos difíceis nos quais pensei em desistir.

Aos funcionários do Instituto de Veterinária, que direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste projeto, em especial a Gilberto Flausino, pela sua cooperação e paciência, e ao amigo de fé Ataíde Baptista.

Ao Médico Veterinário e Presidente do Centro de Estudos Instituto Veterinário Municipal Jorge Waitsman, Dr. Cezar Couto Bermondo, aos Médicos Veterinários: Fernando Quilherme de Oliveira, Ilton Ramalho de Almeida e Simone Maia Fernandes pela colaboração cedida para a coleta de amostras.

Ao Médico Veterinário e Diretor da Policlínica Veterinária da Universidade Estácio de Sá, Dr. Carlos Xavier Fernandes e a toda sua equipe pelas amostras cedidas e pela dedicação.

A CNPq pelo apoio concedido a este trabalho através da bolsa de estudo.

A meu pai, Paulo Roberto Fernandes Pereira, por tudo que é e sempre será em minha vida! Muito Obrigada! E perdão por não ter dito: Eu te amo!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Processos Infecciosos em Animais de Companhia	3
2.1.1 Infecções de pele	3
2.1.2 Otite Externa Canina	3
2.1.3 Infecções do Trato Urinário	4
2.1.4 Infecções uterinas em cadelas	5
2.1.5 Infecções bacterianas do trato respiratório inferior	5
2.1.6 Infecções da Cavidade Oral	6
2.1.7 Infecções da Conjuntiva Ocular	6
2.2 A Importância de Animais de Companhia na Transmissão da Resistência Antimicrobiana	7
2.2.1 Resistência antimicrobiana X condutas terapêuticas	7
2.3. Azitromicina	9
2.3.1 Características químicas e farmacocinéticas	10
2.3.2 Características Microbiológicas	11
2.3.3 Desenvolvimento de Resistência	12
3 MATERIAL E METÓDOS	14
3.1 Coleta das Amostras	14
3.1.1 Quadros de otite	14
3.1.2 Quadros de infecção de pele	14
3.1.3 Quadros de infecção urinária	14
3.1.4 Quadros de infecção uterina em cadelas	14
3.1.5 Quadros de infecção respiratória	15
3.1.6 Quadros de infecção da cavidade oral	15
3.1.7 Quadros de infecção da conjuntiva ocular	15
3.2 Isolamento Primário e Identificação Presuntiva	15
3.2.1 <i>Staphylococcus spp.</i>	15
3.2.2 <i>Streptococcus spp.</i>	16
3.2.3 Enterobactérias	16
3.2.4 Bastonetes Gram-negativos não-fermentadores	16
3.2.5 Bactérias da cavidade oral	16
3.2.6 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos de eleição	17
3.2.6.1 Antimicrobianos	17
3.2.6.2 Técnica da difusão em disco	17

3.3 Avaliação <i>in vitro</i> do Perfil de Atividade da Azitromicina	17
3.3.1 Avaliação do perfil de suscetibilidade a azitromicina através da técnica de Difusão em Disco	17
3.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para azitromicina através da técnica de Microdiluição em Caldo	17
3.3.3. Determinação da CIM para azitromicina através da técnica de Diluição em Ágar	17
3.4 Avaliação Fenotípica da Resistência Cruzada em <i>Staphylococcus</i> spp. Resistentes à Oxacilina e Azitromicina	17
3.4.1 Difusão em Disco Modificada	17
3.4.2 Ágar Screen	18
3.4.3 Determinação da CIM para oxacilina através da Técnica da Microdiluição em Caldo	18
3.4.4 Determinação da CIM para oxacilina através da Técnica de Diluição em Ágar	18
3.5 Detecção do gene <i>mecA</i> pela Técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	18
3.5.1 Lise bacteriana	19
3.5.2 Amplificação do gene <i>mecA</i> pela técnica de PCR	19
3.6 Análise Estatística	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1 Identificação das Espécies	21
4.1.1 Identificação das amostras de otite externa canina	22
4.1.2 Identificação das amostras de infecções de pele	23
4.1.3 Identificação das amostras de infecções urinária	24
4.1.4 Identificação das amostras de infecções da cavidade oral	26
4.1.5 Identificação das amostras de infecções do trato respiratório inferior	27
4.1.6 Identificação das amostras de infecções da cavidade oral	28
4.1.7 Identificação das amostras de infecções da conjuntiva ocular	28
4.2 Perfil de Suscetibilidade dos Isolados aos Antibióticos de Eleição	29
4.2.1 Perfil de suscetibilidade dos isolados de otite externa canina	30
4.2.2 Perfil de suscetibilidade dos isolados de infecções do trato urinário	33
4.2.3 Perfil de suscetibilidade dos isolados de infecções da pele	35
4.3 Avaliação do Perfil de Suscetibilidade à Azitromicina	37
4.3.1 Ensaio de Difusão em Disco	37
4.3.2 Ensaio de Microdiluição em Caldo	38
4.3.3 Ensaio de Diluição em Ágar	39
4.3.4 Análise Comparativa dos Testes de Suscetibilidade	40
4.3.5 Determinação da CIM para azitromicina	41
4.4 Resistência cruzada à azitromicina em isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. oxacilina-resistentes	43
4.5 Avaliação fenotípica da resistência à Oxacilina e detecção do gene <i>mecA</i>	44

4.6 Avaliação da Resistência Cruzada à Azitromicina em Isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. oxacilina-resistentes	47
5 CONCLUSÃO	49
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 01.	Microrganismos obtidos a partir dos processos infecciosos provenientes de animais de companhia	21
Tabela 02.	Perfil de resistência dos isolados obtidos a partir de otite externa canina.	30
Tabela 03.	Perfil de resistência dos isolados obtidos de infecções da pele.	34
Tabela 04.	Perfil de resistência dos isolados obtidos a partir de infecções do trato urinário.	36
Tabela 05.	Perfil de suscetibilidade à oxacilina dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. <i>mecA</i> positivos.	47
Tabela 06.	Avaliação da resistência à azitromicina em isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. <i>mecA</i> positivos.	48

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01.	Estrutura molecular da azitromicina	11
Figura 02.	Perfil de suscetibilidade de um isolado de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> obtida a partir de amostra de otite externa.	22
Figura 03.	Teste de Difusão em Disco	38
Figura 04.	Teste de Microdiluição em Caldo	39
Figura 05.	Teste de diluição Ágar	40
Figura 06.	Testes fenotípicos para a detecção de resistência à oxacilina	45
Figura 07.	Eletroforese do fragmento do gene <i>mecA</i> de cepas de <i>Staphylococcus</i> spp. isoladas de animais de companhia, em gel de agarose a 1,5%	45

INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 01.	Identificação dos isolados de otite externa canina	23
Gráfico 02.	Identificação dos isolados de pioderma	24
Gráfico 03.	Identificação dos isolados do trato urinário	26
Gráfico 04.	Identificação dos isolados de infecções uterinas	27
Gráfico 05.	Identificação dos isolados do trato respiratório	28
Gráfico 06.	Identificação dos isolados da cavidade oral	28
Gráfico 07.	Percentuais de resistência em <i>Staphylococcus</i> spp. frente aos antimicrobianos testados	29
Gráfico 08.	Percentuais de resistência dos isolados de <i>Micrococcus</i> spp. frente aos antimicrobianos testados	31
Gráfico 09.	Percentuais de resistência dos Bastonetes Gram-negativos frente aos antimicrobianos testados	32
Gráfico 10.	Percentuais de resistência dos isolados provenientes de infecções do trato urinário frente aos antimicrobianos testados	33
Gráfico 11.	Percentuais de resistência dos isolados provenientes de infecções da pele	35

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 01.	Testes de identificação das espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. coagulase-positivos segundo Koneman et al. (2001).	62
Anexo 02.	Testes de identificação das espécies de <i>Staphylococcus</i> spp coagulase-negativos, segundo Koneman e colaboradores (2001).	53
Anexo 03.	Antimicrobianos avaliados nos diferentes sítios infecciosos.	64
Anexo 04.	Zonas de inibição avaliadas pelo diâmetro (mm) dos antibióticos utilizados.	65
Anexo 05.	Análises Estatísticas	66
Anexo 06.	Tabela das Amostras	70

ÍNDICE DE ABREVIACÕES

ECN: estafilococos coagulase-negativo
ECP: estafilococos coagulase-positivo
UTI: Infecção do trato urinário
EAS: Elementos Anormais e Sedimentoscopia
MH: Müeller Hinton
VRE: *Enterococcus* spp. vancomicina-resistentes
PMN: Polimorfonucleares
APGF: Teste de Voges-Proskauer
C.BHI: Caldo Infuso de Cérebro e Coração
AS: Àgar sangue
MVF: Manitol Vermelho de Fenol
MC: Àgar Mac Conkey
EMB: Àgar Eosina Azul de Metileno
TSI: Àgar três açúcares e ferro (Triple Sugar Iron)
MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina
MARSA: *Staphylococcus aureus* resistente à maioria dos antibióticos
CLSI: Clinical and Laboratorial Standard Institute
PCR: Reação em Cadeia de Polimerase
PFGE: Eletroforese em gel de Campo Pulsado
mecA: gene de resistência à oxacilina
MIC/CIM: Concentração Inibitória Mínima
Pb: Pares de base
PBP: Proteína ligante de penicilina
SDS: Sodium Dodecyl Sulphate
PCR: Polimerase Chain Reaction (Reação em Cadeia de Polimerase)
AMP: Ampicilina
ASB: Ampicilina+sulbactam
GEN: Gentamicina
PEN: Penicilina G
OXA: Oxacilina
VAN: Vancomicina
AZI: Azitromicina
CFL: Cefalotina
CTX: Cefotaxima
CIP: Ciprofloxacina
CLI: Clindamicina
CLO: Cloranfenicol
ERI: Eritromicina
NIT: Nitrofurantoína
NOR: Norfloxacina
ENO: Enrofloxacina
CEF: Ceftriaxona
MET: Metronidazol
CFX: Cefalexina
AMC: amoxicilina+ácido clavulânico

ES: Universidade Estácio de Sá

JW: Instituto Veterinário Municipal Jorge Waitsmam

SRD: cães sem raça definida

PCB: felinos pêlo curto brasileiro

CAN: espécie canina

FEL: espécie felina

RESUMO

PEREIRA, Ingrid Annes. **Avaliação do perfil de atividade da azitromicina frente a isolados bacterianos provenientes de processos infecciosos em animais de companhia.** Seropédica: UFRRJ, 2007. 87p (Dissertação de mestrado em Ciências Veterinárias).

A resistência antimicrobiana é um problema complexo, que envolve inúmeras espécies bacterianas e diferentes mecanismos, podendo ter sua transmissão facilitada pelo estreito convívio entre animais de companhia e seus proprietários. A prática de prescrever antibioticoterapia sem prévia identificação do agente etiológico e do seu perfil de suscetibilidade associada ao amplo uso de antimicrobianos aplicados à medicina humana representam potenciais fatores para a disseminação de cepas resistentes em reservatórios animais. A azitromicina, já amplamente utilizada no tratamento de infecções em humanos, apresenta atividade bacteriostática contra uma gama de agentes infecciosos e está disponível atualmente para a clínica veterinária brasileira como alternativa de tratamento em processos infecciosos dos sistemas genito-urinário, respiratório, oral e pele. Dessa forma, o presente estudo avaliou o espectro de atividade da azitromicina, em diversos processos infecciosos bacterianos de animais de companhia, estabelecendo o patógeno prevalente, seu perfil de suscetibilidade aos fármacos de eleição, além de determinar a CIM da azitromicina e avaliar a possível resistência cruzada em *Staphylococcus* spp. oxacilina e azitromicina-resistentes, de forma a obter dados significativos para a construção do quadro real de resistência à azitromicina em nossa região, para que seu uso represente uma alternativa terapêutica confiável em Medicina Veterinária. As amostras estudadas foram coletadas de diferentes processos infecciosos de cães e gatos, tais como, otites externas, piodermas, infecções do trato genito-urinário, respiratório, cavidade oral e da mucosa conjuntival. Os agentes bacterianos mais prevalentes foram *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos, seguidos pelas enterobactérias, *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos e *Pseudomas* spp. De modo geral, os isolados foram mais sensíveis a ampicilina+sulbactam, gentamicina, fluoroquinolonas e algumas cefalosporinas. A azitromicina apresentou percentuais de resistência significativos, com exceção dos isolados de infecções do trato urinário. Diferentes testes foram utilizados para avaliação do perfil de atividade da azitromicina dentre estes, a Difusão em Disco e a Microdiluição em Caldo, detectaram resistência em 48,6% e 55% dos isolados de *Staphylococcus* spp., respectivamente e 55,3% e 72,7% dos bastonetes Gram-negativos. A CIM₅₀ para *S. aureus* foi 4,0 µg/mL, para *S. intermedius* 1,0 µg/mL, *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos ≥512 µg/mL e bastonetes Gram-negativos 256 µg/mL. Em nove isolados (15%) de *Staphylococcus* spp. resistentes à oxacilina e *mecA* positivos foi possível também detectar resistência à azitromicina. Logo, a investigação laboratorial de doenças bacterianas é necessária para identificar o agente etiológico e determinar a suscetibilidade aos antimicrobianos a fim de selecionar o fármaco ideal e limitar o desenvolvimento de resistência, uma vez que bactérias resistentes podem ser transmitidas entre animais e desses para o homem, como já observado em isolados de *Staphylococcus* spp. resistentes à oxacilina. O desenvolvimento de resistência a azitromicina aponta para a necessidade de estudos que forneçam dados confiáveis a respeito do perfil de atividade desse fármaco de forma a contribuir na terapêutica veterinária sem causar impacto no desenvolvimento e disseminação de cepas resistentes.

Palavras-chave: Resistência bacteriana, azitromicina, animais de companhia.

ABSTRACT

PEREIRA, Ingrid Annes. **Bacterial susceptibility pattern assessment of azithromycin in different sites of infection in pet animals**. Seropédica: UFRRJ, 2007. 87p (Dissertation in Master Science in Veterinary Science).

Antimicrobial resistance is a complex question that concerns a variety of bacterial species and resistance mechanisms, which in part can be transmitted from pet animals to the owners by their strict contact. The prescription of antimicrobial agents in the veterinary practices, without previous identification of the etiologic agent and its antimicrobial susceptibility pattern associated with the large use of antimicrobials applied in human medicine represent a potential source for the spread of resistant strains in animal reservoir. Azithromycin widely used in human medicine, presents bacteriostatic activity against several infectious agents, and recently it was released in Brazilian veterinary practices as an alternative for the treatment of urinary, respiratory, oral and skin infections. This work evaluated the activity pattern of azithromycin to different bacterial infections from pet animals, by the identification of the etiologic agent and its antimicrobial susceptibility pattern, and also determinate MIC values and evaluate cross-resistance to oxacilin and azithromycin in *Staphylococcus* spp., as a proposal to construct the real frame of azithromycin resistance in our region so as its use represent a reliable alternative in veterinary medicine. The samples were collected from different sites of infection in dogs and cats, like otitis externa, pyoderma, infections from the urinary, reproductive and respiratory tract, oral and conjuntival mucosas. The most prevalent bacterial agents were coagulase-positive *Staphylococcus* spp., followed by Entorabacteiaceae, coagulase-negative *Staphylococcus* spp., and *Pseudomonas* spp.. The isolates were most sensible to ampicilin+sulbactam, gentamicin, fluoroquinolones and some cephalosporins. The bacterial isolates showed an expressive azithromycin resistance, with exception of the isolates from urinary tract infection. Different tests were used to access the activity pattern of azithromycin, such as Disc Diffusion and Broth Microdilution that detected 48,6% and 55% of resistant *Staphylococcus* spp., and 55,3% e 72,7% of resistant Gram-negative rods. *Staphylococcus aureus* MIC₅₀ were 4,0 µg/mL, *S. intermedius* 1,0 µg/mL, coagulase-negative *Staphylococcus* ≥512 µg/mL and Gram-negative rods were 256 µg/mL. In nine (15%) isolates of oxacilin-resistant and *mecA*-positive *Staphylococcus* spp. were also possible detect azithromycin resistance. For this reasons, the laboratories investigations are necessary for the identification of the etiologic agents of bacterial infections and to determine its susceptibility to antimicrobials, for the best choice of treatment, and to impair the emergence of resistant bacteria that can be transmitted between animals and human, like what happens in oxacilin-resistant *Staphylococcus* spp.. The emergence of azithromycin resistance leads to the necessity of reliable data on the concern of the activity pattern of this antimicrobial and its contribution for the veterinary medicine practices without producing impact in development and spread of resistant strains.

Key-words: Antimicrobial resistance, azithromycin, pet animals.

1 INTRODUÇÃO

A relação entre animais de companhia e seus proprietários mudou radicalmente nos últimos anos e cada vez mais atenção tem sido devotada ao bem estar desses animais. Esta relação promove benefícios psicológicos e sociais significativos, porém o estreito contato entre o homem e seus animais de estimação pode facilitar a transmissão de agentes microbianos e da resistência antimicrobiana sem percepção da implicação destes como transmissores de doenças zoonóticas que proporcionam riscos à saúde humana. Diversas cepas bacterianas resistentes podem ser adquiridas pela transmissão pessoa-pessoa, exposição ao meio ambiente, exposição direta aos animais e através da cadeia alimentar. A resistência antimicrobiana é um problema complexo que envolve inúmeras espécies bacterianas, mecanismos de resistência e de transferência, assim como diferentes reservatórios. Além disso, a facilidade das células bacterianas em disseminar informações genéticas permite o intercâmbio entre bactérias de mesma espécie ou espécies diferentes, bem como de hospedeiros diversos, contribuindo para o agravamento deste quadro, que já se constitui numa preocupação mundial.

Cães e gatos representam um importante potencial na disseminação da resistência antimicrobiana devido ao extensivo uso dos agentes antimicrobianos que também incluem preparações licenciadas para o tratamento eletivo da maioria dos quadros infecciosos humanos. Além do aumento do uso de antimicrobianos, outra tendência importante é a prescrição empírica de antimicrobianos na conduta terapêutica veterinária. Essa prática está associada à falta de diagnóstico microbiológico e testes de suscetibilidade, assim como pela prescrição de antimicrobianos de amplo-espectro como primeira alternativa de tratamento em detrimento aos fármacos de primeira linha. Associado aos problemas no diagnóstico, observa-se também dificuldades no estabelecimento de medidas de controle no que diz respeito ao uso indiscriminado de antibióticos, ampliando a gama de bactérias resistentes. As classes de antimicrobianos mais freqüentemente utilizadas na prática clínica veterinária de animais de companhia são penicilinas, cefalosporinas, macrolídeos, lincosamidas, tetraciclina, cloranfenicol, sulfonamidas, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. As causas mais freqüentes de tratamento antimicrobiano em cães e gatos são infecções de pele, otite externa, infecções respiratórias, do trato urinário e gastrointestinal. Os agentes mais comumente isolados nestes processos são bactérias dos gêneros *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. e bastonetes Gram-negativos. Casos difíceis são geralmente tratados por terapia contínua por períodos longos em torno de sete meses.

A azitromicina é amplamente utilizada no tratamento de infecções em humanos, está disponível atualmente para a clínica veterinária como alternativa de tratamento em processos infecciosos dos sistemas genito-urinário, respiratório, oral e pele. Esse fármaco pertence à classe dos macrolídeos, quimicamente classificada como azalídeo, pela inserção de um átomo de nitrogênio no anel lactônico. Tal reorganização estrutural confere a este fármaco características farmacocinéticas e microbiológicas diferenciais, podendo ser absorvida pela via oral e parenteral em dose única diária e em ciclos de tratamento curtos, favorecendo a terapêutica veterinária. Seu mecanismo de ação é bacteriostático e consiste na ligação à subunidade 50S do ribossomo, inibindo assim a síntese protéica. As características farmacocinéticas mais importantes incluem rápida e elevada difusão tissular e meia-vida biológica bastante prolongada, atingindo níveis até cem vezes maiores que os níveis séricos, podendo também se distribuir no interior de fagócitos e ser transportada diretamente para o sítio de infecção, onde é liberada em contato direto com o agente patogênico. Apresenta

atividade contra bactérias aeróbias e anaeróbias Gram-positivas, com exceção de enterococos, e contra Gram-negativos.

Alguns estudos relatam o desenvolvimento de resistência à azitromicina em cepas Gram-positivas resistentes à eritromicina e oxacilina, incluindo *Streptococcus faecalis* (enterococos) e à maioria das cepas de *Staphylococcus* spp. oxacilina-resistentes. Nas décadas mais recentes, a prevalência aumentada de *Staphylococcus* spp. resistente à oxacilina tem se tornado uma dificuldade adicional para o controle de infecções causadas por este agente. Os membros pertencentes ao gênero *Staphylococcus* spp. freqüentemente estão associados às infecções que acometem tanto humanos quanto animais. As cepas estafilocócicas variam muito no seu potencial de virulência e no aspecto epidemiológico, contribuindo para a rápida disseminação de agentes multidrogas resistentes, o que levanta questões sobre o futuro da terapia antimicrobiana.

A avaliação de novos fármacos deve ser do interesse da comunidade acadêmica para que o seu controle possa ser efetuado de modo eficiente. Portanto, torna-se importante avaliar o espectro de atividade da azitromicina, em diversos processos infecciosos bacterianos de animais de companhia, estabelecendo o patógeno prevalente nestes processos, o seu perfil de suscetibilidade à azitromicina e a outros fármacos. A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e avaliação fenotípica da possível resistência cruzada entre oxacilina e azitromicina em isolados de *Staphylococcus* spp. fornecem dados significativos para a construção do quadro real de resistência à azitromicina em nossa região, de forma que seu uso represente um ganho real como alternativa terapêutica em Medicina Veterinária.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Processos Infeciosos em Animais de Companhia

Os animais estão freqüentemente expostos a uma gama de bactérias presentes no ambiente que podem colonizar locais específicos como a pele, trato digestório, respiratório e urogenital. Estes agentes infecciosos, que em associação às condições imunológicas do hospedeiro e fatores extrínsecos, podem desenvolver doenças que apresentam resultados clínicos variáveis segundo a virulência e patogenicidade do agente.

A investigação laboratorial de doenças bacterianas é necessária para identificar o agente etiológico e determinar a suscetibilidade aos antimicrobianos a fim de selecionar o fármaco ideal. As dificuldades para o estabelecimento do diagnóstico correto de um processo infeccioso e a utilização inadequada de antibióticos contribuem para o surgimento de cepas resistentes.

A busca por alternativas terapêuticas que minimizem o impacto da resistência aos antimicrobianos, passa pela compreensão dos processos infecciosos nos principais sítios de ocorrência em animais de companhia, bem como pelo conhecimento dos agentes etiológicos prevalentes.

2.1.1 Otite externa canina

A otite externa é considerada a causa mais comum de doença do conduto auditivo de cães, representando de 8 a 15% dos casos atendidos na prática clínica veterinária no Brasil (LEITE, 2000) e 76,7% das otopatias corresponde a forma crônica da doença (FARIAS, 2002). As alterações patológicas são caracterizadas por inflamação aguda ou crônica do epitélio do meato auditivo externo, eritema, aumento das secreções e descamações do epitélio, associado à diferentes graus de dor e prurido.

A otite externa é multifatoria e fatores como ectoparasitoses, doenças alérgicas, problemas dermatológicos e desordens endócrinas são predisponentes ao estabelecimento do processo infeccioso. As infecções mistas ocorrem em aproximadamente 30% dos casos e os microrganismos mais freqüentemente isolados são *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius*, *Malassezia pachydermatis*, *Proteus* spp., *Klebsiella* spp. e *Pseudomonas* spp., entre outros (SILVA, 2001). Nas infecções crônicas, são relatados *Streptococcus* spp. β -hemolíticos, *Escherichia coli* e *Bacillus* spp. (BLANCO et al., 1996; KISS et al., 1997).

A seleção de medicamentos otológicos específicos tem como base o agente etiológico, o estado do tímpano e a resposta orgânica ao processo nosológico. Os principais antimicrobianos recomendados para o tratamento dessa doença incluem aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, β -lactâmicos, cloranfenicol, polimixina B e tetraciclina (OLIVEIRA et al., 2005).

2.1.2 Infecções de pele

Dentre as doenças que comumente acometem os pequenos animais as infecções de pele representam um percentual significativo do atendimento clínico veterinário e em muitos casos são causadas por microrganismos naturalmente presentes na pele. A microbiota normal da pele de animais é constituída por bactérias residentes, transitórias e fungos. Em cães, as bactérias residentes mais isoladas são: *Micrococcus* spp., *Staphylococcus intermedius*, *S.*

epidermidis, *Streptococcus* α -hemolítico e *Propionibacterium acnes*. Os microrganismos transitórios do cão incluem *Corynebacterium* spp., *E. coli*, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. e *Proteus mirabilis*, enquanto que na espécie felina as espécies prevalentes são: *Streptococcus* β -hemolíticos, *E. coli*, *P. mirabilis*, *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Staphylococcus* spp. coagulase positivos e negativos (SCOTT et al., 2001).

As dermatopatias bacterianas podem ser classificadas segundo a profundidade em: piodermites externas, quando a colonização ocorre somente na superfície epidérmica, em superficiais as quais, envolvem a epiderme e epitélio folicular, e em piodermites profundas quando ocorre invasão bacteriana da derme e tecido subcutâneo (GRIFFIN et al., 1993).

A patogênese das infecções bacterianas da pele requer aderência e conseqüente colonização. O patógeno de maior importância é o *S. intermedius*, uma vez que por ser da microbiota residente da pele, apresenta maior facilidade de multiplicação quando ocorre perda da continuidade dos tecidos, ou pelo desequilíbrio da microbiota normal provocado por outras bactérias ou fungos. Pellerin et al. (1998) afirmaram que *S. intermedius* cria um microclima favorável à proliferação de agentes bacterianos secundários Gram-negativos, além de propiciar o crescimento de leveduras do gênero *Malassezia*. Sendo assim, qualquer dermatopatia primária pode proporcionar uma alteração na microbiota bacteriana e possibilitar a proliferação do *S. intermedius*.

Na prática clínica, a escolha do antibiótico é freqüentemente empírica, sendo eleitos antibióticos de amplo espectro sem prévia identificação do agente envolvido. Muitas vezes, o profissional recorre à citologia como auxílio diagnóstico, e *S. intermedius* é implicado como agente quando ocorre a evidência de cocos Gram-positivos. Cultura e testes de sensibilidade devem sempre ser realizados para obtenção de um diagnóstico conclusivo e para detecção de casos de infecções mistas, evitando a ineficácia do tratamento e casos de doença recidivante (SCOTT et al., 2001).

Aspectos como segurança, via de administração, freqüência da dose, habilidade de penetração nos tecidos, capacidade de atingir altas concentrações e efeitos colaterais, devem ser considerados devido à extensão do tratamento. A maioria dos casos deve ser tratada por um prazo mínimo de três a seis semanas, podendo necessitar de até 12 semanas (GRIFFIN et al., 1993, SCOTT et al., 2001).

2.1.3 Infecções do trato urinário

Infecções do Trato Urinário (UTI) em cães são geralmente associadas à vesícula urinária, podendo em alguns casos, envolver os rins. Correspondem a uma estimativa de 10% dos pacientes caninos dos atendimentos clínicos veterinários e, alguns estudos concluíram que as fêmeas e idosos são potenciais grupos de risco para essa doença. O diagnóstico dessa enfermidade é baseado nos achados clínicos e urinálise, porém a cultura da urina é requerida para o diagnóstico definitivo da UTI (ÇETIN et al., 2003). Diversos microrganismos estão associados à etiologia dessa doença em cães e as principais bactérias envolvidas são: *E. coli*, *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.. Infecções causadas por uma única espécie bacteriana são mais prevalentes que infecções mistas (KOGIKA et al., 1995).

Em contraste do que ocorre em cães, os resultados de diferentes ensaios clínicos e laboratoriais indicam que os felinos são mais resistentes às infecções bacterianas das vias urinárias. A baixa freqüência da infecção urinária bacteriana em gatos pode estar relacionada a mecanismos locais de defesa, como a capacidade dos felinos de produzir uma urina

altamente concentrada e ao consumo de dietas ricas em proteínas, que proporciona a formação de urina naturalmente ácida e altamente concentrada em uréia (OSBORNE et al., 1989). As bactérias mais comumente isoladas na urina de felinos com cistite são: *E. coli*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Proteus* spp., *Klebsiella* spp. e *Pseudomonas* spp. (RECHER JUNIOR, 2005).

Os principais antibióticos utilizados no tratamento dessa infecção são: amoxicilina associada a ácido clavulânico, ampicilina associada à sulbactam, gentamicina, enrofloxacina, orbifloxacina, nitrofurantoína, oxitetraciclina, cefalotina, danofloxacina e sulfametoxazol-trimetoprim (ÇETIN et al., 2003, RECHER JUNIOR, 2005).

2.1.4 Infecções uterinas em cadelas

Em cadelas, a piometra resulta da infecção do endométrio que sofreu hiperplasia cística causada por uma prolongada estimulação progesterônica. Esse processo patológico também denominado de Complexo Hiperplasia-Cística-Endometrial apresenta alta incidência em cadelas e é reconhecida como uma das causas mais comuns de enfermidade e morte desta espécie animal. Pode ser complicada por infecções bacterianas, devido à capacidade da microbiota vaginal de ascender até o útero durante o estro e causar infecções oportunistas. As infecções bacterianas não são a causa desencadeante da piometra canina, mas são responsáveis pela maioria dos casos de morbidade e mortalidade associados a essa doença (ETTINGER, 1997; FRANSSON; RAGLE, 2003).

Dentre as espécies bacterianas, *Escherichia coli* é o agente etiológico freqüentemente relatado devido sua habilidade de aderência a sítios antigênicos específicos no endométrio e miométrio quando estimulados por progesterona (COGGAN et al., 2004). *Streptococcus* spp. hemolíticos, *Staphylococcus* spp. coagulase negativos e positivos, *Klebsiella* spp., *Pasteurella* spp., *Pseudomonas* spp., *Proteus* spp., *Moraxella* spp. fazem parte da microbiota uterina de animais saudáveis, mas também apresentam potencial patogênico reconhecido, podendo estar presentes em infecções mono ou polimicrobianas (ETTINGER, 1997; JOHNSTON, et al., 2001; FRANSSON; RAGLE, 2003).

Em muitos casos o tratamento é baseado na intervenção cirúrgica (panhisterectomia) como forma de prevenção da doença recidivante. Porém alternativas como a prescrição de hormônios, principalmente prostaglandina e antimicrobianos de amplo-espectro por tempo prolongado também são recomendados (FRANSSON; RAGLE, 2003).

2.1.5 Infecções bacterianas do trato respiratório inferior

A pneumonia bacteriana é resultado de uma combinação de diversos fatores como alterações e falhas nos mecanismos de defesa do trato respiratório baixo tais como, broncoconstricção, movimentos ciliares, produção de muco, fagocitose por macrófagos e doenças imunossupressoras que podem predispor às injúrias causadas pela exposição natural a bactérias potencialmente patogênicas.

As infecções do trato respiratório inferior são comumente causadas pela aspiração de bactérias oportunistas provenientes da orofaringe ou pela invasão de bactérias presentes no ambiente. Espécies de *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pasteurella*, *Klebsiella* e *E. coli* são as mais encontradas, sendo a *Bordetella bronchiseptica* o patógeno primário seguidos dos gêneros *Mycoplasma*, *Chlamydia* e alguns fungos (HIRSH; ZEE, 2003).

As principais alternativas de tratamento para infecções do trato respiratório de cães e gatos são: amoxicilina mais ácido clavulânico, cefotaxima, cefalexina sulfonamidas mais

trimetropim, cloranfenicol, fluoroquinolonas, tetraciclina, macrolídeos e lincosamidas (GUARDABASSI et al., 2004).

2.1.6 Infecções da cavidade oral

A doença periodontal é uma das causas mais comuns de doença da cavidade oral de cães e pode afetar tanto a saúde quanto à qualidade de vida do animal. As lesões periodontais são caracterizadas por uma condição inflamatória progressiva que acomete o tecido de suporte do dente, tecido gengival, cemento, ligamento periodontal e o osso alveolar (GIOSO, 1993; HARVEY; EMILY, 1993). A doença periodontal tem como principais causas a presença da placa bacteriana na região do sulco gengival onde os microrganismos presentes podem liberar substâncias que lesam a sua integridade, constituindo um fator extrínseco relacionado às etiologias da inflamação gengival e doença periodontal (MCPHEE; COWLEY, 1981).

Inicialmente bactérias Gram-positivas aeróbicas, tais como, *Actinomyces* e *Streptococcus* ssp. liberam substâncias aderentes que formam a placa. Em poucos dias, o acúmulo de restos alimentares e de mais bactérias, reduz a concentração de oxigênio, favorecendo a proliferação de anaeróbios na região subgengival. As endotoxinas liberadas por estes causam destruição do tecido e perdas ósseas. As principais bactérias anaeróbicas envolvidas na periodontite de cães são Bacteróides produtores de pigmento negro (DOMINGUES et al., 1999).

O tratamento dessa doença é realizado através de retirada cirúrgica do cálculo dentário e antibioticoterapia no pré e pós-cirúrgico com penicilina G, amoxicilina, amoxicilina associada ao ácido clavulânico, espiramicina, clindamicina ou metronidazol (WATSON; ROSIN, 2000).

2.1.7 Infecções da conjuntiva ocular

A conjuntiva é a membrana mais exposta do organismo e mantém relação direta com o meio externo (SLATER, 1990). A população microbiana normal da superfície ocular interfere na invasão de microrganismos por privá-los de nutrientes, além de secretar substâncias com propriedades antimicrobianas (ANDRADE et al., 2002). A destruição da microbiota ocular normal por uso prolongado de antimicrobianos tópicos pode resultar em crescimento excessivos de bactérias, leveduras ou fungos que podem tornar-se patogênicos. Estes agentes originam-se principalmente da pele e trato respiratório superior e são relativamente constantes, não variando com as mudanças no conteúdo microbiano da atmosfera que os cercam (GASKIN et al., 1980). Andrade et al. (2002) investigaram a microbiota conjuntival de gatos saudáveis na cidade de Araçatuba (São Paulo) e as bactérias de maior ocorrência foram *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* β -hemolíticos e o fungo *Penicillium* sp..

Assim como outras espécies, os cães estão vulneráveis a injúrias externas e dependendo do grau e intensidade do trauma, podem ocorrer processos inflamatórios superficiais corneanos e conjuntivais, bem como lesões graves nas estruturas da túnica vascular e nervosa do globo ocular (WHITLEY; MOORE, 1984). Com a perda de continuidade do epitélio, bactérias ou fungos podem se instalar de forma oportunista, colonizando e infectando o estroma corneano (MOORE, et al., 1989). Segundo Slater (1990) a conjuntivite bacteriana primária em cães está comumente associada à *Moraxella* spp. e a outros microrganismos freqüentemente isolados a partir de cães com mucosa normal, tais como, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Streptococcus* spp.. Normalmente a conjuntivite é uma

condição associada a um espectro de alterações patológicas que podem incluir otite externa, hipotireoidismo, seborréia generalizada e pioderma. Casos de trauma e infecções crônicas podem acometer diversas estruturas da úvea. O mesmo autor relata que os microrganismos exógenos que comumente causam uveítes são: *E. coli*, *Streptococcus* spp., *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus tuberculosis* e *Brucella canis*. A conduta terapêutica inclui corticoterapia local e sistêmica, uso local de sulfato de atropina, anti-inflamatórios e antibioticoterapia. Os principais antimicrobianos prescritos para o tratamento de infecções causadas por cocos Gram-positivos são neomicina, bacitracina, penicilina, eritromicina, gentamicina, enrofloxacinina e cefalosporinas. No caso de infecções causadas por bastonetes Gram-negativos são utilizados a polimixina B, gentamicina, tobramicina, cloranfenicol, tetraciclina e cefalosporinas (SLATER, 1990).

2.2 A importância de Animais de Companhia na Transmissão da Resistência Antimicrobiana

O convívio com animais de companhia, como cães e gatos, tem sido associado a benefícios físicos e emocionais, especialmente para crianças, idosos, indivíduos socialmente isolados e deficientes físicos e mentais. A domesticação dos primeiros cães e gatos apresenta relatos pré-históricos (SERPELL, 1995; HOFMANN, 1997), desde então, esses animais distribuíram-se em todos os continentes e atualmente a população mundial de cães é estimada em torno de 500 milhões (WANDELLER et al., 1993). A ligação entre humanos e animais tem sido reconhecida por muitos anos e cada vez mais atenção é devotada ao bem-estar dos animais de estimação. Antigamente esses animais ficavam limitados ao lado de fora da casa de seus proprietários, hoje são criados dentro das moradias, incluindo lugares particulares como quartos e banheiros, em contato íntimo com o homem. Ainda que esta relação promova benefícios significativos, diversos estudos apontam para o fato de que esses animais estão envolvidos na disseminação da resistência antimicrobiana da mesma forma que atuam como transmissores de doenças zoonóticas proporcionando riscos à saúde humana especialmente de pessoas imunocomprometidas (SNARY et al., 2004).

A relação entre homem e animais de companhia, que dividem o mesmo nicho, tem motivado diversos pesquisadores a investigarem a extensão dessa associação e determinar a importância dos animais de companhia como reservatórios potenciais de bactérias resistentes a diversos antimicrobianos (KATCHER; FRIEDMAN, 1980). Alguns estudos indicam a possível associação entre o uso de antimicrobiano, a emergência da resistência em animais e a possível transmissão dessa resistência para humanos. Bactérias resistentes podem ser adquiridas por humanos pela transmissão pessoa-pessoa, exposição ao meio ambiente, exposição direta aos animais e via alimentos. Animais domésticos podem atuar como reservatórios de espécies bacterianas e/ou genes de resistência, tais como, *Staphylococcus aureus* metilicilina-resistente (MRSA), *Enterococcus* spp. vancomicina-resistentes (VRE) e *Salmonella Typhimurium* DT104 (GUARDABASSI et al., 2004).

2.2.1 Resistência antimicrobiana x Condutas terapêuticas

As bactérias possuem a habilidade de se adaptar a novos meios que oferecem condições adversas devido em grande parte, à aquisição de novos genes através da transferência horizontal. De fato, a transmissão desses genes pode envolver tanto espécies patogênicas quanto a microbiota original dos seus hospedeiros. A localização dos genes de

resistência em plasmídeos ou em outros elementos móveis permite que ocorra a disseminação na população de bactérias (GUARDABASSI et al., 2004). Uma pequena quantidade de células bacterianas é suficiente para que a resistência antimicrobiana seja transmitida de um hospedeiro para outro. Teoricamente, uma única célula bacteriana pode transmitir genes de resistência para a microbiota do hospedeiro. Além disso, a facilidade das células bacterianas em disseminar informações genéticas, permite intercâmbio das bactérias da mesma espécie ou espécies diferentes, bem como de hospedeiros diversos (AARESTRUP, 2001). A transferência dessas informações conduz para a rápida disseminação de agentes multidrogas resistentes, e levanta questões sobre o futuro da terapia antimicrobiana (MARTINEAU et al., 2000).

Quadros infecciosos provocados por *S. aureus* multirresistentes são hoje comuns nos grandes hospitais de todo o mundo, limitando as opções terapêuticas (LEVY, 1997). Alguns autores denominam essas cepas de estafilococos como ORSA (“*Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina”), para designar resistência à oxacilina e aminoglicosídeos ou resistência a múltiplos antimicrobianos (MARSA). Tais estirpes estão envolvidas na resistência aos antimicrobianos, como tetraciclina, ácido fusídico, eritromicina, sulfonamidas e lincomicina. O mecanismo envolvido com a resistência à oxacilina é definido pela expressão do gene *mecA* que codifica uma nova proteína-alvo para a penicilina a qual foi denominada de PBP2a ou PBP2’. Essa proteína apresenta baixa afinidade para os antibióticos β -lactâmicos e, portanto, no mutante oxacilina-resistente não ocorrerá inibição da síntese da parede bacteriana, na presença desse fármaco, uma vez que a PBP2a parece funcionar como uma PBP substituta (DE JONGE et al., 1993). O gene *mecA* está presente em um DNA cromossomal adicional, de aproximadamente 30 a 50 kb, constituído por um elemento genético móvel designado como cassete cromossômico estafilocócico (*SCCmec*) que está integrado ao cromossomo das cepas resistentes (ITO et al., 1999; KATAYAMA et al., 2001; ITO et al., 2001; KURODA et al., 2001). A transferência horizontal deste gene em clones de *Staphylococcus* spp. resultou na disseminação mundial de clones oxacilina-resistentes (WIELDERS et al., 2002).

O risco de transmissão de MRSA entre pacientes, membros da mesma família e seus animais domésticos, os quais convivem em um mesmo ambiente, vem sendo recentemente alvo de muitas pesquisas mundiais (SIMOONS-SMIT et al., 1998). Entretanto, é necessário ressaltar que animais de companhia são considerados fontes de infecção de ORSA após sua exposição a humanos infectados (GUARDABASSI et al., 2004). Cepas de ORSA podem ser carregadas dos animais para os seus proprietários, principalmente se houver um aumento da suscetibilidade desses hospedeiros humanos à infecção. Manian et al. (2003) investigaram um caso de infecção recorrente provocado por ORSA em uma paciente diabética e a possível associação à infecção assintomática de seu cão de estimação. O resultado obtido a partir da cultura da amostra de secreção nasal canina detectou ORSA mupirocina-resistente e análises de eletroforese por campo pulsado (PFGE) apresentaram um padrão cromossomal idêntico nos isolados de ORSA humano e animal, comprovando a transmissão desse agente.

A resistência a oxacilina também é reconhecida em outras espécies de *Staphylococcus*, tais como, *S. intermedius*, *S. schleiferi* e espécies de *Staphylococcus* coagulase-negativos. Lilenbaum et al. (1998) em um estudo realizado no Brasil descreveram a ocorrência de resistência a oxacilina em isolados de *S. intermedius* e *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos obtidos a partir de gatos saudáveis. Da mesma forma, Frank et al. (2003) realizaram um estudo no Reino Unido, e detectaram resistência

à oxacilina em *S. schleiferi* isolados a partir de 11 cães com pioderma recorrente. Murakami et al. (1991) detectaram o gene *mecA* em *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. sciuri*, *S. saprophyticus* e *S. caprae*.

A quantidade e padrão de uso de antimicrobianos têm determinado o desenvolvimento da resistência e sua disseminação na população bacteriana isolada a partir de animais. Odensvik et al. (2001) relataram que o total de venda de formulações antimicrobianas de uso veterinário na Suécia e Noruega aumentou de 3%, em 1990, para 8% e 7% respectivamente, em 1998. O uso indiscriminado de antibióticos na clínica veterinária, sem execução de testes de sensibilidade que possibilitem a utilização do fármaco ideal, entre outros fatores, contribui para o aumento do espectro de microrganismos com habilidade de suplantar os mecanismos de ação de agentes antimicrobianos. Essa prática também está associada à prescrição de antimicrobianos de amplo-espectro como primeira alternativa de tratamento em detrimento de fármacos de primeira linha, como penicilinas e sulfonamidas. O diagnóstico terapêutico é amplamente exercido como conduta clínica veterinária e colabora com o aumento do uso de antimicrobianos de amplo-espectro favorecendo casos de resistência. Além disso, as companhias farmacêuticas podem ter certa contribuição para esse quadro devido a grande pressão de mercado que exercem nos veterinários para a prescrição de novos antimicrobianos para o tratamento de casos onde fármacos antigos são ainda efetivos. Entretanto possíveis falhas no tratamento dos antimicrobianos de primeira linha desencorajam os proprietários de animais de companhia a pagar por consultas veterinárias e antibióticos adicionais (PRESCOTT et al., 2002).

O Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005) tem direcionado pesquisadores a avaliar o perfil de resistência a novos antimicrobianos assim como os possíveis mecanismos de resistência cruzada em isolados humanos e animais, considerando as peculiaridades demográficas. Diversos programas de vigilância têm sido desenvolvidos mundialmente para promover o controle da resistência antimicrobiana e detectar a emergência de novos mecanismos de resistência (KARLOWSKY et al., 2002). Frente a esta realidade, a avaliação de novos fármacos é de interesse da comunidade acadêmica, pois é possível perceber que a seleção natural promovida pelo uso indevido desses antimicrobianos desencadeia mecanismos de resistência pelas bactérias.

2.3 Azitromicina

Pesquisas farmacológicas têm sido alvo de um impulso contínuo no sentido da descoberta de novas moléculas antibióticas capazes de enfrentar eficazmente os múltiplos e complexos problemas ligados à antibioticoterapia. Um antibiótico que se destina à extensa utilização clínica deve ter um amplo espectro de ação e capacidade de transpor os mecanismos de resistência bacteriana. O emprego de moléculas dotadas de novas características farmacocinéticas e microbiológicas permitem a administração de dose diária única e ciclos de tratamento curtos, favorecendo a terapêutica veterinária (SHEPARD; FALKENR, 1990). Os macrolídeos representam a classe de antibióticos que mais se aproxima das exigências da antibioticoterapia moderna, porque podem ser administrados pela via oral e parenteral, não apresentam fenômenos alérgicos e são refratários à resistência mediada por enzimas inativadoras, como por exemplo, a beta-lactamase. Os antimicrobianos desta classe possuem mecanismo de ação bacteriostático que consiste na

inibição da síntese protéica bacteriana através da sua ligação à subunidade ribossômica 50S (NEU et al., 1991).

2.3.1 Características químicas e farmacocinéticas

Dentre os macrolídeos, a azitromicina ($C_{38}H_{72}N_2O_{12}$) é quimicamente classificada como azalídeo, devido à inserção de um átomo de nitrogênio no anel lactônico de sua molécula (Figura 01). Esta reorganização estrutural confere a este antibiótico, características farmacocinéticas e microbiológicas inovadoras, permitindo sua penetração através da parede das bactérias Gram-negativas ampliando seu espectro de ação. Sua atividade antimicrobiana é similar a eritromicina, porém com reduzido efeito colateral em nível gastrintestinal e maior resistência à hidrólise ácida gástrica (GIRARD et al., 1990).

A molécula de azitromicina apresenta rápida e elevada difusão tissular e meia-vida biológica prolongada nos tecidos. Dessa forma, pode concentrar-se no interior de fagócitos, que a transportam diretamente para o local da infecção e a liberam em contato direto com o agente patogênico responsável pelo processo infeccioso. A capacidade de difusão tissular justifica a prescrição desse antimicrobiano segundo um esquema de dosagem baseado na administração de dose diária única durante três dias consecutivos. Os fatores que determinam o tropismo e a persistência da azitromicina nos tecidos são: fraca ligação protéica; estrutura química dibásica e interação sinérgica com fagócitos (GIRARD et al., 1990). O baixo valor de ligação com proteínas plasmáticas, que geralmente não ultrapassa 50%, proporciona uma maior fração livre do fármaco para interação com fagócitos. Além disso, possui dois grupos terciários amínicos básicos, que conferem a sua molécula uma característica anfipática, facilitando sua passagem através das membranas celulares (GIRARD et al., 1990).

A azitromicina concentra-se eletivamente nos macrófagos, fibroblastos e nos polimorfonucleares (PMN) atingindo concentrações intracelulares até cem vezes superiores às encontradas no nível extracelular, utilizando esses efetores imunológicos como vetores no processo de difusão para os locais intersticiais (SCHENTAG et al., 1991). Glaude et al. (1990) realizaram estudos experimentais em modelo murino e comprovaram a capacidade de difusão desse antibiótico nos macrófagos e PMN peritoniais e alveolares. A captação da azitromicina pelas células fagocíticas ocorre de forma rápida e pode estender-se por mais de 24 horas após a administração inicial desse fármaco. Essa característica farmacocinética explica o seu perfil de atividade contra microrganismos patogênicos intracelulares, podendo permanecer ativa dentro dos fagócitos e, além disso, constituir uma importante reserva de antibiótico diretamente disponível no local da infecção, distribuindo-se prontamente em diversos sítios orgânicos, como trato respiratório, urogenital, oral e pele. A liberação da azitromicina pelos fagócitos pode ser aumentada pela presença eventual de bactérias ou de componentes da parede celular bacteriana (RETSEMA et al., 1991).

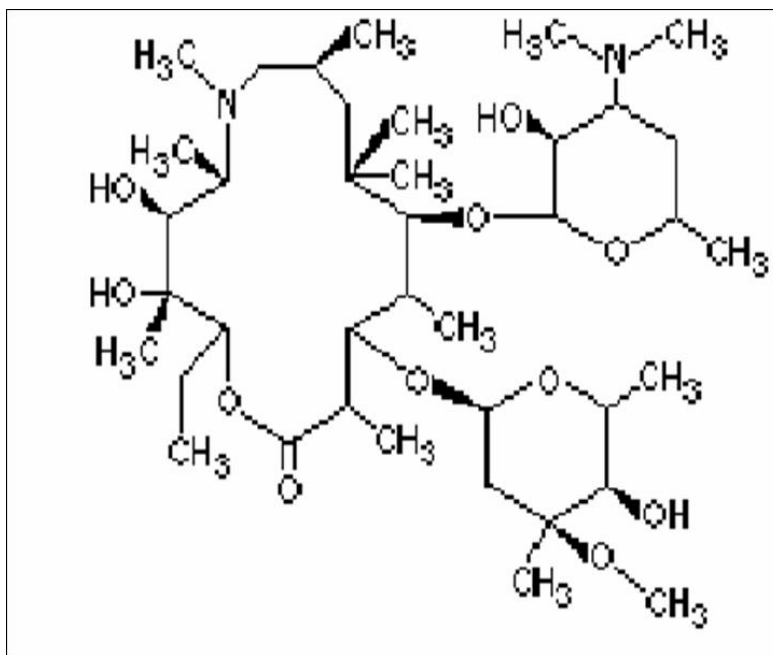


FIGURA 01. Estrutura molecular da azitromicina.

2.3.2 Características microbiológicas

A azitromicina possui um amplo espectro de ação apresentando atividade contra bactérias Gram-positivas e uma vasta gama de bactérias Gram-negativas. Dentre as bactérias Gram-positivas pode-se destacar sua ação contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* (estreptococos β -hemolíticos do grupo A), *Streptococcus pneumoniae*, estreptococos α -hemolíticos (grupo viridans), outros estreptococos e *Corynebacterium* spp. (MASKELL et al., 1990). Demonstra resistência cruzada contra cepas Gram-positivas resistentes à eritromicina, incluindo *Streptococcus faecalis* (enterococos) e à maioria das cepas de estafilococos oxacilina-resistentes (RETSEMA, 1999). Entre as bactérias Gram-negativas pertencentes à família Enterobacteriaceae, a azitromicina apresenta atividade variável contra *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Enterobacter* spp. e *Klebsiella* spp.. Espécies de *Proteus*, *Serratia*, *Morganella* e a *Pseudomonas aeruginosa* são frequentemente resistentes (RETSEMA et al., 1987). A azitromicina apresenta notável atividade *in vitro* em relação a microrganismos intracelulares, como *Chlamydia trachomatis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Ureaplasma* spp. e bactérias anaeróbias, como *Bacteroides fragilis* e *Bacteroides* spp., *Clostridium perfringens*, *Fusobacterium necrophorum* e *Propionibacterium acnes*. Possui ação superior aos demais macrolídeos no tratamento de infecções causadas por *Haemophilus* spp., *Moraxella catarrhalis*, *Acinetobacter* spp., *Yersinia* spp., *Shigella* spp., *Pasteurella* spp., *Vibrio cholerae* e *parahaemolyticus*, (SLANEY et al., 1990; EDELSTEIN: EDELSTEIN, 1991). Além disso, pode ser prescrita para tratamento de infecções provocadas por outros organismos, como *Borrelia burgdorferi*, *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Campylobacter* spp. e *Listeria monocytogenes*. Na clínica veterinária essa droga é prescrita para cães e gatos no tratamento de infecções respiratórias, otorrinolaringológicas, dermatológicas, urogenitais, digestivas e osteoarticulares. A dose recomendada é de 10 a 30 mg/Kg/PV/dia de 3 a 5 dias

dependendo do quadro clínico do animal, podendo também ser prescrita para o tratamento da toxoplasmose e erlichiose durante 7 dias consecutivos de administração.

2.3.3 Desenvolvimento de resistência

Não existem dados disponíveis na literatura, até o momento, sobre o desenvolvimento de resistência à azitromicina na clínica veterinária. No entanto, alguns estudos em populações humanas, mostram que mecanismos de resistência bacteriana podem ocorrer. Retsema (1999) afirmou em estudos de suscetibilidade e emergência da resistência em macrolídeos que as baixas e prolongadas concentrações séricas após a administração de azitromicina podem induzir ou selecionar organismos resistentes em uma população previamente sensível. O autor reportou que cepas de *Staphylococcus aureus* apresentaram aumento da CIM de três diluições após serem submetidas a nove exposições consecutivas de azitromicina.

A resistência a macrolídeos também tem sido amplamente reportada em *Streptococcus pyogenes* Grupo A (GAS) associadas a humanos e a sua incidência varia em diversos países. Essa espécie comumente acomete crianças levando a um quadro de faringite crônica. Um fato de extrema importância, é que a azitromicina é recomendada nos casos de pacientes com hipersensibilidade a β -lactâmicos ou nos casos de falha no tratamento por essa classe de antimicrobianos. Biggen et al. (2002) investigaram sete isolados de GAS de pacientes que apresentaram falhas no tratamento com azitromicina. Os autores demonstraram através de técnicas moleculares que o mecanismo genético desenvolvido por essa espécie estava associado à presença dos genes *erm* e *mef*. Esses genes podem integrar-se ao cromossomo plasmidial ou conjugar-se a outros elementos móveis como transposons. O mecanismo de resistência consiste em modificações no alvo ribossomal através de uma metilação codificada pelo gene *erm* e também através de alterações no mecanismo de efluxo específico para macrolídeos codificado pelo gene *mef(A)*. A microbiota da orofaringe submetida à pressão seletiva durante o tratamento prolongado com baixas doses de azitromicina se constitui em uma fonte potencial desses determinantes de resistência, podendo facilitar a circulação desses genes e a disseminação clonal de cepas resistentes (KATAJA et al., 1999; TAIT-KAMARADT et al., 2000).

O aumento da pressão seletiva na população bacteriana também induz alguns mecanismos de resistência cruzada, como os observados em *S. pneumoniae* penicilina-resistentes que também apresentaram resistência fenotípica aos macrolídeos, dentre eles, a azitromicina, eritromicina e claritromicina (YAMAGUCHI et al., 2005). A resistência cruzada à azitromicina, que ocorre de forma induzida ou constitutiva, também é observada em *S. aureus* e *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos eritromicina e oxacilina-resistentes (NEU et al., 1991) e em *Pseudomonas aeruginosa* produtora de biofilme (GILLIS et al., 2005). Um estudo realizado na Finlândia demonstrou que a incidência de resistência aos macrolídeos pôde ser reduzida através da limitação do uso da eritromicina. Entretanto, a crescente utilização de novos macrolídeos, como a azitromicina que é utilizada em dose diária única, dificulta a adoção desta medida (SEPPÄLA et al., 1997).

A introdução de princípios ativos na prática clínica veterinária, que também são alternativas de tratamento de infecções em humanos, deve ser acompanhada de estudos que confirmem dados confiáveis sobre sua atividade e monitorem sua eficácia sobre os processos infecciosos de diferentes órgãos e sistemas. O presente trabalho visou avaliar a eficácia da azitromicina em diferentes sítios de infecções bacterianas em animais de companhia, bem como a possível resistência cruzada entre este antibiótico e a oxacilina em

isolados de *Staphylococcus* spp., tendo em vista a escassez de dados a respeito dessas características em isolados obtidos a partir de animais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para alcançar o objetivo proposto, foram obtidos 151 espécimes provenientes de 128 cães e 23 gatos, através do acompanhamento da rotina de atendimento clínico do Departamento de Clínica Médica de Pequenos Animais da Universidade Estácio de Sá e de visitas periódicas ao Instituto Veterinário Municipal Jorge Waitsman. As amostras foram encaminhadas sob refrigeração ao Laboratório de Bacteriologia Veterinária situado no Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) para realização dos procedimentos de identificação bacteriológica e testes de suscetibilidade aos antibióticos de eleição (Anexo 02).

3.1 Coleta das Amostras

3.1.1 Quadros de otite

Foram obtidos 33 espécimes do conduto auditivo externo de cães otopatas com o auxílio de “swabs” estéreis. Durante o exame clínico, os animais foram submetidos a otoscopia para avaliação da mucosa auricular e de alterações patológicas como edema, hiperemia, secreção e pesquisa de parasitos. Também foi realizado exame citológico para observação das características do exsudato auricular tais como, celularidade, presença de bactérias, leveduras e parasitos.

3.1.2 Quadros de infecção de pele

Foram obtidos 33 espécimes de 25 cães e 8 gatos com lesões e secreções da pele com o auxílio de “swabs” estéreis. Durante a anamnese e exame clínico foram investigados sinais como característica da lesão (pustular, exsudativa, purulenta, hemorrágica, crostosa, miíases e outras), localização e distribuição das lesões, áreas de alopecia, presença de prurido, além de exames citológicos para detecção de parasitos, bactérias e leveduras e observação de alterações do pêlo.

3.1.3 Quadros de infecção urinária

Foram obtidos 34 espécimes de cães e 15 de gatos clinicamente suspeitos de infecção urinária. Durante a anamnese e exame clínico foram investigados sinais como poliúria, hematúria, anúria, obstrução uretral (principalmente em felinos), dor durante a micção e outros, além das informações a respeito da conduta terapêutica e antibioticoterapia. A coleta das amostras foi realizada através das técnicas de cistocentese, sonda uretral, ou a partir da micção espontânea dependendo do estado clínico do animal e da exigência do diagnóstico. As amostras foram enviadas para o Laboratório de Patologia Clínica da Universidade Estácio de Sá para avaliação dos Elementos Anormais e Sedimentoscopia (EAS), e após centrifugação pequenas alíquotas do sedimento e sobrenadante foram transferidas para tubos coletores estéreis.

3.1.4 Quadros de infecção uterina em cadelas

Foram obtidos espécimes de seis cadelas que apresentaram lesões e alterações comportamentais relacionadas ao trato reprodutivo. As principais alterações analisadas durante exame ginecológico das fêmeas foram: presença de secreção vaginal, vulvovaginite, alterações do ciclo estral, piometra (detectada por ultra-sonografia) dentre outras. A coleta foi realizada por aspiração direta do conteúdo uterino durante intervenções cirúrgicas

(panhisterectomia) realizadas no Departamento de Cirurgia de Pequenos Animais da Universidade Estácio de Sá ou coleta direta através de swabs estéreis.

3.1.5 Quadros de infecção respiratória

Foram obtidos espécimes de secreções nasais de cinco cães através “swabs” estéreis ou por aspiração bronquiolar. Na maioria dos casos, os animais apresentaram sinais de tosse, alterações nos movimentos respiratórios, alterações de ausculta pulmonar, secreções nasais purulentas, inflamação da faringe e linfadenite.

3.1.6 Quadros de infecção da cavidade oral

Foram obtidos 12 espécimes de cães com alterações patológicas da cavidade oral que incluíram periodontites, lesões pustulares e fistulares provocadas por infecção dos dentes pré-molares e molares superiores. As amostras foram coletadas por “swabs” estéreis durante a contenção física ou química dos animais.

3.1.7 Quadros de infecção da conjuntiva ocular

Foram obtidos 13 espécimes de cães com alterações patológicas da mucosa conjuntival tais como, secreções purulentas e úlceras de córnea. As amostras foram coletadas por “swabs” estéreis durante o exame clínico oftalmológico dos animais.

3.2 Isolamento Primário e Identificação Presuntiva

As amostras clínicas foram inoculadas em ágar sangue (5% de sangue de carneiro) e em meios seletivos e diferenciais de acordo com o tipo e sítio de coleta. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e posteriormente observadas as características morfológicas das colônias. As colônias isoladas foram submetidas ao método de Gram, teste da catalase e hidróxido de potássio a 3% e processadas de acordo com os testes de identificação específicos para cada grupo bacteriano (KONEMAN et al., 2001).

3.2.1 *Staphylococcus spp.*

O isolamento primário foi efetuado em ágar sangue (AS), posteriormente, as amostras foram repicadas em ágar seletivo manitol vermelho de fenol (MVF). Após a identificação presuntiva das colônias, estas foram submetidas ao método de Gram, para confirmação das suas características morfotintórias, à prova da catalase e ao teste do KOH a 3%, onde a não formação de gel viscoso indicou resultado negativo (KONEMAN et al., 2001). A prova da coagulase em tubo foi realizada para diferenciação entre as espécies de *Staphylococcus*. Uma alíquota de 0,1 ml de cada amostra cultivada em caldo BHI (Infuso de Cérebro e Coração), foi adicionada a 0,5 ml de sangue total de carneiro, acrescido de etileno-diamina-tetra-acetato (EDTA-1%) e incubadas a 37°C por 6 horas a fim de obter a visualização do coágulo. As amostras coagulase-positivas tiveram sua identificação comprovada através das provas de Voges-Proskauer (VP), fermentação da maltose e redução do nitrato (KONEMAN et al., 2001). As amostras coagulase-negativas foram submetidas à prova da resistência a bacitracina para diferenciação entre *Micrococcus spp.*, sensíveis, e estafilococos coagulase-negativos (ECN), resistentes. Para identificação das espécies de ECN foram efetuadas as seguintes técnicas: fermentação de açúcares (xilose, sacarose,

trealose, frutose, maltose, lactose e manose), redução de nitratos e produção de urease (KONEMAN et al., 2001) (Anexo 02).

3.2.2 *Streptococcus* spp.

A identificação dos isolados de *Streptococcus* spp. foi efetuada através do isolamento primário em AS e posterior repique em meio seletivo para *Streptococcus* spp. (ágar Azida). Após incubação, a 37°C por 24 horas em microaerofilia, utilizando sistema GASPAC, foram observadas as características morfológicas das colônias e o padrão de hemólise em AS. As provas de identificação realizadas foram: inoculação em leite adicionado de azul de metileno, teste de CAMP e provas de hidrólise de esculina e hipurato (KONEMAN et al., 2001, ANVISA, 2005).

3.2.3 Enterobactérias

Além do isolamento primário em AS, as amostras também foram repicadas em meios seletivos como ágar Mac Conkey (MC) e Eosina Azul de Metileno (EMB). Após a identificação presuntiva das colônias, estas foram submetidas ao método de Gram, teste da catalase e prova do KOH a 3%, onde a formação de gel viscoso indicou resultado positivo. As seguintes provas de identificação foram realizadas: comportamento em ágar tríplice açúcar-ferro (TSI), motilidade em tubo, produção do Indol, produção de ácidos a partir da glicose, fermentação de açúcares, redução do nitrato, produção de gelatinase, produção de urease, degradação do citrato e do malonato, e outros diferenciais de acordo com o microorganismo envolvido (KONEMAN et al., 2001).

3.2.4 Bastonetes Gram-negativos não-fermentadores

O mesmo padrão de isolamento primário, identificação presuntiva e testes fenotípicos realizados para as amostras suspeitas de enterobactérias foram utilizados para os bastonetes Gram-negativos não-fermentadores, diferenciados através da prova de comportamento em ágar TSI, pela não fermentação dos açúcares lactose, glicose e sacarose. Para a identificação confirmatória, as amostras suspeitas foram submetidas às provas de redução de nitrato, prova da oxidase e teste de fermentação e oxidação da glicose a 1% em caldo vermelho de fenol. As amostras suspeitas de *Pseudomonas* spp., ou seja, negativas em todos os testes citados anteriormente, foram repicadas em ágar Müeller Hinton (MH) para observação de pigmento fluorescente (pioverdina) a luz ultra-violeta característico de *Pseudomonas* spp. Grupo *Fluorescens* (KONEMAN et al., 2001).

3.2.5 Bactérias da cavidade oral

As amostras foram isoladas primariamente em AS e repicadas em diversos meios seletivos, tais como o ágar Mitis-Salivarius para o isolamento de *Streptococcus* do grupo *viridans* e suas modificações para isolamento seletivo de *Streptococcus mutans* (adição de 20% de sacarose e disco de bacitracina). O ágar chocolate foi utilizado para o isolamento de *Haemophilus* spp. e ágar Baird Parker para o isolamento de bactérias formadoras de pigmento negro, tais como *Corynebacterium* spp.. As colônias isoladas foram submetidas ao método de Gram, teste da catalase e KOH a 3% e processadas de acordo com os testes de identificação específicos para cada grupo bacteriano (KONEMAN et al., 2001).

3.2.6 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos de eleição

Após identificação os isolados foram submetidos ao teste de difusão em disco para determinar o perfil de suscetibilidade microbiana. Os isolados foram inoculados em caldo BHI, durante 24 horas a 37°C e, posteriormente, diluídos a concentração de 0,5 da escala de Mc Farland, equivalente a $1,5 \times 10^6$ células/mL, segundo os padrões estabelecidos pelo CLSI, 2005. Os isolados foram mantidos congelados em caldo MH acrescido de 4% de glicerol para posterior realização de outras metodologias.

3.2.6.1 Antimicrobianos

A escolha dos antimicrobianos (SENSIFAR-CEFAR[®]) para a realização dos ensaios de difusão em disco foi realizada segundo as indicações terapêuticas para cada um dos sítios de infecção de acordo com os dados disponíveis pela literatura atual (Anexo 03).

3.2.6.2 Técnica da Difusão em Disco

Uma alíquota de 0,1 mL da suspensão bacteriana foi distribuída por toda a superfície da placa contendo àgar MH com o auxílio da alça de Drigalski. Os discos foram depositados sobre a superfície do meio de cultura, já contendo o inóculo, e após incubação por 24 horas a 37°C os diâmetros formados na zona de inibição ao redor dos discos de antibiótico foram observados e medidos em milímetros (CLSI, 2005) (Anexo 04).

3.3 Avaliação *in vitro* do Perfil de Atividade da Azitromicina

3.3.1 Avaliação do perfil de suscetibilidade bacteriana a azitromicina através da técnica de Difusão em Disco

A avaliação da suscetibilidade a azitromicina através da técnica de difusão em disco foi realizada em separado, utilizando a metodologia já preconizada pelo CLSI, 2005. Os discos de azitromicina (SENSIFAR-CEFAR[®]) de 15µg foram depositados sobre a superfície do meio de cultura, já contendo o inóculo, e após incubação por 24 horas a 37°C, os diâmetros formados na zona de inibição ao redor dos discos, foram observados e medidos, em milímetros (CLSI, 2005). Cada isolado foi testado novamente, em intervalo de uma semana, para avaliação da reprodutibilidade do teste.

3.3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para azitromicina através da técnica de Microdiluição em Caldo

O método da microdiluição em caldo permitiu a avaliação da menor concentração de azitromicina (PFIZER[®]) capaz de impedir o crescimento bacteriano. Para isso, uma solução estoque de azitromicina (5,12mg/mL) foi diluída em diferentes concentrações em caldo MH, que variaram de 1,0µL/mL; 2,0µL/mL; 4,0µL/mL; 8,0µL/mL; 16,0µL/mL; 32,0µL/mL; 64,0µL/mL; 128,0µL/mL; 256,0µL/mL; até 512,0µL/mL. As suspensões bacterianas crescidas por 24hs a 37°C em caldo BHI, foram diluídas até 10^{-3} em caldo MH, a fim de obter-se uma quantidade final de, aproximadamente, 10^6 UFC/mL. Para cada amostra, 0,1 mL de suspensão bacteriana foi adicionada a 0,9 ml de caldo MH contendo as concentrações distintas de azitromicina e incubadas a 37°C por 24 horas. O resultado foi obtido através do grau de turvação observado nos tubos. Qualquer indício de turvação foi considerado crescimento bacteriano, portanto resistente à concentração do antibiótico presente no caldo

MH. Logo, o valor da concentração do caldo anterior ao primeiro que apresentou turvação, foi considerado como sendo a concentração inibitória mínima para azitromicina (CLSI, 2005). As cepas padrão de *S. aureus* sensível (ATCC 25923) e resistente à oxacilina (ATCC 29213) foram obtidas junto ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade/INCQS/FIOCRUZ e utilizadas como controle dos testes. Para avaliar uma possível contaminação durante o preparo da técnica foi utilizado caldo MH com antibiótico sem o inóculo.

3.3.3 Determinação da CIM para azitromicina através da técnica de Diluição em Ágar

O método de diluição em ágar também permite a avaliação da menor concentração de azitromicina (PFIZER[®]) capaz de impedir o crescimento bacteriano e utiliza o ágar MH como substrato para realização das diluições. O desenvolvimento desta técnica se fez através uma concentração inicial de 5,12mg/mL de azitromicina que foi diluída em ágar MH às concentrações de 1,0µL/mL; 2,0µL/mL; 4,0µL/mL; 8,0µL/mL; 16,0µL/mL; 32,0µL/mL; 64,0µL/mL; 128,0µL/mL; 256,0µL/mL; até 512,0µL/mL. As diluições foram despejadas em placas de Petri contendo um volume final de 20mL de ágar MH e em cada placa pode ser inoculada até 30 estirpes, utilizando-se ponteiras estéreis para cada uma dessas. Após incubação a 37°C por 24hs, o crescimento de colônias indicou resistência à concentração e a CIM foi considerada como a primeira concentração que não apresentou crescimento (MANN; MARKHMAN, 1998).

3.4 Avaliação da Resistência Cruzada em *Staphylococcus* spp. Resistentes à Oxacilina e Azitromicina

Para a avaliação da resistência cruzada em *Staphylococcus* spp. foi determinado o perfil fenotípico de resistência à azitromicina e oxacilina, e avaliação genotípica da resistência à oxacilina, para posteriormente determinar quantos isolados apresentaram resistência aos dois antibióticos. Os métodos mais utilizados para detecção da resistência à oxacilina, contam com modificações das condições de cultura para aumentar a expressão da resistência. A avaliação fenotípica dessa resistência foi realizada pelas técnicas de difusão em disco, difusão em disco modificada, microdiluição em caldo (KOHNER et al., 1999) e em ágar (MANN; MARKHMAN, 1998). Para a realização dos testes de suscetibilidade à oxacilina, o antibiótico foi diluído a uma concentração estoque de 1,0mg/mL, em água destilada estéril. As cepas padrão de *S. aureus* sensível (ATCC 25923) e resistente à oxacilina (ATCC 29213) foram obtidas junto ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade/INCQS/FIOCRUZ e utilizadas como controle dos testes.

3.4.1 Difusão em Disco Modificada

Nesta técnica de difusão em disco, foi utilizado ágar MH suplementado com 4% de NaCl. A suspensão bacteriana (0,1mL) foi distribuída por toda a superfície das placas contendo meio sólido e após incubação por 24 horas a 37°C, os diâmetros formados na zona de inibição ao redor do disco de oxacilina, foram observados e medidos em milímetros. Os diâmetros acima de 13 mm indicavam a sensibilidade da amostra ao antibiótico (KOHNER et al., 1999).

3.4.2 Ágar Screen

O desenvolvimento desta técnica se fez através da diluição da oxacilina (1,0mg/mL) a uma concentração final de 6µg de antibiótico por mililitro de ágar MH, suplementado com 4% de NaCl. As placas de Petri foram divididas em quatro partes iguais e sobre cada linha foi possível a inoculação de uma suspensão, ou seja, para cada placa foi possível a inoculação de quatro suspensões bacterianas distintas, semeadas com o auxílio da alça de platina. Após 24 horas de incubação a 37°C a resistência das cepas bacterianas ao antibiótico foi avaliada, onde qualquer colônia crescida na superfície do meio de cultura foi considerada resistente (KOHNER et al., 1999).

3.4.3 Determinação da CIM para oxacilina através da Técnica da Microdiluição em Caldo

O método da microdiluição em caldo permitiu a avaliação da menor concentração de oxacilina capaz de impedir o crescimento bacteriano. Para isso, a solução estoque de oxacilina (1,0mg/mL) foi diluída a diferentes concentrações que variaram de 0,25µL/mL; 0,5µL/mL; 1,0µL/mL; 2,0µL/mL; 4,0µL/mL até 8,0µL/mL em caldo MH suplementado com 2% de NaCl. As suspensões bacterianas crescidas por 24hs a 37°C em caldo BHI, foram diluídas até 10^{-3} em caldo MH, a fim de obter-se uma quantidade final de, aproximadamente, 10^6 UFC/mL. Para cada amostra, 0,1 ml de suspensão bacteriana foi adicionada a 0,9 mL de caldo MH contendo as concentrações distintas do antibiótico e incubadas a 37°C por 24 horas. O resultado foi obtido através do grau de turvação observado nos tubos. Qualquer indício de turvação foi considerado crescimento bacteriano, portanto resistente à concentração da droga presente no caldo MH. Logo, o valor da concentração do caldo anterior ao primeiro que apresentou turvação, foi considerado como sendo a concentração inibitória mínima da oxacilina (KOHNER et al., 1999). As cepas padrão de *S. aureus* sensível (ATCC 25923) e resistente à oxacilina (ATCC 29213) foram obtidas junto ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade/INCQS/FIOCRUZ e utilizadas como controle dos testes. Isolados que cresceram em caldos contendo valores de CIM maior ou igual a 8,0µg/mL foram considerados resistentes.

3.4.4 Determinação da CIM para oxacilina através da Técnica de Diluição em Ágar

A determinação da CIM para oxacilina pelo método de diluição em ágar seguiu os mesmos critérios descritos para a metodologia realizada para avaliação da azitromicina. O desenvolvimento desta técnica se fez através uma concentração inicial de 1mg/ml de oxacilina que foi diluída em ágar MH às concentrações de 0,25µL/mL; 0,5µL/mL; 1,0µL/mL; 2,0µL/mL; 4,0µL/mL até 8,0µL/mL. O resultado foi obtido pela avaliação do crescimento de colônias que indicou resistência à concentração e a CIM foi considerada como a primeira concentração de oxacilina que não apresentou crescimento. Como controle positivo foi utilizado ágar MH sem antibiótico (MANN; MARKHMAN, 1998). Isolados que cresceram em ágar contendo valores de CIM maior ou igual a 8,0µg/mL foram considerados resistentes.

3.5 Detecção do gene *mecA* pela Técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Muitas pesquisas têm utilizado a técnica da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), baseada na informação da seqüência de DNA, para detecção de cepas de MRSA. O método

de PCR apresenta alta sensibilidade e especificidade além de ser independente das condições físicas e químicas das culturas bacterianas e, portanto foi utilizada como técnica ouro para detecção do gene *mecA* na avaliação do perfil de resistência à oxacilina nos isolados de *Staphylococcus* spp. (MURAKAMI et al. 1991; TOKUE et al. 1992; SPELDOOREN et al., 1998).

O procedimento de detecção do gene *mecA* foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular, no Departamento de Parasitologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

3.5.1 Lise bacteriana

Para a obtenção do DNA bacteriano, uma única colônia de cada cepa, crescida em ágar MH após 24hs a 37°C, foi suspensa em tampão (10mM Tris-HCl e 1mM EDTA- pH 8.0) a fim de estabelecer uma concentração final de 3×10^8 UFC/mL de acordo com a escala de Mc Farland. Foi adicionado um volume de 40µl de lisozima (PROMEGA) (10mg/mL), 45µl de proteinase K (PROMEGA) (20mg/mL) a 210 µl de suspensão recém preparada. Após a incubação a 37°C por 1hora, a 250µl dessa solução foi adicionado 2,5µl de SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) (20%), incubado a 100°C por 10 minutos e resfriados em gelo. Após centrifugação a 9.500xg por 5 minutos, 15µl do sobrenadante contendo o DNA foi retirado e utilizado para técnica de PCR (COELHO et al., 2007).

3.5.2 Amplificação do gene *mecA* pela técnica de PCR

Para tal a amplificação do gene, foi preparado uma suspensão utilizando-se:

- 0,25mM de primer (PROMEGA) específico para amplificação do gene:
5' AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C 3'
3' AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C 5'
- Tampão 10X (PROMEGA);
- 25mM de MgCl₂ (PROMEGA);
- 2,5mM de nucleotídeos (PROMEGA);
- 2 U de *Taq* polimerase (PROMEGA).

A 45µl deste tampão, foi adicionado um volume de 5µl de DNA extraído. O material utilizado na amplificação foi levado ao termociclador, no qual foram realizados 40 ciclos:

- desnaturação a 94°C por 30s;
- anelamento a 55°C por 30s;
- extensão a 72°C por 1minuto;
- um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos.

Um volume de 10µl do produto da reação foi aplicado em gel de agarose (SIGMA) a 1,5% para separação do segmento do gene *mecA* através da eletroforese, utilizando o marcador de 100pb, para quantificação dos pares de base (pb) do fragmento gene. Como controle positivo foi utilizada a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (COELHO et al., 2007).

3.6 Análise Estatística

Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para azitromicina, os resultados obtidos a partir das técnicas de microdiluição em caldo e ágar, foram submetidos

a um modelo de regressão logística, conforme Ritz; Streibig (2005), utilizando-se o software R2.4.1. (2006), constituído de 4 parâmetros sendo: $F(x(b,c,d,e)) = c + ((d-c)/(1 + \exp(b(\log(x) - \log(e))))$.

Para determinar o perfil de resistência dos isolados bacterianos frente à azitromicina, os resultados dos três testes de avaliação fenotípica foram submetidos a uma análise estatística multivariada (correlação canônica) para estabelecer a correspondência entre os seus resultados de forma a determinar quais isolados foram realmente resistentes (HAIR et al., 2005).

O programa Excel (Microsoft®) foi utilizado para confecção dos gráficos com os percentuais dos isolados identificados em diferentes sítios infecciosos, para os gráficos com percentuais de suscetibilidade antimicrobiana e para o cálculo de sensibilidade e especificidade dos testes fenotípicos para detecção de resistência a oxacilina como método preditivo da presença do gene *mecA*. A sensibilidade das técnicas fenotípicas é dada pelos isolados que são resistentes nos testes fenotípicos e que possuem o gene, considerados os isolados verdadeiramente positivos (VP). Sensibilidade é calculada através da seguinte equação: $VP / (VP + FN)$ (falso-negativo), onde FN corresponde aos isolados que são resistentes nos testes fenotípicos, porém não expressam o gene. A especificidade é o poder de distinguir os isolados sensíveis aos testes fenotípicos e que não apresentam o gene *mecA*, sendo detectados através do seguinte cálculo: $VN / (FP + VN)$ (verdadeiro negativo).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação das Espécies

Os testes de identificação das espécies bacterianas e suscetibilidade aos antimicrobianos foram realizados seqüencialmente e os resultados eram imediatamente enviados aos médicos veterinários responsáveis pelo atendimento clínico dos animais como forma de auxiliar no diagnóstico e na terapêutica das doenças (Tabela 01) (Figura 02). Essa conduta visou conscientizar uma pequena parcela da comunidade veterinária a respeito da importância clínica da realização dos testes de identificação e de suscetibilidade, além de gerar entendimento a respeito do impacto provocado pelo uso indevido de antibióticos. O resultado dessa medida foi muito satisfatório, uma vez que contribuiu significativamente para o sucesso de diversos atendimentos e trouxe esclarecimentos a respeito da diversidade de agentes bacterianos envolvidos na etiologia das doenças, desmistificando o conceito do envolvimento apenas de agentes bacterianos clássicos como justificativa para a escolha do antibiótico.

Tabela 01. Microrganismos obtidos a partir dos processos infecciosos provenientes de animais de companhia

Microrganismos	Sítios de Processos Infecciosos Avaliados (n/%)						
	Otite	Pele	Trato urinário	Trato respiratório	Trato reprodutivo	Mucosa oral	Mucosa ocular
	49	40	29	5	10	6	8
Total de isolados							
<i>S. intermedius</i>	13/26,5	11/27,5	5/17,2	-	1/10,0	1/16,7	2/25,0
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	4/8,2	6/15	-	-	1/10,0	-	2/25,0
<i>S. aureus</i> subsp. <i>anaerobius</i>	-	-	-	-	1/10,0	-	-
<i>S. schleiferi</i> subsp. <i>coagulans</i>	2/4,1	4/10,0	-	-	-	-	-
<i>S. xyloso</i>	4/8,2	2/5,0	-	-	-	1/16,7	-
<i>S. hominis</i>	-	2/5,0	-	-	1/10,0	-	-
<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	2/40,0	-	-	-
<i>Micrococcus</i> spp.	7/14,3	3/7,5	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus</i> spp.	-	-	-	-	-	1/16,7	-
<i>Corynebacterium</i> spp.	1/ 2,1	1/2,5	1/3,4	1/20,0	2/20,0	1/16,7	-
<i>Listeria</i> spp.	-	-	1/3,4	2/40,0	-	1/16,7	2/25,0
<i>Bacillus</i> spp.	-	-	3/10,3	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7/14,3	1/2,5	-	-	1/10,0	-	1/12,5
<i>E. coli</i>	3/6,1	2/5,0	7/24,1	-	-	-	-
<i>P. mirabilis</i>	3/6,1	2/5,0	4/13,8	-	-	1/16,7	-
<i>P. vulgaris</i>	-	1/2,5	-	-	-	-	-
<i>S. marcescens</i>	3/6,1	3/7,5	1/3,4	-	1/10,0	-	-
<i>S. liquefaciens</i>	-	-	-	-	-	-	1/12,5
	-	1/2,5	3/10,3	-	1/10,0	-	-
<i>C. freundii</i>							
<i>Y. enterocolitica</i>	-	1/2,5	2/6,9	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> spp.	-	-	1/3,4	-	-	-	-
<i>Enterobacter</i> spp.	-	-	-	-	1/10,0	-	-
levedura	2/4,1	-	1/3,4	-	-	-	-

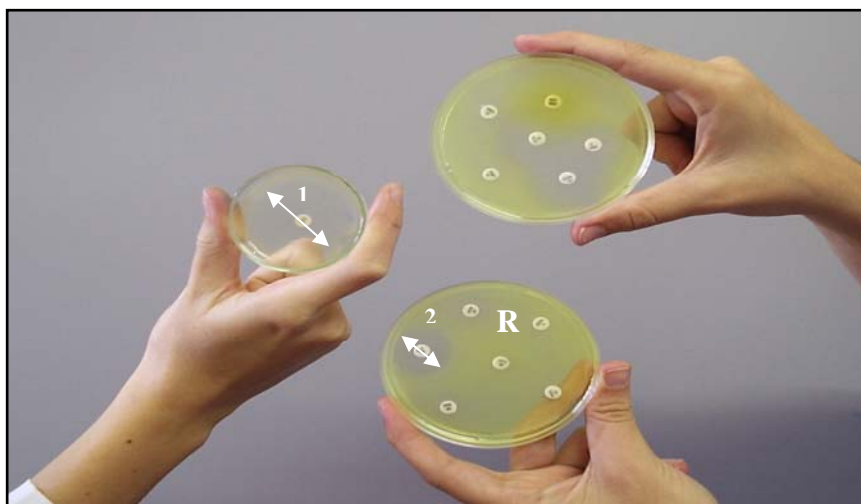


Figura 02. Perfil de suscetibilidade de um isolado de *Pseudomonas aeruginosa* obtida a partir de espécimes de otite externa. (1) Halo de inibição da azitromicina, (2) Halo de inibição do antimicrobiano, (R) Resistência.

4.1.1 Identificação das amostras de otite externa canina

Foram obtidos 49 isolados bacterianos a partir de espécimes de 33 cães com otite externa. Dentre esses, o percentual obtido de espécies de estafilococos coagulase-positivos (ECP) correspondeu a 38,8% (19/49), *Micrococcus* spp. a 14,3% (7/49) e estafilococos coagulase-negativos (ECN) a 8,2% (4/49). Foram obtidos 15 isolados de bastonetes Gram-negativos (30,6%) dos quais, 18,4% (9/49) corresponderam ao grupo das enterobactérias e 14,3% (7/49) a *Pseudomonas* spp.. Além disso, foram isolados bastonetes Gram-positivos do gênero *Corynebacterium* spp. (2,0%, 1/49) e leveduras (4,1%, 2/49) (Gráfico 01).

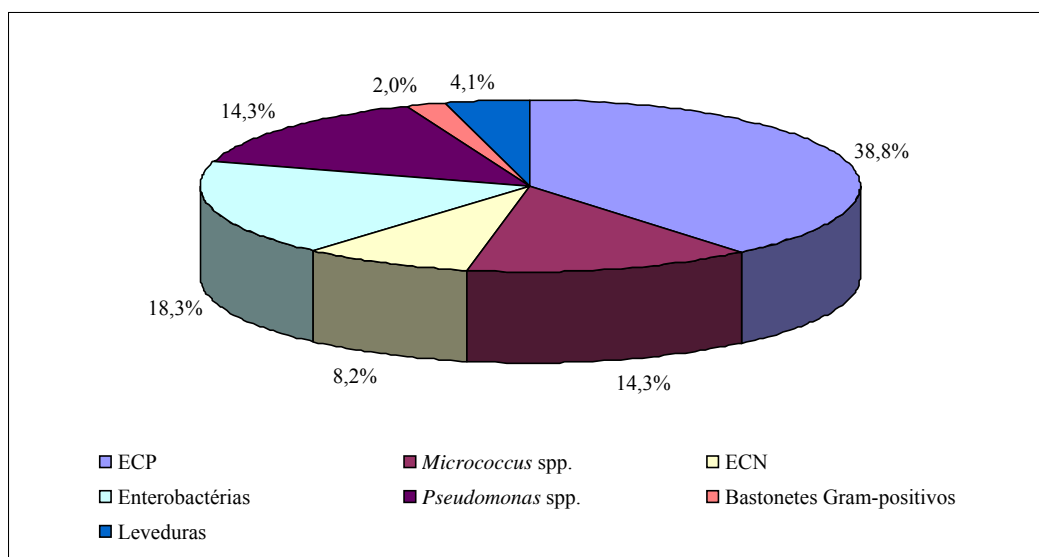
Dentre as espécies de estafilococos coagulase-positivas isoladas, *Staphylococcus intermedius* correspondeu a 26,5% (13/49), *S. aureus* subsp. *aureus* correspondeu a 8,2% (4/49) e *S. schleiferi* subsp. *coagulans* a 4,1% (2/49). Esses resultados corroboram com Hariharan et al. (2006) que, num amplo estudo ao longo de cinco anos, avaliaram a microbiota de 1819 cães e gatos com otite externa e isolaram ECP em 36,3% das amostras, sendo *S. intermedius* a espécie prevalente. Também segundo Blanco et al. (1996) e Kiss et al. (1997) as espécies *S. aureus* e *S. intermedius* são apontadas como as principais espécies implicadas nestas infecções. Os isolados de ECN avaliados no presente estudo, corresponderam a 8,2% das amostras, sendo *S. xylosus* a espécie prevalente. Oliveira et al. (2006) avaliaram 30 cães com otite média no estado do Ceará e isolaram *S. xylosus* em 6,7% das amostras.

O gênero *Micrococcus* spp. representou 14,3% (7/49) dos isolados e em 55,6% (18/33) das amostras estava associado a outros agentes. Os membros deste gênero são encontrados comumente no meio ambiente (KONEMAN et al., 2001) e como habitantes normais da pele e mucosas. Na maioria das vezes, são reportados como contaminantes em isolados clínicos (GAHRN-HANSEN et al., 1987), embora possam desenvolver infecções oportunistas em indivíduos imunossuprimidos (BROOKS et al., 2000).

Dentre as enterobactérias isoladas no presente estudo, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis* e *Escherichia coli* corresponderam a 6,1% (3/49) dos isolados, respectivamente. Dos sete (14,3%) bastonetes Gram-negativos não-fermentadores isolados, todos foram identificados como *Pseudomonas aeruginosa*. Hariharan et al. (2006) também relataram o isolamento de *P. mirabilis* (9,6%), *E. coli* (9,8%) e *P. aeruginosa* (17,5%). Nobre et al. (2001) ao analisarem a microbiota de 78 cães otopatas e 36 sadios, isolaram *P. aeruginosa* em 10,3% das amostras.

No presente estudo, foi possível determinar infecções do tipo monomicrobianas em 48,5% (16/33) dos espécimes coletados, infecções polimicrobianas em 36,4% (12/33) e cultura bacteriológica negativa em 15,5% (5/33) dos espécimes avaliados. Muller et al. (1995) encontraram infecções polimicrobianas em 30% dos casos de otite avaliados, apontando para a importância na determinação dos agentes etiológicos para indicação terapêutica efetiva embasada em testes de suscetibilidade para respectivos agentes. Da mesma forma, Oliveira et al. (2005) detectaram 50,5% de infecções monomicrobianas e 49,5% polimicrobianas em 305 amostras de cães com otite externa.

Gráfico 01. Perfil da distribuição dos microrganismos isolados a partir de 33 casos de otite externa canina.



4.1.2 Identificação das amostras de infecções de pele

Foram obtidos 40 isolados bacterianos a partir de espécimes de 33 cães com pioderma. Dentre esses, o percentual obtido de espécies de ECP correspondeu a 52,5 % (21/40), ECN a 10,0% (4/40) e *Micrococcus* spp. a 7,5% (3/40). Foram obtidos 11 (27,5%) isolados de bastonetes Gram-negativos dos quais, 25% (10/40) corresponderam ao grupo das enterobactérias e 2,5% (1/40) a *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, foram obtidos bastonetes Gram-positivos do gênero *Corynebacterium* spp. em 2,5% (1/40) dos isolados (Gráfico 02).

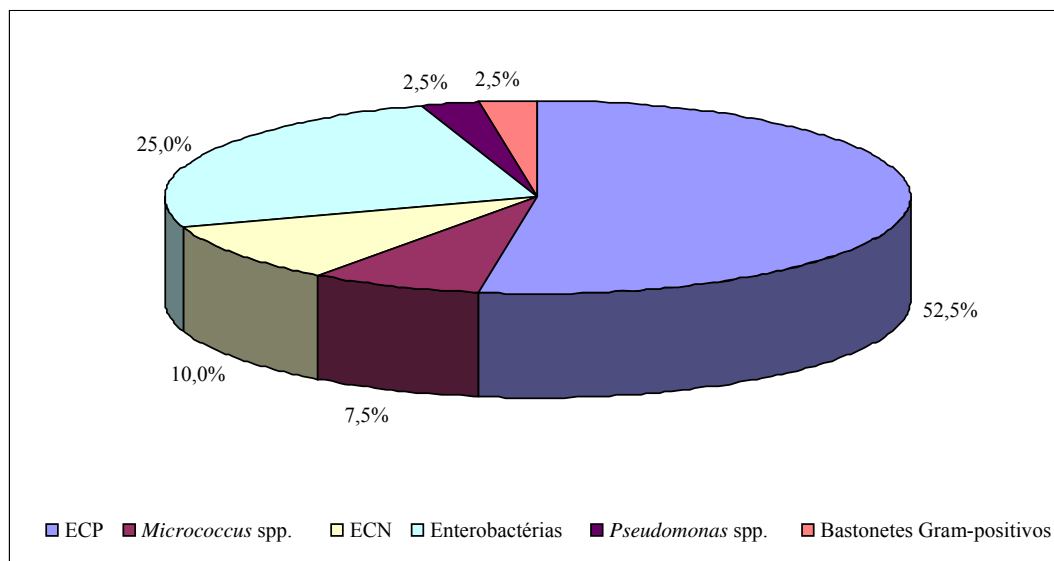
Dentre as espécies de ECP isoladas, *S. intermedius* correspondeu a 27,5% (11/40), *S. aureus* subsp. *aureus* a 15,0% (6/40) e *S. schleiferi* subsp. *coagulans* a 10,0%. Segundo

Perllerin et al. (1998), *S. intermedius* é o patógeno cutâneo de maior importância nas infecções bacterianas de cães. Os resultados corroboram com Nobre et al. (1999) que investigaram a microbiota de 29 cães com dermatite e identificaram *S. intermedius* em 29,2% dos isolados e *S. aureus* em 25%. May et al. (2005) investigaram a microbiota de 16 cães com otite externa e pioderma profundo e isolaram *S. schleiferi* subsp. *coagulans* em 6,6% dos isolados.

Dos ECN isolados no presente estudo, *S. xylosus* e *S. hominis* corresponderam a 5% (2/40), respectivamente, corroborando com a avaliação realizada por Medleau et al. (1986) que em 210 cães com pioderma, isolaram 14 ECN dentre os quais, cinco (35,7%) foram *S. xylosus* e um (7,1%) *S. hominis*. Espécies de *Micrococcus* foram obtidas em associação com outros agentes em 7,5% (3/40) dos isolados avaliados no presente estudo. Segundo Scott et al. (1995) *Micrococcus* spp. faz parte da microbiota residente da pele, mas pode atuar como agente secundário em casos de proliferação de outros agentes bacterianos, principalmente *S. intermedius*.

As espécies de enterobactérias isoladas no presente estudo, corresponderam a *S. marcescens* (3/40), *P. mirabilis* (2/40), *E. coli* (2/40), *P. vulgaris* (1/40), *Citrobacter freundii* (1/40) e *Yersinia enterocolitica* (1/40). O gênero *Corynebacterium* spp. correspondeu aos 2,5% (1/40) de bastonetes gram-positivos isolados. Segundo Scott et al. (2001) os microrganismos transitórios da pele do cão incluem *E. coli*, *P. mirabilis*, *Serratia* spp., *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp. e *Corynebacterium* spp..

Gráfico 02. Perfil da distribuição dos grupos bacterianos isolados a partir 33 casos de pioderma canino.



4.1.3 Identificação das amostras de infecções urinária

Foram obtidos 29 espécimes de 34 cães e 15 gatos com sinais clínicos de distúrbio do trato urinários inferior. A cultura bacteriológica foi positiva em 73,5% (26/34) dos espécimes de cães, obtendo-se um total 26 isolados. Dentre esses, o percentual obtido de espécies do grupo das enterobactérias correspondeu a 65,4% (17/26), estafilococos

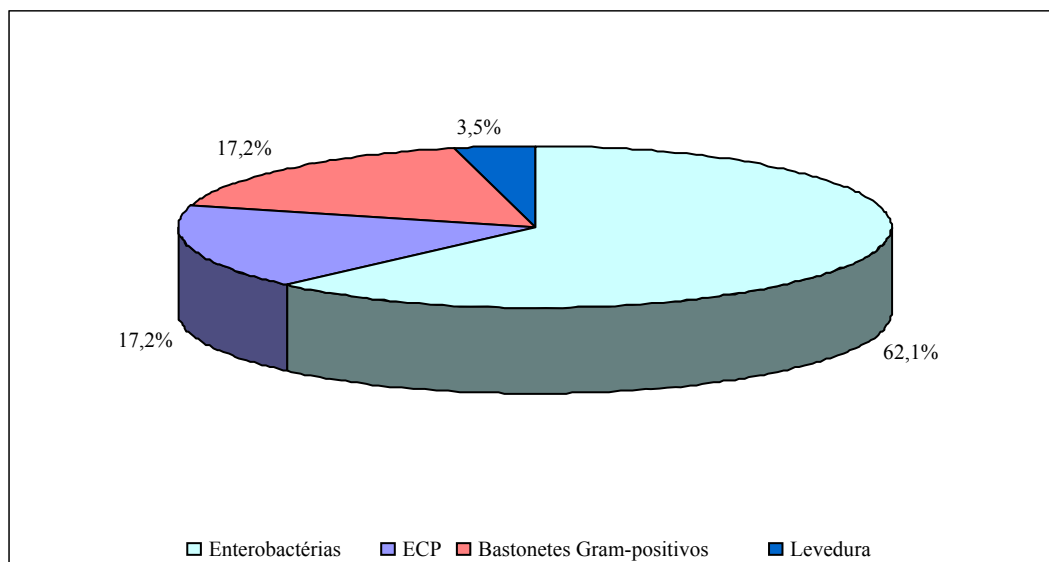
coagulase-positivos a 11,5% (3/26), bastonetes Gram-positivos a 19,2% (5/26), e leveduras a 3,8% (1/26) (Gráfico 03).

Dentre as espécies de enterobactérias, *E. coli* correspondeu a 23,1% (6/26) dos isolados, *P. mirabilis* a 15,4% (4/26), *C. freundii* a 11,5% (3/26), *Y. enterocolitica* a 7,7% (2/26) enquanto, *Salmonella* spp. e *S. marcencens* corresponderam a 3,8% (1/26) dos isolados, respectivamente. Os ECP corresponderam à espécie *S. intermedius* (3/26) e em relação aos bastonetes Gram-positivos, *Corynebacterium* spp. e *Listeria* spp. corresponderam à 3,8% (1/26), respectivamente e *Bacillus* spp. correspondeu a 11,5% (3/26) dos isolados. Vários microrganismos estão envolvidos na etiologia das doenças do trato urinário (UTI) de cães e para estabelecer o diagnóstico definitivo torna-se necessário à realização da cultura da urina. Estudos apontam a cultura de urina como padrão ouro para o diagnóstico dessa doença, além de auxiliar na escolha da melhor conduta terapêutica (FORRESTER et al., 1999).

Os resultados apresentados corroboram com Çetin et al. (2003) que examinaram amostras de urina de 100 cães com doença trato urinário inferior e reportaram uma prevalência de crescimento bacteriano em 38% das amostras. Esse estudo relatou que dentre 51 isolados bacterianos, a espécie mais prevalente foi *E. coli* (23,5%), segundo o autor essa espécie constitui a causa mais comum de doença do trato urinário de cães. O autor também reportou o isolamento de outras espécies de enterobactérias, tais como, *Klebsiella pneumoniae* (7,8%), *P. vulgaris* (5,9%), *C. freundii* (3,9%), *Enterobacter agglomerans* (3,9%), bastonetes não-fermentadores como, *P. aeruginosa* (3,92%), além de espécies de *Staphylococcus* (9,8%), *Micrococcus* (11,8%), *Streptococcus* (15,7%), *Corynebacterium* (9,8%) e *Acinetobacter* (3,9%). Um outro estudo que avaliou 8.354 amostras de urina durante o período de 1969 até 1995, reportou uma prevalência de crescimento bacteriano em 96,3% das amostras, dentre esses foram isolados, *E. coli* em 44,1% dos isolados, *Staphylococcus* spp. em 11,6%, *Proteus* spp. em 9,3%, *Klebsiella* spp. em 9,1%, *Enterococcus* spp. 8,0% e *Streptococcus* spp. em 5,4% (LING et al., 2001).

No presente estudo, das 15 amostras de urina de gatos, 20% (3/15) apresentaram crescimento bacteriano e em 80% (12/15) a cultura bacteriológica foi negativa. O percentual das espécies isoladas correspondeu a 66,7% (2/3) para *S. intermedius* e 33,3% (1/3) para *E. coli*. Recher Junior et al., (2005) analisaram amostras de urina de 50 felinos com obstrução uretral recidivante evidenciando crescimento bacteriano em 8% destas, onde os principais agentes isolados foram: *Pasteurella* spp., *Klebsiella* spp., *Staphylococcus* spp. e *E. coli*. Segundo os autores infecções bacterianas do trato urinário constituem achado esporádico na espécie felina, resultado pertinente com o do presente estudo.

Gráfico 03. Perfil da distribuição dos grupos bacterianos isolados a partir de 49 casos de infecções do trato urinário.



4.1.4 Identificação das amostras de infecções uterina

Foram obtidos 10 isolados bacterianos de seis cadelas com piometra. Dentre esses, as enterobactérias corresponderam a 30% (3/10) dos isolados e *P. aeruginosa* correspondeu a 10% (1/10). Dentre as espécies de ECP o percentual detectado foi de 30% (3/10) dos isolados, para ECN 10% (1/10) e para os bastonetes Gram-positivos 20% (2/10) (Gráfico 04).

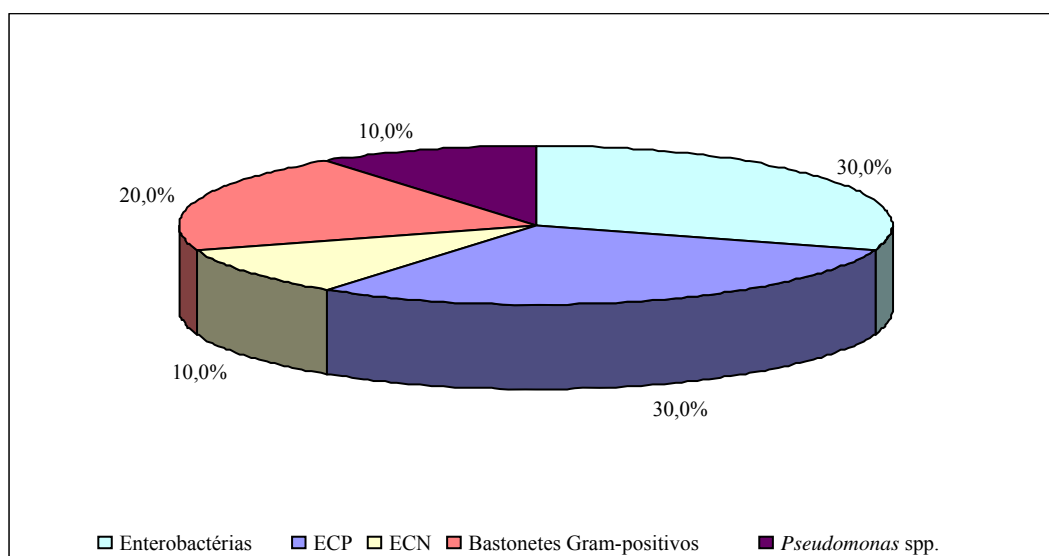
Foram observadas infecções polimicrobianas em três (50%) dos seis espécimes coletados obtendo-se no total, seis isolados bacterianos nas seguintes associações: *S. aureus* subsp. *aureus* e *S. aureus* subsp. *anaerobius*, *S. intermedius* e *S. marcencens*, *S. hominis* e *E. aerogenes*. Nos outros três (3/6) espécimes avaliados, apenas um agente microbiano foi isolado e os respectivos percentuais detectados foram 10% (1/10) para *C. freundii*, 10% (1/10) para *Pseudomonas aeruginosa* e 20% (2/10) para *Corynebacterium* spp..

Esses resultados apontam para importância da determinação da microbiota uterina tanto de animais saudáveis quanto doentes, uma vez que bactérias oportunistas podem tornar-se potencialmente patogênicas em condições favoráveis tais como, estimulação hormonal, trauma pós-parto, migração de bactérias da vagina ou contaminação por fezes. Mishelia et al. (2001) examinaram a microbiota uterina de 41 cadelas saudáveis em diferentes fases do ciclo estral e detectaram 44 isolados bacterianos que corresponderam a *Staphylococcus* spp. (70,5%), *Corynebacterium* spp. (70,5%), *Proteus* spp. (13,6%) e *Klebsiella* spp. (15,9%) e *Streptococcus* spp. (15,9%). No entanto, outros trabalhos reportaram o envolvimento das mesmas espécies em casos de piometra canina. Gandotra et al. (1994) investigaram a microbiota bacteriana de cadelas com piometra e reportaram o isolamento de *Staphylococcus aureus* em 38,4% dos isolados, *Corynebacterium* spp. em 20,1% e *E. coli* em 7,7%. Coggan et al. (2004) avaliaram 82 amostras de cadelas com piometra e em 78 dessas houve crescimento bacteriano. *Escherichia coli* apresentou prevalência de 79,2% das amostras, mas outras espécies bacterianas também foram isoladas

em menor prevalência, dentre essas *S. schleiferi* subsp. *coagulans* e *S. epidermidis* corresponderam a 2,7%, respectivamente, *Streptococcus canis* a 1,4%, *P. aeruginosa* a 2,7%, *Klebsiella pneumoniae* a 2,7% e *Morganella morganii* a 2,7%. Segundo o autor *Escherichia coli* é o patógeno frequentemente associado aos casos de infecção uterina. A predominância de *E. coli* nas infecções uterinas pode ser devida à habilidade deste microrganismo em aderir a sítios antigênicos específicos no endométrio e miométrio estimulado por progesterona.

O diagnóstico da piometra é baseado em achados radiográficos e ultrassonográficos e a indicação terapêutica frequentemente é cirúrgica. Durante o atendimento clínico veterinário, a rotina ginecológica é baseada apenas no exame físico dos animais e detecção de secreção vaginal e processos inflamatórios, outros exames são indicados somente nos casos onde existe um interesse no potencial reprodutivo da fêmea ou para inseminação artificial. Exames colcitológicos e coleta de amostras para a identificação dos agentes etiológicos poderiam ser medidas auxiliares ao tratamento e prevenção dessa doença.

Gráfico 04. Perfil da distribuição dos grupos bacterianos isolados a partir de seis casos de infecções uterinas.



4.1.5 Identificação das amostras de infecções do trato respiratório inferior

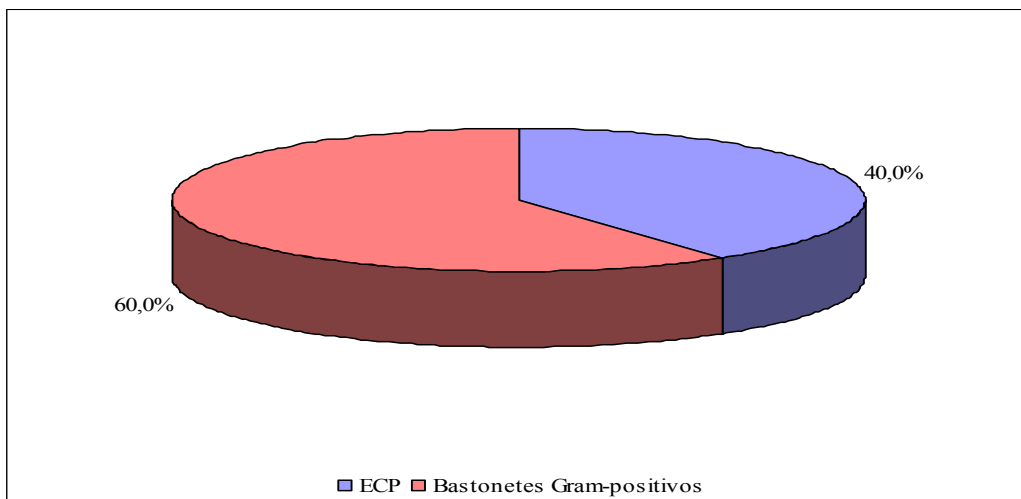
Todos os cinco espécimes coletados a partir de secreções nasais e punção bronquiolar de cães com pneumonia foram positivos na cultura bacteriológica obtendo-se um total de cinco isolados bacterianos. Em 80% (4/5) desses espécimes foram isolados bastonetes Gram-positivos e em 20% (1/5) foi isolado *Staphylococcus epidermidis*. Dentre os bastonetes Gram-positivos, *Corynebacterium* spp. e *Listeria* spp. foram isolados em 40% (2/5) dos espécimes respectivamente, os quais foram provenientes de animais que apresentaram efusão pleural opaca.

Um estudo que avaliou a microbiota nasal de 60 cães aparentemente normais foram identificados 106 isolados bacterianos dos quais, *S. epidermidis* correspondeu a 58,5% dos isolados e *C. xerosis* a 4,7% (AJUWAPÉ et al., 2006). O envolvimento dessas espécies

como patógenos primários do trato respiratório é pouco relatado, uma vez que constituem a microbiota do trato respiratório, porém podem ser considerados agentes oportunistas em casos de perda da barreira de defesa orgânica, ou podem estar associados à contaminação ambiental.

No presente estudo, *Listeria* spp. foi isolada em amostras de dois cães provenientes do Instituto Veterinário Municipal Jorge Waitsman, com histórico de agressividade, apreendidos e dispostos em período de quarentena para observação de sinais clínicos da raiva canina. Os animais foram alocados em baias superlotadas, predispondo a brigas e ao contágio. Após envolvimento em uma briga, um dos cães apresentou secreção nasal mucopurulenta e lesão fistular próximo ao olho esquerdo, e o outro desenvolveu um quadro de uveíte traumática. Foi realizado exame clínico e laboratorial dos animais, no qual foi isolado *Listeria* spp. em todos os sítios avaliados, sendo possível estabelecer o envolvimento e a via de contaminação. A condição higiênico-sanitária do local de alojamento dos cães deve ter associação direta com a presença deste agente, uma vez que *Listeria* spp. pode ser isolada a partir de solos, silagem, afluentes de esgoto, água corrente e fezes (HIRSH; ZEE, 2003). Este cenário levanta questões importantes a respeito da exposição humana, no caso médicos veterinários e a equipe de tratadores, e de animais a um excesso de contaminação ambiental que favorece a transmissão de agentes potencialmente patogênicos. Logo, a principal contribuição desta identificação bacteriana foi o esclarecimento de tais fatores de risco e da importância do médico veterinário como agente atuante no controle de zoonoses.

Gráfico 05. Perfil da distribuição dos grupos bacterianos isolados a partir de cinco casos de infecções do trato respiratório.



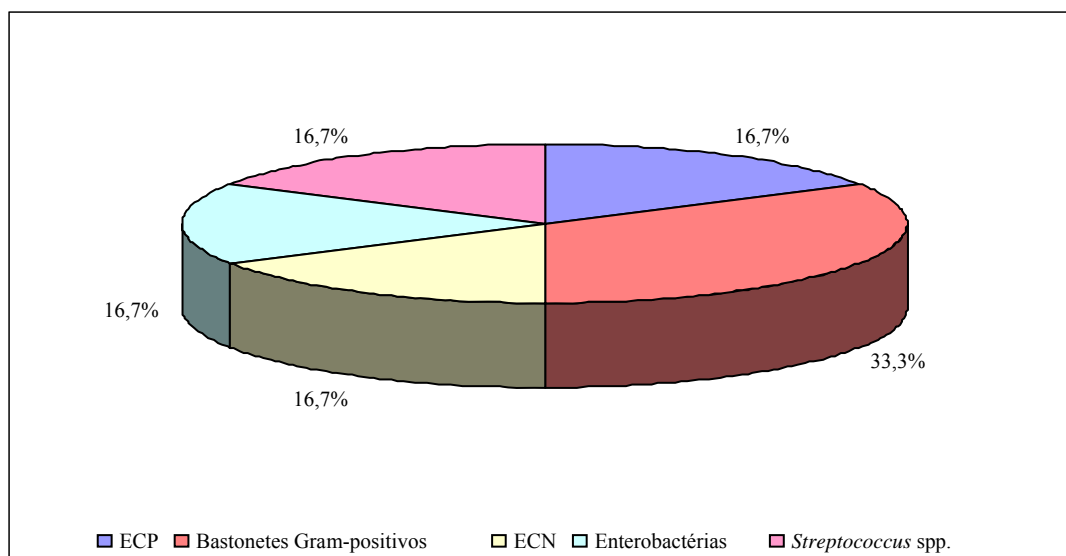
4.1.6 Identificação das amostras de infecções da cavidade oral

Dos espécimes coletados da cavidade oral de 12 cães com doença periodontal foram obtidos seis isolados bacterianos. Foram identificados os seguintes agentes: *Corynebacterium* spp., *Listeria* spp., *S. intermedius*, *S. xylosum*, *Streptococcus* spp. β -hemolíticos e *P. mirabilis* correspondendo a 16,6% (1/6) dos isolados, respectivamente (Gráfico 05).

Braga et al. (2005) analisaram a microbiota de 12 cães saudáveis e 17 com doença periodontal e isolaram 236 espécies bacterianas aeróbias. Os autores relataram o isolamento de *S. intermedius* em 1,7% dos isolados, ECN em 12,3% e as espécies isoladas foram: *S. xylosum*, *S. saprophyticus*, *S. epidermidis*, *S. homini* e *S. saccharolyticus*. *Corynebacterium* spp. correspondeu à 5,5% e *Streptococcus* β -hemolíticos à 2,5% dos isolados. Os autores isolaram diversos bastonetes Gram-negativos em 27,7% dos isolados e espécies identificadas foram *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp..

No presente estudo, *Listeria* spp. foi isolada de um animal que apresentou lesões periodontais e abscessos gengivais e que também apresentou um quadro crônico de pneumonia com secreção nasal mucopurulenta, alteração dos movimentos respiratórios e presença de líquido na cavidade pleural. Esse patógeno pode ter causado uma infecção oportunista facilitada pelo desequilíbrio da microbiota oral e a contaminação pode ter sido associada à condição higiênico-sanitária de local de alojamento dos cães. Segundo Hirsh e Zee (2003) *Listeria* spp. está envolvida em processos necrotizantes, abortos, septicemias e formação de microabscessos.

Gráfico 06. Perfil da distribuição dos grupos bacterianos isolados a partir de 12 casos de doença periodontal.



4.1.7 Identificação das amostras de infecções da conjuntiva ocular

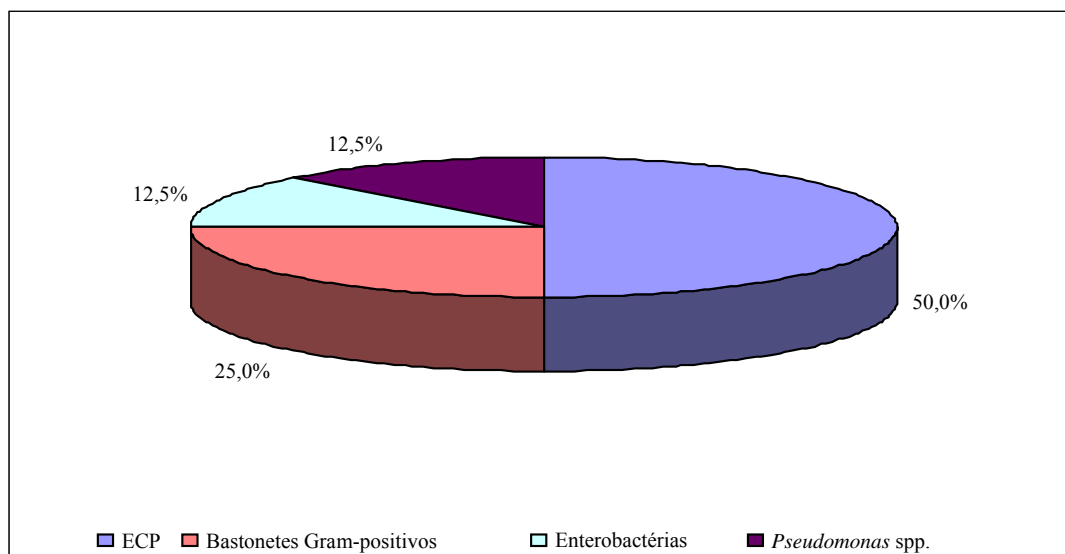
Foram obtidos oito isolados bacterianos a partir de 13 espécimes de cães com alterações patológicas da conjuntiva ocular. Dentre esses, 50% (4/8) dos isolados corresponderam à ECP, 25% (2/8) dos isolados corresponderam à bastonetes Gram-

positivos, e 12,5% (1/8) foram enterobactérias e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente (Gráfico 07).

As espécies de *Staphylococcus* foram representadas por *S. intermedius* (2/8) e *S. aureus* subsp. *aureus* (2/8). Dentre as enterobactérias, foi obtido um isolado identificado como *Serratia liquefaciens* e dentre os bastonetes Gram-positivos, dois isolados corresponderam à *Listeria* spp.. Andrade et al. (2002) investigaram a microbiota conjuntival de 46 cães sadios durante diferentes estações climáticas. No verão os autores reportaram o isolamento de *S. aureus* em 95% dos isolados (n=19) e no inverno foi reportado o isolamento de *S. aureus* em todos os isolados (n=20), *S. intermedius* e *S. epidermidis* em 10% dos isolados (n=2), *Bacillus* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp. em 5% dos isolados (n=1). Os autores apontaram para o potencial patogênico dessas espécies bacterianas diante da perda da integridade da mucosa, e para fato de que o uso prolongado de antimicrobianos tópicos pode destruir a microbiota saprófita e proporcionar o crescimento excessivo de bactérias patogênicas.

O presente estudo isolou *Listeria* spp. em amostras de cães com uveíte traumática que foram agredidos por um cão com a cavidade oral também contaminada por esse agente.

Gráfico 07. Perfil da distribuição dos grupos bacterianos isolados a partir de oito casos de infecções da conjuntiva ocular.



4.2 Perfil de Suscetibilidade dos Isolados aos Antibióticos de Eleição

A resistência antimicrobiana é um problema complexo que envolve inúmeras espécies bacterianas, mecanismos de desenvolvimento e transferência de resistência, assim como diferentes reservatórios. Bactérias resistentes selecionadas através da administração de antimicrobianos nos animais podem alcançar hospedeiros humanos e trocar seus genes de resistência com outras bactérias da microbiota humana, ou vice-versa (DAVISON, 1999). Além disso, o uso indiscriminado de agentes antimicrobianos para tratamento tanto de infecções em animais quanto de uso humano contribui ainda mais com esse quadro (NORMAND et al., 2000).

O hábito de prescrever terapia antimicrobiana sem prévia identificação do agente tem contribuído significativamente para a disseminação das cepas resistentes. Aarestrup, (2001) em trabalho desenvolvido na Dinamarca concluíram que é possível reduzir a ocorrência de resistência antimicrobiana quando a pressão seletiva, no caso o uso indiscriminado de antibióticos, é removida.

O presente trabalho avaliou o perfil de suscetibilidade através do tamanho, em milímetros, da área de inibição dos antibióticos. Os isolados provenientes de infecções da cavidade oral, mucosa ocular e trato respiratório inferior foram excluídos dessa análise por apresentarem uma amostragem baixa (n<10).

4.2.1 Perfil de suscetibilidade dos isolados de otite externa canina aos antimicrobianos de eleição

Alterações patológicas do conduto auditivo externo são comumente encontradas em cães, e casos de doença recidivante permanecem como fatores limitantes aos avanços terapêuticos na conduta clínica veterinária. Diante destes fatos, a identificação dos microrganismos envolvidos nesta doença e a determinação dos respectivos perfis de suscetibilidade a antimicrobianos são de importante relevância no sucesso do tratamento clínico (Tabela 01). Nos antibiogramas dos 23 isolados de *Staphylococcus* spp. foi observado um baixo percentual de resistência à gentamicina, cloranfenicol e ampicilina+sulbactam, que correspondeu a 4,3% (1/23) dos isolados, respectivamente e um percentual de 8,7% (2/23) de resistência à cefalotina e cefotaxina (Gráfico 08).

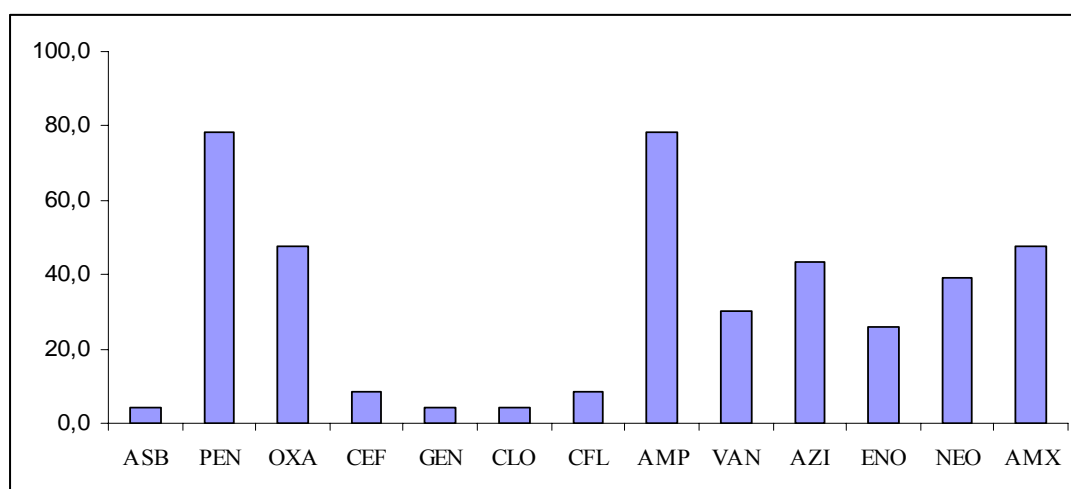
Tabela 02. Perfil de resistência dos isolados obtidos a partir de otite externa canina.

Antimicrobianos avaliados (nº de isolados resistentes)													
	CTX	OXA	VAN	PEN	ASB	GEN	AMP	ENO	CFL	NEO	CLO	AMX	AZI
<i>S. intermedius</i> (n=13)	1	5	3	11	0	0	10	2	1	5	1	6	5
<i>S. aureus aureus</i> (n=4)	0	2	1	3	0	0	3	2	0	2	0	2	2
<i>S. schleiferi</i> (n=2)	0	0	1	1	0	0	2	1	0	1	0	1	1
<i>S. xylosus</i> (n=4)	1	4	2	3	1	1	3	1	1	1	0	2	2
% de Resistência*	8,7	47,8	30,4	78,3	4,3	4,3	78,3	26,1	8,7	39,1	4,3	47,8	43,5
<i>Micrococcus</i> (n=7)	0	1	0	3	0	0	1	2	0	1	0	2	0
% de Resistência**	0,0	14,3	0,0	42,9	0,0	0,0	14,3	28,6	0,0	14,3	0,0	28,6	0,0
<i>P. aeruginosa</i> (n=7)	3	7	4	7	1	0	7	1	4	3	2	6	3
<i>E. coli</i> (n=3)	0	3	3	2	0	0	3	1	0	3	2	3	0
<i>P. mirabilis</i> (n=3)	0	3	3	3	0	0	3	1	1	0	0	2	1
<i>S. marcescens</i> (n=3)	0	3	2	3	0	0	2	2	0	2	0	1	3
% de Resistência***	18,8	100,0	75,0	93,8	6,3	0,0	93,8	31,3	31,3	50,0	25,0	75,0	43,8

* Percentual de resistência em *Staphylococcus* spp., ** Percentual de resistência em *Micrococcus* spp., *** Percentual de resistência dos bastonetes Gram-negativos.

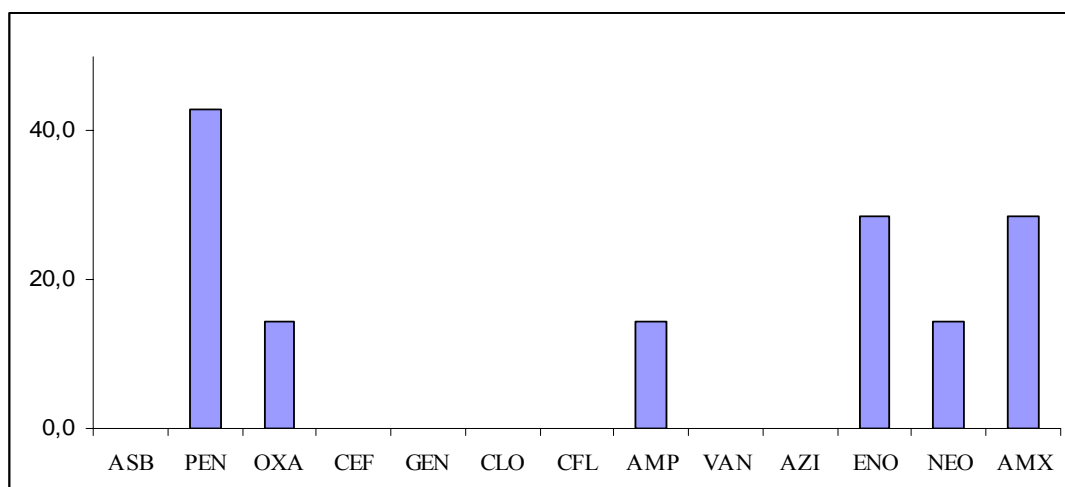
O percentual de resistência à vancomicina foi 30,4% (7/23). Em trabalhos anteriores, a vancomicina apresentou eficiência em torno de 100% frente aos isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de animais com otite externa (SHUHAIBAR et al, 1992; TAHNKIWALE et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2006). Acredita-se que o aumento dessa resistência ao passar dos anos está associado à constante exposição a vancomicina e sucessiva pressão seletiva ocasionando na transferência do gene de resistência entre as cepas (DOMARACKI et al., 1998; SIERADZKI ; TOMAZ, 1997).

Gráfico 08. Percentuais de resistência dos 23 isolados de *Staphylococcus* spp. frente aos antimicrobianos testados.



Foi detectado um percentual de 42,9% (3/7) de resistência à penicilina por *Micrococcus* spp., corroborando com trabalhos que avaliaram a resistência em amostras humanas, apontando para o fato de que é possível ocorrer a resistência aos β -lactâmicos (Gráfico 09). No passado, acreditava-se não ser importante o estudo do índice de resistência neste gênero, considerando-o insignificante quando comparado ao encontrado para os estafilococos coagulase-positivos e coagulase-negativos (KIM et al., 1990; ADANG et al., 1992). No entanto, estudos atuais relatam o aumento significativo de infecções causadas por espécies de *Micrococcus*. Oudiz et al. (2004) identificaram 14 isolados de *M. luteus* em 192 pacientes com infecção pulmonar arterial associada a cateter intravenoso. Embora, a importância epidemiológica dessa espécie como doadora de genes de resistência também permaneça pouco elucidada, trabalhos recentes relatam o envolvimento de *M. luteus* na veiculação de plasmídeos de resistência em humanos (LIEBL et al., 2002).

Gráfico 09. Percentuais de resistência dos sete isolados de *Micrococcus* spp. frente aos antimicrobianos testados.



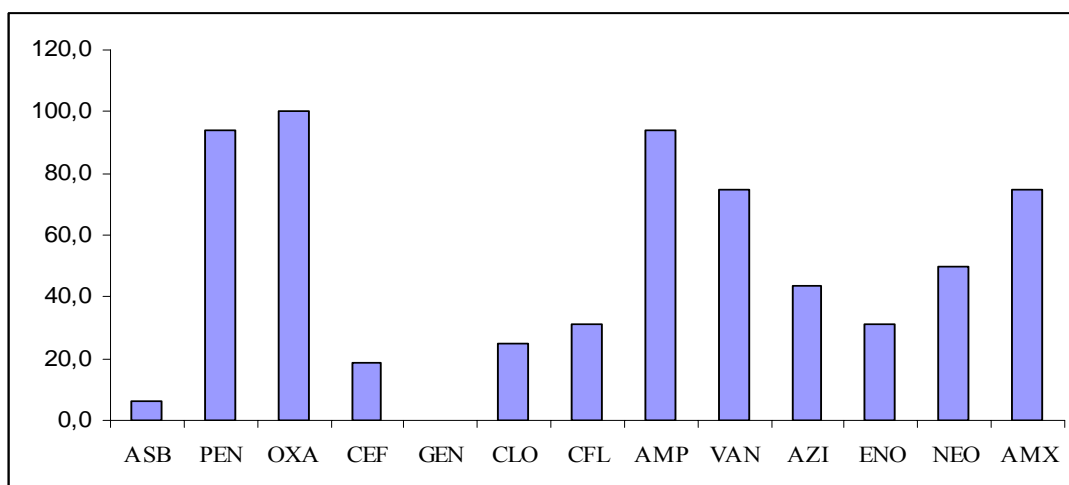
Os setes isolados de *Pseudomonas aeruginosa* não apresentaram resistência a gentamicina, e percentuais de 14,3% (1/7) à enrofloxacina e à associação ampicilina+sulbactam, respectivamente. Para cefalotina e vancomicina, foram obtidos percentuais de resistência em 57,1% (4/7) dos isolados e para cefotaxima, neomicina e cloranfenicol 42,8% (3/7) dos isolados foram resistentes. Em relação aos β -lactâmicos, valores expressivos de resistência (100%) foram observados para oxacilina, ampicilina e penicilina G. Esses resultados corroboram com Barrasa et al. (2000) que avaliaram 18 isolados de *P. aeruginosa* de 425 cães com otite externa crônica e detectaram um percentual de resistência de 16,7% para gentamicina, 27,7% para enrofloxacina e 38,9% para cefotaxima. Um outro estudo que investigou o perfil de suscetibilidade de *P. aeruginosa* em cães otopatas relatou percentuais diferentes dos observados no presente estudo. O percentual de resistência expresso em relação a enrofloxacina foi de 26,7%, à gentamicina foi de 46,7%, porém também foram detectados percentuais de resistência aos β -lactâmicos em torno de 90% (OLIVEIRA et al., 2005).

Em relação às enterobactérias, todos os isolados de *P. mirabilis*, *E. coli* e *S. marcencens* foram sensíveis à gentamicina, cefotaxima e ampicilina+sulbactam. Todos os isolados de *P. mirabilis* foram totalmente sensíveis à neomicina, cefoxitina, gentamicina, ampicilina+sulbactam e cloranfenicol. Novamente foi detectado elevado percentual de resistência aos β -lactâmicos: oxacilina, penicilina G, ampicilina e amoxicilina (Gráfico 10). Os resultados corroboram com Hariharan et al. (2006) que realizaram um estudo retrospectivo durante um período de cinco anos e avaliaram o perfil de suscetibilidade de 178 isolados de *E. coli* provenientes de cães otite externa canina. Esses autores detectaram um baixo percentual de resistência à enrofloxacina (2%) e cloranfenicol (3%), percentual de 21% de resistência à ampicilina e 99% à penicilina. No mesmo estudo também foram avaliados os perfis de suscetibilidade de isolados de *Proteus* spp. e foi detectado baixo percentual de resistência à enrofloxacina (2%), ampicilina (14%) e cloranfenicol (15%), e um percentual mais elevado (36%) para penicilina. Colombini et al. (2000) avaliaram o perfil de suscetibilidade de 18 isolados de *Proteus* spp. a partir de 235 espécimes de otite

média canina e detectaram um baixo percentual de resistência à ampicilina (6%), cloranfenicol (17%) e gentamicina (17%) e um percentual expressivo de resistência à penicilina (39%). Os autores também relataram que os 18 isolados foram totalmente sensíveis à enrofloxacina e totalmente resistente à oxacilina.

A azitromicina apresentou um percentual de resistência de 43,5% (10/23) dos isolados de *Staphylococcus* spp. e 43,8% (7/16) dos bastonete Gram-negativos. Esse fármaco tem sido amplamente utilizado no tratamento da otite externa aguda e crônica e os percentuais de resistência observados podem estar associados ao seu uso indiscriminado. Os dados a respeito do perfil de atividade desse antimicrobiano frente a isolados provenientes de animais são escassos, sendo a maioria destes provenientes de avaliações realizadas a partir de isolados humanos. Dune et al. (2003) avaliaram 67 isolados de cocos Gram-positivos obtidos de casos de otite aguda em crianças e relataram que a azitromicina foi eficiente no tratamento desta infecção.

Gráfico 10. Percentuais de resistência dos 16 isolados de Bastonetes Gram-negativos frente aos antimicrobianos testados.



4.2.2 Perfil de suscetibilidade dos isolados de infecções da pele aos antimicrobianos de eleição

Os 21 isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de infecções da pele de cães foram totalmente sensíveis à associação ampicilina+sulbactam e ceftriaxona, 4,8% (1/21) dos isolados apresentaram um baixo percentual de resistência a cefalexina, 9,5% (2/21) foram resistentes à cloranfenicol e vancomicina e 14,3% (3/21) destes foram resistentes à ciprofloxacina. Os demais fármacos avaliados apresentaram percentuais de resistência de 19,0% (4/21) para oxacilina e enrofloxacina, respectivamente, 23,8% (5/21) para clindamicina, e percentuais de resistência de 81,0% (17/21) à ampicilina, 85,7% (18/21) à penicilina G e 90,5% (19/21) à eritromicina (Tabela 02) (Gráfico 11).

Medeleau et al. (1986) analisaram o perfil de suscetibilidade de 215 isolados de *Staphylococcus* obtidos de 210 espécimes de pioderma canino e detectaram sensibilidade dos isolados frente à cefalexina e oxacilina e resistência significativa à ampicilina, penicilina

G e tetraciclina. Os autores também apontaram para o aumento da resistência à cloranfenicol, clindamicina e eritromicina. O uso indiscriminado da ampicilina no tratamento das infecções estafilocócicas pode ter limitado o espectro de ação desse antimicrobiano. Em 1978, Wierup ao avaliar 35 isolados de *Staphylococcus* spp. observou um percentual de resistência à ampicilina em 16,2%. Atualmente, inúmeros trabalhos vêm relatando a disseminação de cepas resistentes à β -lactâmicos, nas quais a produção de β -lactamases e modificação das PBPs são os mais importantes mecanismos de resistência relacionados (AARESTRUP, 2001).

Tabela 03. Perfil de resistência dos isolados obtidos de infecções da pele.

Antimicrobianos avaliados (nº de isolados resistentes)													
	CFX	OXA	VAN	PEN	ASB	AMP	CIP	ENO	CEF	CLO	ERI	CLI	AZI
<i>S. intermedius</i> (n=11)	0	2	2	9	0	8	1	2	0	0	10	2	5
<i>S. aureus aureus</i> (n=4)	1	1	0	3	0	3	0	1	0	0	3	1	2
<i>S. schleiferi</i> (n=2)	0	0	0	2	0	2	2	0	0	0	2	1	2
<i>S. hominis</i> (n=2)	0	0	0	2	0	2	0	0	0	1	2	1	2
<i>S. xylosus</i> (n=2)	0	1	0	2	0	2	0	1	0	1	2	0	0
% de Resistência*	4,8	19,0	9,5	85,7	0,0	81,0	14,3	19,0	0,0	9,5	90,5	23,8	52,4
<i>E. coli</i> (n=2)	0	2	2	2	1	2	1	1	2	1	2	2	2
<i>Proteus</i> spp. (n=3)	2	3	3	3	1	3	0	1	1	1	3	3	3
<i>Y. enterocolitica</i> (n=2)	1	2	2	2	0	2	0	0	1	1	2	2	2
<i>S. marcescens</i> (n=3)	3	2	2	3	0	3	1	1	2	1	3	3	3
<i>C. freundii</i> (n=1)	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
<i>P. aeruginosa</i> (n=1)	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1
% de Resistência**	66,7	91,7	91,7	91,7	16,7	91,7	16,7	33,3	58,3	33,3	100,0	100,0	100,0

* Percentual de resistência em *Staphylococcus* spp., ** Percentual de resistência dos bastonetes Gram-negativos.

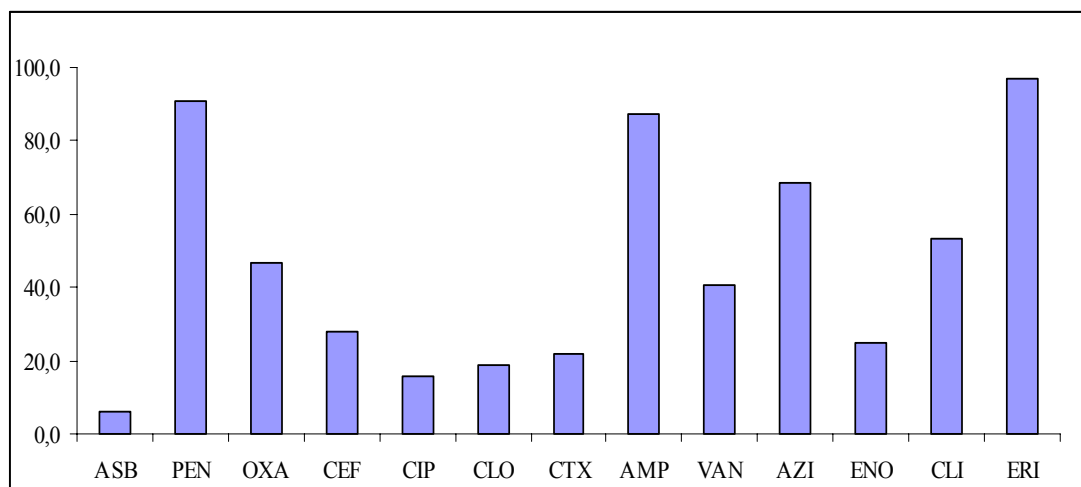
Pellerin et al. (1998) avaliaram o perfil de suscetibilidade de 131 isolados de *S. intermedius* obtidos a partir de amostras de pele de cães sadios e com pioderma e relataram que 95% (124/131) dos isolados foram suscetíveis à oxacilina, cefalexina, amoxicilina mais ácido clavulânico, gentamicina, enrofloxacina e marbofloxacina. Da mesma forma, Šeol (2005) avaliou o perfil de suscetibilidade de 50 isolados de *S. intermedius* a partir de amostras de pioderma e otite externa canina e relatou 2% de resistência as fluoroquinolonas, ciprofloxacina, enrofloxacina e marbofloxacina. *Staphylococcus* spp. são comumente isolados a partir da pele de cães sadios ou com alterações patológicas e exibem um padrão de resistência antimicrobiana muito variado, geralmente associado a mecanismos genéticos de transferência, como plasmídeos. O aumento da frequência de resistência sugere que a

prescrição empírica de antimicrobianos pode contribuir com o aumento da prevalência de cepas resistentes e multirresistentes.

Os 12 isolados de bastonetes Gram-negativos apresentaram percentual de resistência de 16,7% (2/12) à ampicilina+sulbactam e ciprofloxacina, respectivamente e 33,3% (4/12) de resistência à enrofloxacina e cloranfenicol. O percentual de resistência a ceftriaxona foi de 66,7% (8/12) e para oxacilina, vancomicina, penicilina G, ampicilina foi de 91,7% (11/12), respectivamente e todos os isolados foram resistentes a eritromicina e clindamicina (12/12). Um estudo retrospectivo realizado durante cinco anos em Hospitais Veterinários da Suécia avaliou o perfil de suscetibilidade dos bastonetes Gram-negativos e detectou baixo percentual de resistência à associação ampicilina+sulbactam e uma resistência significativa ao macrolídeo, eritromicina (HOLM et al., 2002).

A azitromicina apresentou um percentual de resistência de 52,4% (11/21) frente aos isolados de *Staphylococcus* spp. e 100% (12/12) de resistência às espécies de bastonetes Gram-negativos isolados, conforme previamente relatado na literatura. Esses resultados apontam para o fato de que o desenvolvimento de resistência em isolados animais pode estar ocorrendo através de mecanismos de transferência de genes interespecíficos e intraespecíficos, possivelmente pelo uso corrente deste fármaco na medicina humana, tornando-se indispensável à realização de testes de suscetibilidade antes de sua indicação como opção terapêutica veterinária.

Gráfico 11. Percentuais de resistência dos isolados provenientes de infecções da pele.



4.2.3 Perfil de suscetibilidade dos isolados de infecções do trato urinário aos antimicrobianos de eleição

Foram obtidos apenas três isolados de *Staphylococcus* spp. das amostras de cães com doença urinária. Todos estes foram sensíveis à ceftriaxona, ampicilina+sulbactam, norfloxacina, enrofloxacina, gentamicina, azitromicina e nitrofurantoína e foram totalmente resistentes à penicilina G, oxacilina e ampicilina. Dos 17 isolados de bastonete gram-negativos, todos foram sensíveis à gentamicina e os menores percentuais de resistência apresentados foram: 25,3% (4/17) para ampicilina+sulbactam e azitromicina, respectivamente, 35,3% (6/17) para nitrofurantoína, ciprofloxacina, norfloxacina e

enrofloxacin, respectivamente e 41,2% (7/17) para ceftriaxona. Todos os isolados foram resistentes à oxacilina, penicilina G, vancomicina, e ampicilina, e 88,2% (15/17) foram resistentes à amoxicilina (Tabela 03) (Gráfico 12).

Çetin et al. (2003) examinaram amostras de urina de 100 cães com infecção do trato urinário e seus resultados assemelharam-se aos apresentados. O autor relatou 20% de resistência à gentamicina, ampicilina+sulbactam e nitrofurantoína, respectivamente e 40% de resistência à enrofloxacin em cinco isolados de *Staphylococcus* spp. Para os 25 isolados de bastonetes Gram-negativos estudados, foram relatados percentuais inferiores aos do presente estudo: 8% à gentamicina, 20% à ampicilina+sulbactam, 24% à enrofloxacin e 36% à nitrofurantoína. Mitra et al. (1994) avaliaram comparativamente o perfil de sensibilidade de 40 isolados bacterianos de infecção urinária canina e reportaram que os antimicrobianos mais eficientes foram norfloxacin, gentamicina, nitrofurantoína e ampicilina.

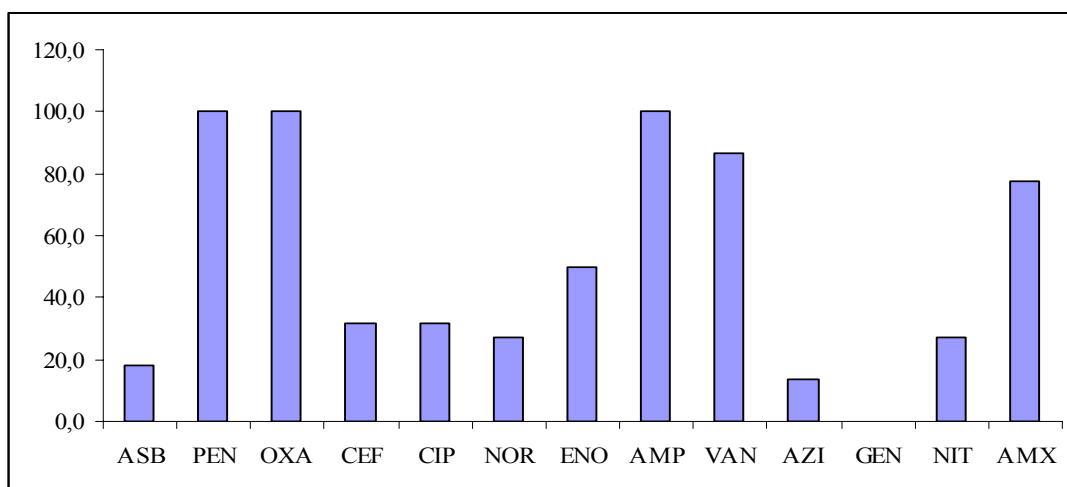
Os resultados indicam que o perfil de sensibilidade a antimicrobianos das bactérias isoladas de cães com infecções urinárias é variável, e que a azitromicina apresentou boa eficiência frente aos isolados avaliados, apontando para o fato que os agentes antimicrobianos devem ser selecionados com base na cultura bacteriológica e testes de suscetibilidade.

Tabela 04. Perfil de resistência dos isolados obtidos a partir de infecções do trato urinário.

	Antimicrobianos avaliados (n° de isolados resistentes)												
	CEF	OXA	VAN	PEN	ASB	GEN	AMP	ENO	CIP	NOR	NIT	AMX	AZI
<i>S. intermedius</i> (n=3)	0	3	1	3	0	0	3	3	0	0	0	2	0
% de Resistência*	0,0	100,0	33,3	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0	0,0	0,0	0,0	66,7	0,0
<i>E. coli</i> (n=6)	0	6	6	6	0	0	6	3	3	4	1	6	1
<i>Proteus mirabilis</i> (n=4)	3	4	4	4	2	0	4	1	0	0	3	4	1
<i>C. freundii</i> (n=3)	1	3	3	3	0	0	3	0	2	1	1	3	1
<i>Salmonella spp.</i> (n=1)	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0
<i>S. marcescens</i> (n=1)	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0
<i>Y. enterocolitica</i> (n=2)	1	2	2	2	1	0	2	1	0	1	0	1	1
% de Resistência**	41,2	100	100	100	23,5	0	100	35,3	35,3	35,3	35,3	88,2	23,5
<i>Corynebacterium</i> .(n=1)	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
<i>Listeria spp.</i> (n=1)	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0
% de Resistência***	0	100	50	50	0	0	100	100	50	0	0	0	0

* Percentual de resistência em *Staphylococcus* spp., ** Percentual de resistência dos bastonetes Gram-negativos, *** Percentual de resistência dos bastonetes Gram-positivos.

Gráfico 12. Percentuais de resistência dos 22 isolados provenientes de infecções do trato urinário frente aos antimicrobianos testados.



4.3 Avaliação do Perfil de Suscetibilidade à Azitromicina

4.3.1 Ensaios de Difusão em Disco

Primeiramente foi realizado o teste de difusão em disco para a avaliação do perfil de suscetibilidade dos isolados frente à azitromicina. Essa técnica é aplicada rotineiramente em laboratórios de microbiologia para análises de suscetibilidade devido ao seu baixo custo, fácil e rápida execução, além de apresentar resultados confiáveis. A literatura relata que diversos autores utilizaram essa metodologia como avaliação preliminar do perfil de atividade da azitromicina (PETERS et al., 1992; BLONDEAU, 2002; HANSEN et al., 2002). Retsema (1999) utilizaram a técnica de difusão em disco como triagem para detectar isolados resistentes à azitromicina e avaliar o desenvolvimento de resistência a diferentes macrolídeos, dentre estes a azitromicina. A sensibilidade é avaliada segundo o diâmetro da zona de inibição do crescimento bacteriano. De acordo com o padrão estabelecido por CLSI (2005), os halos de inibição da azitromicina correspondem à diâmetros ≤ 13 mm para isolados resistentes, ≥ 18 mm para sensíveis e o intervalo de 14-17 mm para isolados com grau de inibição intermediário (Figura 03). Esses dados resultaram de estudos realizados a partir de amostras humanas, desse modo, houve a necessidade da avaliação da suscetibilidade à azitromicina em isolados animais a fim de se obter um resultado coerente e que reflita valores reais para padronização dos limites interpretativos.

Nos resultados da técnica de difusão em disco foi possível detectar que, de um total de 107 isolados, 48,6% (52/107) foram resistentes à azitromicina. O percentual de resistência em *S. intermedius* correspondeu a 40% (12/30), em *S. aureus* foi de 55,6% (10/18), em ECN 50% (6/12) e para bastonetes Gram-negativos foi de 55,3% (27/50). Limitando a avaliação do perfil de suscetibilidade dos isolados provenientes dos diferentes processos infecciosos ao ensaio de difusão em disco, seria possível concluir que a azitromicina apresentou melhor percentual de atividade em relação à *Staphylococcus* spp. provenientes de casos de otite externa canina e para bastonetes Gram-negativos isolados de

casos de doença do trato urinário (Gráficos 10 e 12). Uma vez que este ensaio representa uma avaliação preliminar que, no entanto é de uso rotineiro no diagnóstico clínico, ensaios mais detalhados foram realizados no intuito de validar estes resultados.

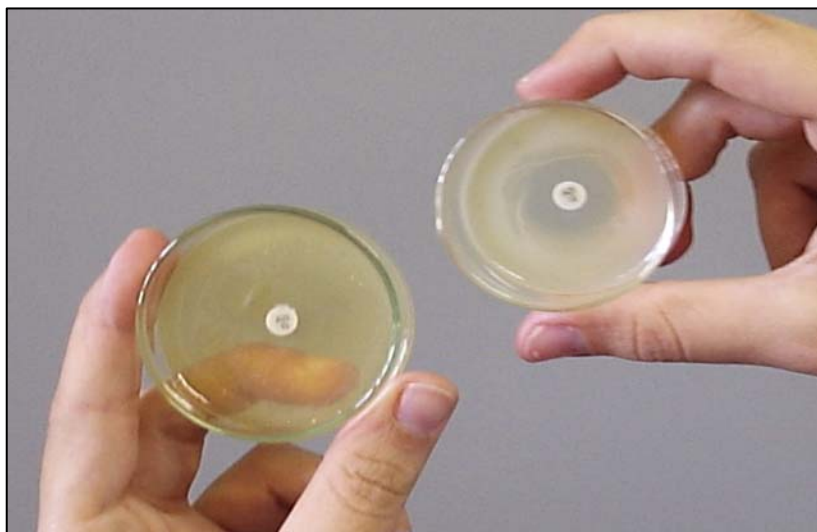


Figura 03. Teste de Difusão em Disco. (R) Isolado bacteriano resistente à azitromicina, (S) isolado bacteriano sensível á azitromicina.

4.3.2 Ensaio de Microdiluição em Caldo

O teste de microdiluição em caldo é considerado um padrão ouro para detecção fenotípica da resistência, sendo a metodologia mais utilizada em investigações que avaliaram a atividade *in vitro* e perfil de resistência de isolados bacterianos frente a azitromicina. O CLSI (2005) preconiza a utilização desse teste para predição de resistência e estabeleceu limites de CIM $\geq 8\mu\text{g/mL}$ de azitromicina para inibição do crescimento de alguns microrganismos, entre estes, *Staphylococcus* spp. Esses limites interpretativos são preconizados como padrão de escolha do antimicrobiano ideal para o tratamento de infecções humanas, assim os isolados provenientes de animais também foram submetidos a essa técnica e os limites interpretativos tomados de acordo com o padrão do CLSI (2005) (Figura 04).

Dessa maneira, no presente estudo, um total de 53,3% (16/30) dos isolados de *S. intermedius*, 50% (9/18) de *S. aureus*, 66,7% (8/12) de ECN e 90% dos bastonetes Gram-negativos apresentaram valores de CIM superiores ou iguais ao limite de resistência padronizado.

Em relação aos isolados de estafilococos avaliados, os percentuais de resistência obtidos foram superiores aos encontrados na literatura, e contradizem a idéia de elevada eficácia da azitromicina frente a este gênero bacteriano (MASKELL et al., 1990; SLANEY et al., 1990; NEU, 1991; RETSEMA, 1999). A maioria dos estudos, por avaliar isolados humanos, considera *S. aureus* como patógeno modelo para a determinação da CIM e não avalia o perfil de atividade dessa droga em relação a outras espécies desse gênero. No presente estudo, *S. aureus* esteve presente em apenas 30% dos isolados, sendo *S. intermedius* a espécie que prevaleceu em 50% dos isolados e as espécies de ECN em 20%, ressaltando a importância de outras espécies de *Staphylococcus* spp. na etiologia de infecções de animais

de companhia e para a determinação do perfil de atividade antimicrobiana diferenciado entre as espécies.

O expressivo percentual de resistência observados nos bastonetes Gram-negativos pode estar diretamente relacionado à baixa eficácia do antibiótico frente a microrganismos reconhecidamente resistentes, como *Pseudomonas* spp., *P. mirabilis*, *S. marcencens*, *C. freundii* e *Enterobacter* spp., que no presente estudo, corresponderam as espécies mais prevalentes (NEU, 1991; RETSEMA, 1999).

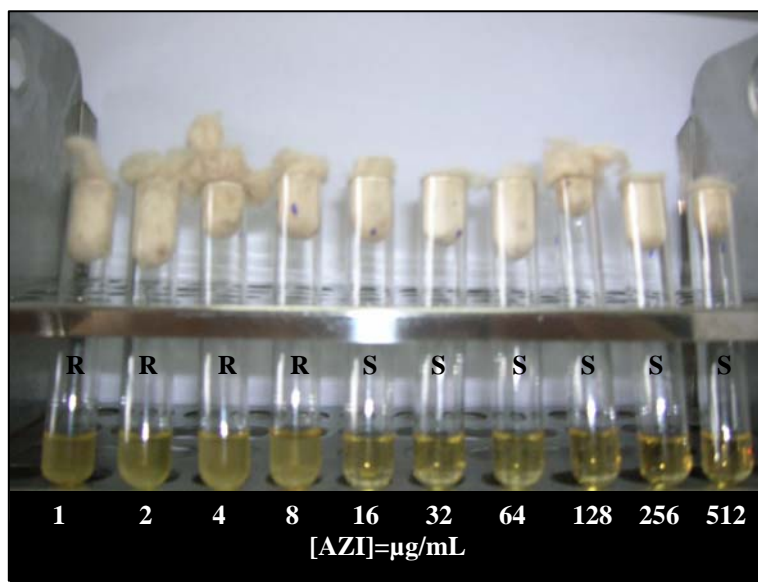


Figura 04. Teste de Microdiluição em Caldo. (R) Resistente, (S) Sensível.

4.3.3 Ensaio de Diluição em Ágar

Outra metodologia aplicada para a determinação *in vitro* do perfil de atividade da azitromicina foi a técnica da diluição em ágar. Enquanto o teste de diluição em caldo utiliza diversos tubos contendo diluições diferentes para análise de apenas um isolado, neste teste o antimicrobiano é incorporado ao ágar em diferentes concentrações, sendo possível a análise de até 30 isolados em apenas uma placa de Petri (NCCLS/CLSI, 2003) (Figura 05). Portanto, tal técnica representa uma alternativa prática e de baixo custo para a avaliação do perfil de suscetibilidade antimicrobiana, desde que seus resultados permitam uma boa correlação com a técnica da diluição em caldo, já citada como padrão neste tipo de análise. Maskel et al. (1990) também utilizaram este procedimento para avaliação da atividade *in vitro* da azitromicina e eritromicina contra cocos Gram-positivos, *Haemophilus influenzae* e anaeróbios. Terasawa (2006) também, utilizou a técnica de diluição em ágar para determinar o perfil de resistência de isolados de ECN frente diversos antimicrobianos, incluindo antimicrobianos da classe dos macrolídeos.

Os mesmos valores da CIM para a técnica de microdiluição em caldo foram utilizados como parâmetro para avaliação do percentual de isolados resistentes. Os resultados obtidos apresentaram percentuais de resistência expressivos em relação à outra técnica utilizada. Dos isolados de *S. aureus* 88,9% (16/18) foram resistentes, para *S.*

intermedius e ECN foi detectado um percentual de resistência de 83,3% (25/30) e 75% (9/12), respectivamente. O percentual de resistência dos bastonetes Gram-negativos permaneceu inalterado, em relação ao teste de microdiluição em caldo.

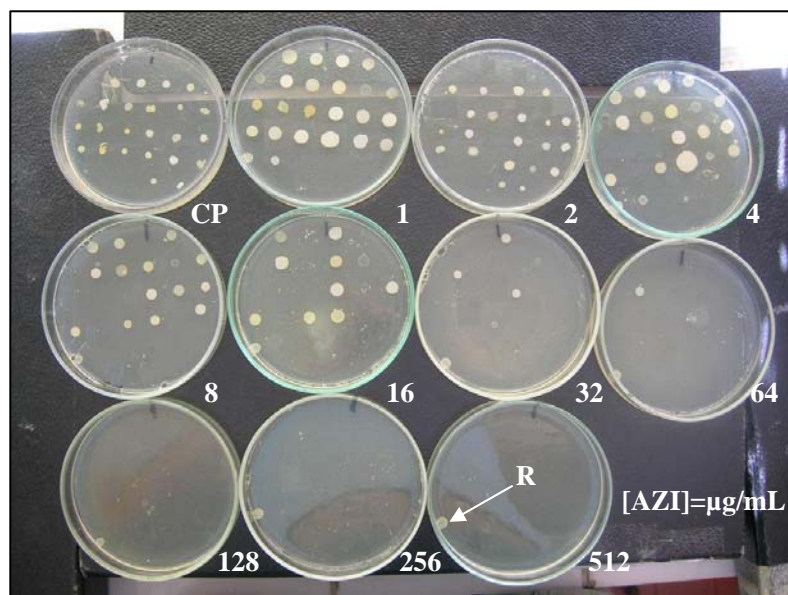


Figura 05. Teste de diluição Ágar. CP: Controle positivo, R: Resistente.

4.3.4 Análise Comparativa dos Testes de Suscetibilidade

Os resultados de determinação da resistência à azitromicina, obtidos através das três técnicas, foram submetidos uma análise estatística multivariada (correlação canônica) para estabelecer a correspondência entre estes de forma a determinar quais isolados foram realmente resistentes (HAIR et al., 2005). Os isolados que apresentaram *scores* de correspondência acima de 0,5 são considerados potencialmente resistentes, dessa maneira 45% dos isolados de *Staphylococcus* spp. e 65,4% dos bastonetes Gram-negativos, podem ser considerados verdadeiramente resistentes e apresentaram grau de correspondência de 86,6% e 91,3%, respectivamente (Anexo 04). Dessa forma, comparando os resultados da análise de correspondência com os percentuais de resistência em *Staphylococcus* spp. detectados pelos diferentes testes, observa-se que tanto a difusão em disco quanto a microdiluição em caldo (48,6% e 50% de isolados resistentes, respectivamente) foram os testes que mais se aproximaram do percentual real de isolados resistentes. Em relação os bastonetes Gram-negativos, 65,4% dos isolados apresentaram grau de correspondência de 91,3%. Após a comparação dos resultados da análise de correspondência com os percentuais de resistência em bastonetes gram-negativos detectados pelos diferentes testes, observa-se também, que tanto a difusão em disco quanto a microdiluição em caldo (55,3% e 72,7% de isolados resistentes, respectivamente) foram os testes que mais se aproximaram do percentual real de isolados resistentes.

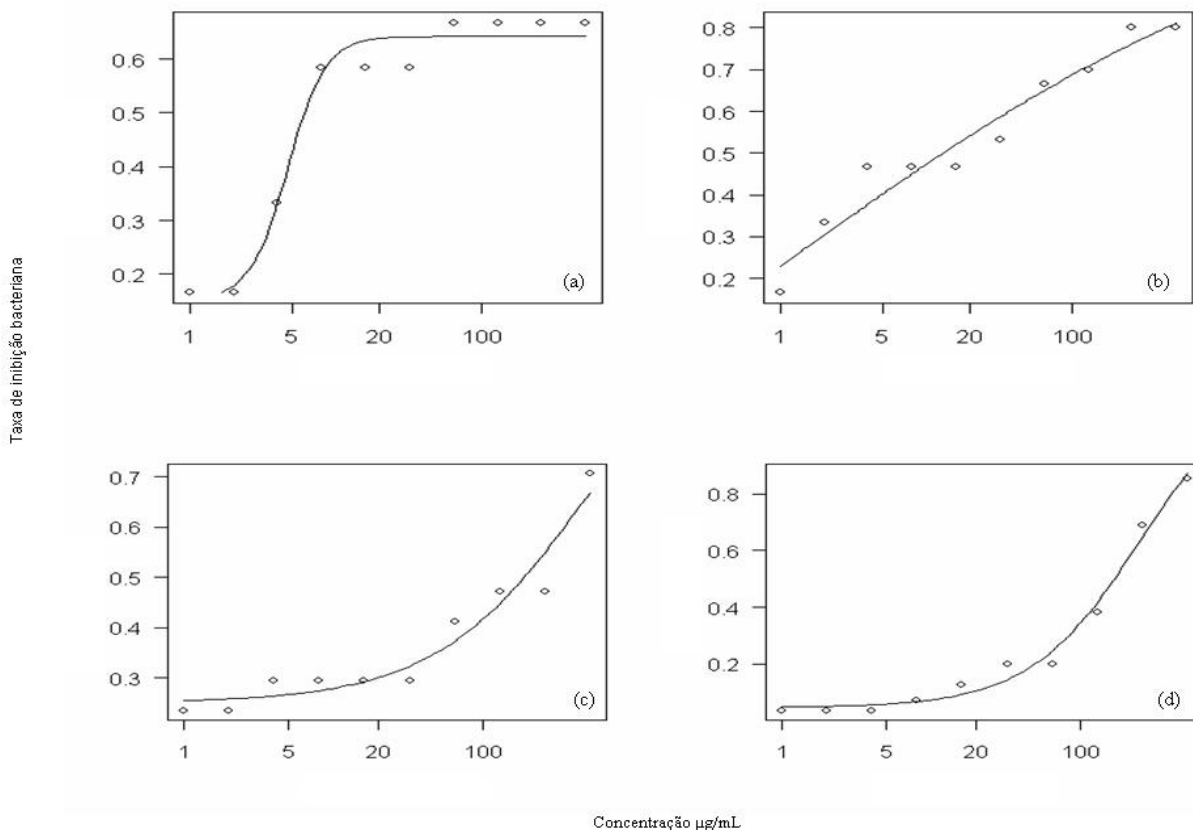
4.3.5 Determinação da CIM para azitromicina

Diversos estudos avaliaram a CIM_{50/90} em isolados obtidos a partir de processos infecciosos humanos, porém existe uma ausência de dados em relação a isolados obtidos de animais. Essa questão merece maior atenção uma vez que a azitromicina é uma alternativa terapêutica e para tanto requer dados confiáveis que justifiquem sua aplicação de forma a evitar a emergência de resistência em animais de companhia. O presente estudo utilizou um modelo estatístico de regressão logística para determinar a CIM dos isolados bacterianos submetidos à concentrações crescentes de azitromicina. Dessa maneira, os valores de resistência obtidos pelas técnicas de microdiluição em caldo e diluição em ágar foram utilizados como variáveis para determinar o coeficiente de regressão seguindo um modelo dose-resposta (concentração de azitromicina x inibição bacteriana).

A determinação da CIM₅₀ para azitromicina obtida a partir da técnica de microdiluição em caldo para os isolados de *S. aureus* apresentou valores de 4,0 µg/mL, para *S. intermedius* foi de 1,0 µg/mL e para ECN valores superiores a 512 µg/mL. A CIM₉₀ apresentou valores de 8,0 µg/mL para *S. aureus* e valores maiores que 512 µg/mL para *S. intermedius* e ECN, respectivamente (Anexo 02). O perfil de atividade da azitromicina foi diferenciado entre as espécies de *Staphylococcus* spp. (Gráfico 13), no caso de *S. aureus* um pequeno aumento da concentração do antibiótico foi capaz de aumentar significativamente a atividade inibitória da azitromicina (taxa de morte). Em relação à *S. intermedius* a taxa de morte bacteriana aumentou proporcionalmente com o aumento da concentração de azitromicina e para ECN valores inibitórios significativos só foram detectados em concentrações muito altas desse fármaco. De acordo com os resultados da avaliação *in vitro* pode-se afirmar que a azitromicina atua eficazmente contra *S. aureus* e *S. intermedius*, porém em ECN o mesmo resultado só é alcançado em concentrações maiores que 512µg/mL. A diferença entre os valores da CIM entre isolados humanos e animais aponta para o fato de que o perfil de atividade dessa droga varia entre espécies bacterianas e seus hospedeiros, destacando a importância da prévia identificação do agente etiológico, na prevenção das falhas de tratamento e desenvolvimento da resistência. Outra consideração importante pode ser observada em relação aos valores da CIM entre as diferentes espécies de *Staphylococcus* spp., visto que muitas indicações terapêuticas consideram *S. aureus* como agente etiológico das infecções e adotam valores de CIM correspondentes aos dessa espécie.

Em relação aos bastonetes Gram-negativos os resultados da CIM_{50/90} detectados pela técnica de microdiluição em caldo foram de 256µg/mL e >512µg/mL (Gráfico 13). Comportamento semelhante aos dos ECN, onde concentrações muito altas foram necessárias para uma atividade inibitória satisfatória. No entanto, os altos valores observados são esperados devido à prevalência de enterobactérias e *Pseudomonas* spp. reconhecidamente resistentes a azitromicina.

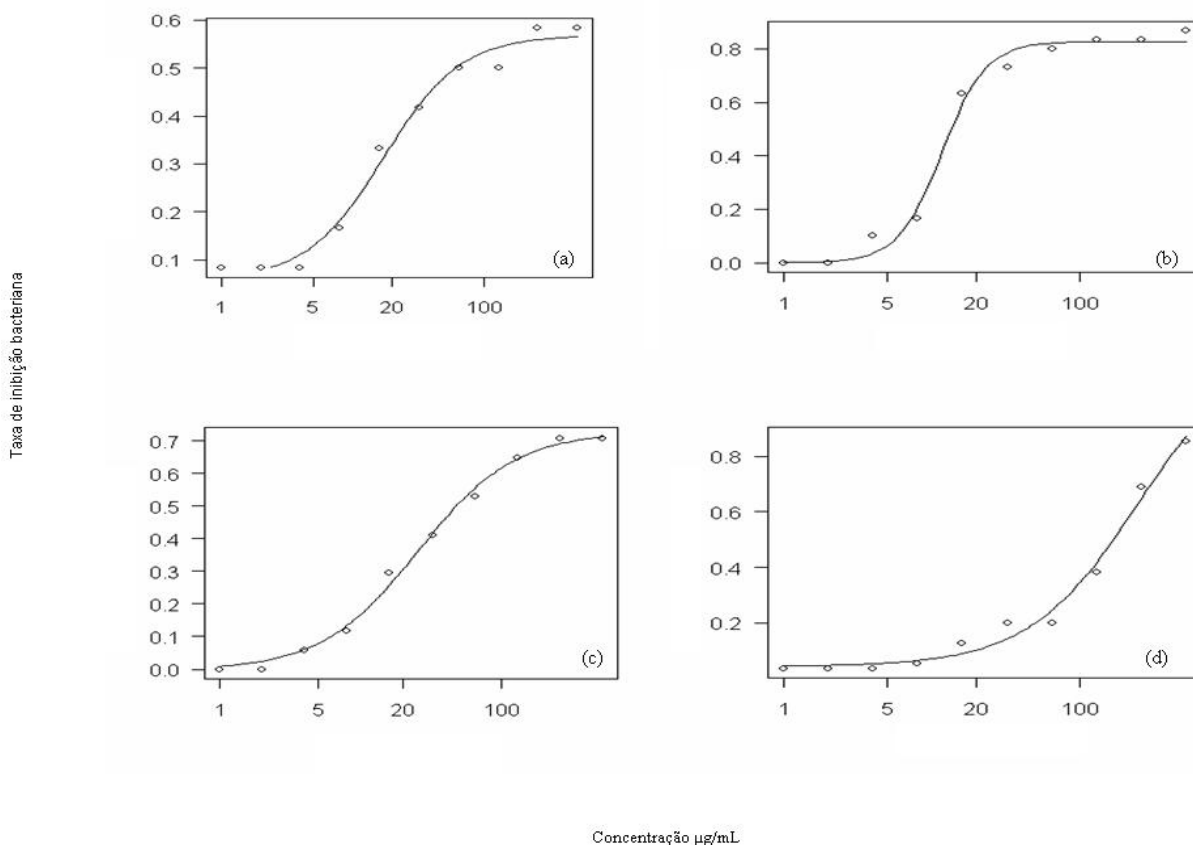
Gráfico 13. Perfil de atividade da azitromicina segundo resultados obtidos no teste de microdiluição em caldo.



Modelo dose-resposta (concentração de azitromicina x inibição bacteriana) dos isolados, (a) *S. aureus*, (b) *S. intermedius*, (c) ECN, (d) bastonetes Gram-negativos, avaliados através do teste de microdiluição em caldo.

A CIM_{50/90} também foi avaliada através da técnica de diluição em ágar e os resultados obtidos foram: 16µg/mL e 64µg/mL para *S. aureus*, 16µg/mL e 32µg/mL para *S. intermedius*, 32µg/mL e 128µg/mL ECN. O perfil inibitório da azitromicina manteve-se semelhante ao observado na técnica de microdiluição em caldo, porém no caso de *S. intermedius* pôde-se observar que a partir de uma determinada concentração de azitromicina a taxa de inibição permanece constante (Gráfico 14). Para os bastonetes Gram-negativos a CIM_{50/90} foi de 256µg/mL e >512µg/mL, e o perfil de inibição só atinge níveis significativos em altas concentrações de azitromicina (Gráfico 14).

Gráfico 14. Perfil de atividade da azitromicina segundo resultados obtidos no teste de diluição em ágar.



Modelo dose-resposta (concentração de azitromicina x inibição bacteriana) dos isolados, (a) *S. aureus*, (b) *S. intermedius*, (c) ECN, (d) bastonetes Gram-negativos, avaliados através do teste de diluição em ágar.

4.4 Resistência cruzada à azitromicina em isolados de *Staphylococcus* spp. oxacilina-resistentes

Estudos relatam a possibilidade de resistência cruzada entre oxacilina e azitromicina em isolados de *Staphylococcus* spp. (MASKEL et al., 1990; NEU, 1990; PETERS et al., 1992). Neu (1991) observou que a CIM_{50/90} calculada de azitromicina para isolados de *S. aureus* suscetíveis à oxacilina foi de 0,5 e 1,0 µg/mL, porém os valores aumentaram consideravelmente em relação aos isolados de *S. aureus* resistentes (CIM_{50/90} >128 µg/mL).

O perfil de atividade da azitromicina tem sido avaliado desde o seu lançamento no mercado farmacêutico por diversos estudos que já apontaram para a emergência de resistência, frequentemente associada com alterações no padrão de produção de beta-lactamase e com a presença de genes que codificam proteínas alteradas (PETERS et al., 1992; BINGEN et al., 2002; HANSEN et al., 2002; LOW, et al., 2002). De modo similar, a resistência à oxacilina pode estar associada tanto a hiperprodução de beta-lactamase, quanto

por um mecanismo diretamente relacionado a alterações da PBP2a, em isolados que possuem o gene *mecA* expresso. A transferência horizontal do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. resultou na disseminação mundial de clones oxacilina e multidroga-resistentes. Desse modo há interesse em detectar a presença deste gene como um possível mecanismo comum de resistência para estes fármacos.

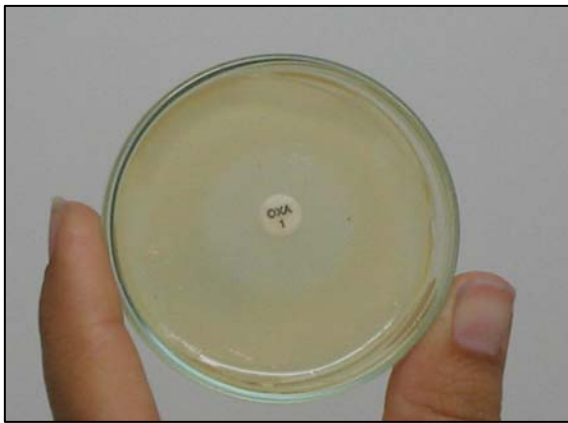
Dunkin et al. (1988) avaliou a CIM₉₀ para azitromicina em seis cepas de *Staphylococcus aureus* não-produtoras de beta-lactamase e 44 cepas produtoras, e reportou um CIM₉₀ de 2µg/mL para as cepas não-produtoras e 8µg/mL para as produtoras de beta-lactamase. Os autores também avaliaram isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase-negativos e reportaram CIM₉₀ de 1µg/mL e 8µg/mL para os isolados não-produtores e produtores de beta-lactamase, respectivamente. Além disso, os autores também apontaram para o fato de que os isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase positivos e negativos resistentes à azitromicina também expressavam resistência à penicilina e eritromicina. Desde então, diversas pesquisas foram direcionadas a identificar o mecanismo envolvido nos casos de resistência à macrolídeos. Yamaguchi et al. (2005) tentaram traçar uma correlação entre a resistência antimicrobiana e características genéticas em isolados de *Streptococcus pneumoniae* resistentes à β-lactâmicos e macrolídeos, incluindo a azitromicina. A correlação avaliada correspondeu a detecção de genes que conferem tanto uma produção anormal de beta-lactamase (gene *pbp*) para resistência a penicilina quanto a detecção de genes que conferem resistência à macrolídeos como o gene *mefA* e *ermB*. Os isolados resistentes a azitromicina apresentaram CIM₉₀ ≥ 128µg/mL e foram positivos a pelo menos um dos genes de resistência à macrolídeos, porém não apresentaram correlação com a presença dos genes para a produção de beta-lactamase, apontando para o fato de que a expressão de resistência à azitromicina ocorre de forma heterogênea.

4.5 Avaliação fenotípica da resistência à Oxacilina e detecção do gene *mecA*

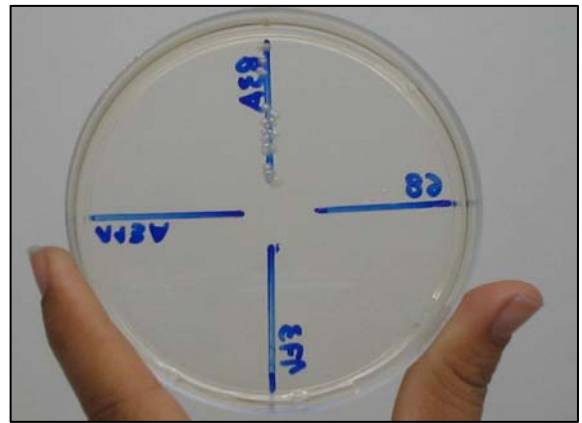
A detecção da resistência à oxacilina pela utilização de métodos fenotípicos apresenta problemas devido a expressão heterogênea do gene *mecA*, visto que muitos isolados resistentes à oxacilina em testes fenotípicos podem não apresentar esse gene. Por isso, várias metodologias estão sendo desenvolvidas e outras modificadas para aumentar a detecção de isolados verdadeiramente resistentes à oxacilina. Diferentes testes de suscetibilidade à oxacilina foram avaliados quanto à sensibilidade e especificidade em comparação com os resultados obtidos pela técnica de PCR. Os testes fenotípicos utilizados foram: difusão em disco simples e modificada ágar screen, microdiluição em caldo e diluição em ágar (Figura 06).

Após análise fenotípica, as cepas foram avaliadas quanto a presença do gene *mecA* pela técnica de PCR (Figura 07). De acordo com os resultados dos quatro testes realizados, 21 isolados foram sensíveis e 3 resistentes em todos os testes fenotípicos. Do total de 60 isolados avaliados, nove (15%) foram positivos para a presença do gene *mecA*.

O presente estudo determinou o perfil fenotípico e genético da resistência à oxacilina em isolados de *Staphylococcus* spp., por se tratar de técnicas previamente padronizadas como linha de pesquisa do Laboratório de Bacteriologia da UFRRJ, e como proposta de elucidação preliminar frente aos significativos percentuais de resistência à oxacilina detectados de forma a avaliar a possível resistência cruzada sugerida pela literatura.



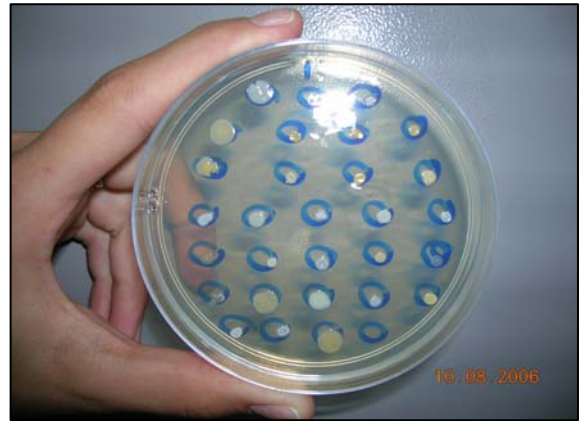
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 06. Testes fenotípicos para a detecção de resistência à oxacilina. (a) Difusão Modificada, (b) Ágar Screen, (c) Microdiluição em Caldo, (d) Diluição em ágar.

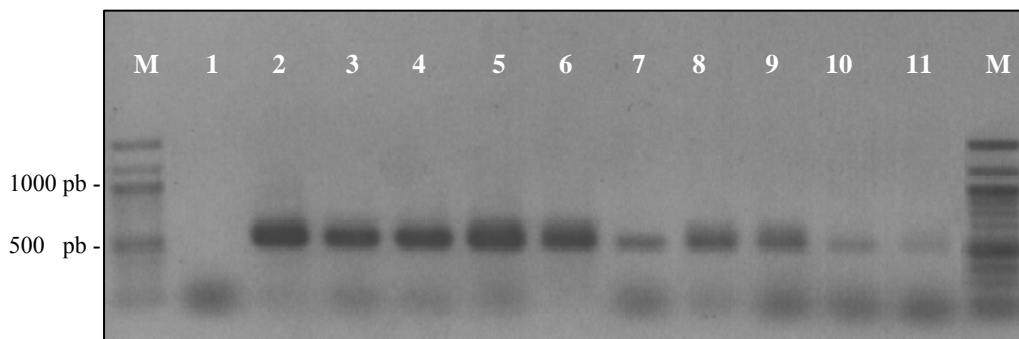


Figura 07. Eletroforese do fragmento do gene *mecA* (513 pb) de cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de animais de companhia, em gel de agarose a 1,5%. (M) marcador de peso molecular (100 pb), (1) controle negativo, (2) controle positivo, (3) até (11) *Staphylococcus* spp. *mecA* positivos.

De acordo com os resultados obtidos nas cinco técnicas foi calculado a sensibilidade e especificidade para determinar a acurácia dos testes na detecção fenotípica da resistência à oxacilina em relação a expressão do gene *mecA* detectada pela técnica de PCR. Esta análise permite a avaliar quais técnicas são realmente capazes de detectar os isolados verdadeiramente resistentes (sensibilidade) e sensíveis à oxacilina (especificidade).

De acordo com os resultados obtidos, a difusão em disco simples apresentou sensibilidade de 78%, ao passo que as outras técnicas apresentaram sensibilidade baixa e igual a 55% para difusão em disco modificada, 33% para a técnica do ágar screen, 22% para microdiluição em caldo e 44% para a diluição em ágar. A sensibilidade das técnicas fenotípicas como método preditivo da presença do gene *mecA* é dada pelos isolados que são resistentes nos testes fenotípicos e que possuem o gene. Em relação à especificidade, a difusão em disco simples apresentou valores de 87%, a técnica do ágar screen 67%, a difusão em disco modificada apresentou especificidade de 72% e a CIM em caldo e em ágar, apresentaram 64%, respectivamente. A especificidade é o poder de distinguir os isolados sensíveis aos testes fenotípicos e que não apresentam o gene *mecA* (PEREIRA, 1995). De acordo com os resultados obtidos, a difusão em disco simples e modificada apresentaram sensibilidade acima de 50%, sendo a difusão simples o mais fidedigno na detecção da resistência a oxacilina em isolados positivos para o gene *mecA*.

Kampf et al. (1998), ao avaliarem a sensibilidade de vários métodos de detecção da suscetibilidade de estafilococos, reportaram que o teste de difusão em disco simples apresentou sensibilidade de 98%. Esses resultados são controversos em relação ao trabalho realizado por York (1999) que reportou o teste de difusão em disco como sendo o método menos confiável para a detecção da resistência à oxacilina, embora seja o mais utilizado pelos laboratórios de microbiologia clínica por sua fácil e rápida execução e pelo baixo custo.

Sakoulas et al. (2001) afirmaram que espécies estafilocócicas *mecA* positivas apresentam instabilidade genética e, podem perder o gene resultando em subpopulações sensíveis ao antibiótico. Logo, a diferença dos resultados de avaliação fenotípica da resistência à oxacilina devem ser utilizados como alerta para comunidade científica, uma vez que inúmeros fatores de instabilidade das espécies devem ser levados em consideração antes de classificá-las como sensíveis ou resistentes ao antibiótico. A técnica de PCR, para a detecção do gene *mecA*, é considerada o método padrão ouro para confirmação de isolados oxacilina resistentes, porém não é um método viável para os laboratórios clínicos de rotina por apresentar custo mais elevado e necessitar de espaço físico e equipamentos especiais (JARLOV, 1997; HORSTKOTTE, 2002).

A expressão fenotípica heterogênea da resistência a oxacilina em isolados que não apresentam o gene *mecA*, pode ser explicado pela hiperprodução de beta-lactamase. A resistência clássica à oxacilina está diretamente relacionada a alterações da PBP2a, onde os isolados possuem o gene *mecA* expresso. Além deste mecanismo, a resistência à oxacilina pode está associada à modificação de afinidade a outras “PBPs”, principalmente a PBP3 (BROWN et al., 2001; MCKINNEY et al., 2001; PETINAKI et al., 2001). A transferência horizontal deste gene em clones de *Staphylococcus* spp. resultou na disseminação mundial de clones oxacilina resistentes (WIELDERS et al., 2002). Diversos estudos apontam para a incidência de casos infecciosos associados por *Staphylococcus* spp. *mecA* positivos resistentes à oxacilina. Coelho et al. (2007) avaliaram 29 amostras de mastite bovina, 30 amostras de otite canina e 21 amostras isoladas de diferentes sítios de infecção em humanos e detectaram presença do gene *mecA* em *S. intermedius* proveniente de amostras animais e

em *S. aureus* proveniente de amostras humanas sugerindo uma possível transferência horizontal de genes entre espécies distintas. Um outro estudo reportou que 6,6% dos isolados de *Staphylococcus* spp. provenientes de casos de otite externa canina, foram resistentes à oxacilina e apresentaram o gene *mecA*. (COELHO et al., 2005).

Tabela 05. Perfil de suscetibilidade à oxacilina dos isolados de *Staphylococcus* spp. *mecA* positivos.

Isolados	Difusão em Disco Simples	Difusão em Disco Modificada	Ágar Screen	CIM (caldo)	CIM (ágar)
1	S	S	S	S	S
2	R	R	R	R	S
3	S	S	S	S	R
4	S	S	S	S	S
5	R	R	R	S	S
6	S	R	R	R	R
7	S	S	S	S	S
8	R	R	S	S	R
9	R	R	S	S	R

4.6 Avaliação da Resistência Cruzada à Azitromicina em Isolados de *Staphylococcus* spp. oxacilina-resistentes

Os resultados dos testes de detecção de resistência à azitromicina e oxacilina apresentados anteriormente foram comparados como forma de predição para a resistência cruzada. Dessa forma, foi observado que:

- Os nove isolados (15%) resistentes a oxacilina em testes fenotípicos e positivos para o gene *mecA*, foram resistentes a pelo menos um teste fenotípico de resistência à azitromicina (Tabela 03).
- Dos 25 isolados resistentes à azitromicina que apresentaram 86,6% de correspondência nos resultados dos testes fenotípicos de resistência, três (12%) foram positivos para o gene *mecA*.
- Dos 25 isolados resistentes à azitromicina, dois foram resistentes em todos os testes de detecção de resistência para oxacilina.

Os resultados apontam para o fato de que a expressão da resistência à oxacilina em isolados de *Staphylococcus* spp. pode reduzir a eficiência da azitromicina quando estes agentes estão envolvidos na etiologia de processos infecciosos de animais de companhia.

Tabela 06. Avaliação da resistência à azitromicina em isolados de *Staphylococcus* spp. *mecA* positivos.

<i>Staphylococcus</i> spp. <i>mecA</i> positivos	Testes de Suscetibilidade à Azitromicina		
	Difusão em Disco	Microdiluição em Caldo	Diluição em Ágar
1	R	S	R
2	R	S	R
3	R	R	R
4	R	R	S
5	R	R	R
6	S	R	R
7	S	S	R
8	S	R	R
9	S	S	R

5 CONCLUSÃO

- O isolamento e identificação bacteriana são de grande importância, uma vez que podem ocorrer falhas de conduta terapêutica quando a escolha do antimicrobiano é direcionada a agentes etiológicos clássicos de determinados processos infecciosos, como por exemplo, *S. intermedius* em piodermas, desconsiderando a diversidade de espécies bacterianas que podem estar envolvidas nesta etiologia.

- O perfil de suscetibilidade antimicrobiana observada variou muito em relação aos sítios de infecção investigados, no caso dos isolados provenientes de otite externa canina os antibióticos mais eficientes foram a associação ampicilina+sulbactam, cefalotina e gentamicina. Nas infecções do trato urinário os melhores resultados obtidos foram para ampicilina+sulbactam, gentamicina e fluoroquinolonas como, norfloxacin e ciprofloxacina. Nas infecções da pele ampicilina+sulbactam, ciprofloxacina, cefotaxima e cefalexina apresentaram menores percentuais de resistência. Foram detectados altos percentuais de resistência em relação à penicilina e oxacilina em todos os isolados avaliados. Portanto, o hábito de prescrever terapia antimicrobiana sem prévia identificação do agente e do seu perfil de suscetibilidade tem contribuído significativamente para a disseminação das cepas resistentes em animais de companhia.

- Os testes de suscetibilidade antimicrobiana utilizados para a avaliação do perfil da atividade inibitória da azitromicina, detectaram 45% dos isolados de *Staphylococcus* spp. e 65% dos bastonetes Gram-negativos resistentes à azitromicina com grau de correspondência de 86,6% e 91,3%, respectivamente. Dessa forma, o uso corrente da azitromicina na medicina humana e o desenvolvimento de resistência em isolados animais podem estar ocorrendo através de mecanismos de transferência de genes interespecíficos e intraespecíficos. Portanto, torna-se indispensável a realização de testes de suscetibilidade antes da indicação da azitromicina como opção terapêutica veterinária.

-Dos testes de suscetibilidade à azitromicina avaliados, os que mais se aproximaram dos valores reais de isolados resistentes foram o teste de Microdiluição em Caldo e Difusão em Disco.

-Há necessidade de estudos que ampliem os dados de Concentração Inibitória Mínima (CIM) da azitromicina sobre diferentes espécies bacterianas, uma vez que, estes estão calcados em agentes tradicionais como *Staphylococcus aureus*.

-O aumento da pressão seletiva pode induzir alguns mecanismos de resistência cruzada, como observado entre oxacilina e azitromicina em isolados de *Staphylococcus* spp..

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F. M. Comparative ribotyping of *Staphylococcus intermedius* isolated from members of the Canidea gives possible evidence for hostspecificity and co-evolution of bacteria and hosts. **International Journal Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.1343–1347, 2001.

ADANG, R. P.; SCHONTEN, H. C.; VAN TIEL, F. H.; BLIJHAM, G.H. Pneumonia due to *Micrococcus* spp in a patient with acute myeloid leukaemia. **Leukaemia**. v.6, p.224-226, 1992.

AJUWAPE, A.T.P.; OYEBANJI, M.O.; ADETOSOYE, A.I; Bacteriological examination of normal upper respiratory tract of puppies with particular reference to staphylococci. **Veterinarski Arhiv**, V.76, N.2, P.179-184, 2006.

ANDRADE, A.L.; STRINGHINI, G.; BONELLO, F.L.; MARINHO, M.; PERRI, S.H.V. Microbiota conjuntival de cães da cidade de Araçatuba (SP). **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v.65, n.3, p.323-326, 2002.

ANVISA. **Agência Nacional de Vig ilância Sanitária**. Detecção e Isenteificação de Bactérias e Importância Médica. Módulo V, p.5-8, 2005.

BARRASA, M.J.L.; GOMEZ, L.P.; LAMA, G.Z.; TEJEDOR JUNCO, M.T. Antimicrobial susceptibility patterns of *Pseudomonas strinas* isolated from chronic canine otitis extena. **Journal of Veterinary Medicine**, B47, p.191-196, 2000.

BINGEN, E.; LECLERCQ, R.; FITOUSSI, F.; BRAHIMI, N.; MALBRUNY, B.; DEFORCHE, D.; COHEN, R. Emergence of Group A *Streptococcus* Strains with Different Mechanisms of Macrolide Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, n.05, p.1109-1203, 2002.

BLANCO, J.L.; GUEDEJA-MARRON, J.; HONTECILLAS, R.; SUAREZ, G.; GARCIA, M.E. Microbiological diagnoses of chronic otitis externa in the dogs. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v.43, n.8, p. 475-482, 1996.

BLONDEAU, J.M. The evolution and role of macrolides in infectious diseases. **Summary Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v.3, n.8, p.1131-1151, 2002.

BRAGA, C.A.S.B.; RESENDE, C.M.F.; PESTANA, A.C.N.R.; CARMO, L.S.; SILVA, L.A.F.; ASSIS, L.N.; LIMA, L.A.; FARIAS, L.M.; CARVALHO, M.A.R. Isolamento e identificação da microbiota periodontal de cães da raça pastor alemão. **Ciência Rural**, v.35, n.2, p.35, 2005.

BROOKS, G. F; BUTEL, J S.; MORSE, S. A. **Microbiologia Médica**. 21.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.158, 2000.

BROWN, D.F.J.; EDWARDS, D.I.; HAWKEY, P.M.; MORRISON, D.; RIDGWAY, G.L.; TOWNER, K.J.; WREN, M.W.D. On behalf of the Joint Working Party of the British, Guidelines for the laboratory diagnosis and susceptibility testing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.56, p.1000-1018, 2001.

ÇETIN, C.; SENTÜRK, S.; KACABIYIK, A.L.; TEMIZEL, M.; ÖZEL, E.; Bacteriological Examination of urines samples from dogs with symptoms of urinary tract infection. **Turkish Journal of Veterinary Animal Sciences**, v.23, p.1225-1229, 2003.

COELHO, S.M.O.; PEREIRA, I.A.; MORAES, R.A.M.; OLIVEIRA, D.F.B.; SOUZA, M.M.S. Avaliação do Perfil de Resistência e Detecção do Gene *mecA* de *Staphylococcus* spp. Isolados de Otite Canina. **Revista da Universidade Rural - Série Ciências da Vida**, v. 25, supl., p. 337-338, 2005.

COELHO, S.M.O.; MENEZES, R.A.; SOARES, L.C.; PEREIRA, I.A.; GOMES, L.P.; SOUZA, M.M. S. Mapeamento do Perfil de Resistência e Detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* oxacilina-resistentes isolados de espécies humanas e animais. **Ciência Rural**, v.37, n.1, p.195-200, 2007.

COGGAN, J.A.; OLIVEIRA, C.M.; FAUSTINO, M.; MORENO, A.M.; VON SYDOW, A.C.; MELVILLE, P.A.; BENITES, N.R. Estudo microbiológico de conteúdo intra-uterino de Cadelas com piometra e pesquisa de fatores de Virulência em cepas de *Escherichia coli*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.71, supl. p.1-749, p.513-515, 2004.

COLOMBINI, S.; MERCHANT, S.R.; HOSGOOD, G. Microflora and antimicrobial susceptibility patterns from dogs with otitis media. **Veterinary Dermatology**, v.11, p.235-239, 2000.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. **Approved standards**. CLSI document M45-P, Wayne, Pa, 2005.

DAVISON, J. Genetic exchange between bacteria in the environment. **Plasmid**, v.42, p.73-91, 1999.

DE JONGE, B.L.; SIDOW, T.; CHANG, Y.S.; LABISCHINSKI, H.; BERGER-BACHI, B.; GAGE, D.A.; TOMASZ, A. Altered muropeptide composition in *Staphylococcus aureus* strains with an inactivated *femA* locus. **Journal of Bacteriology**, v.175, n.9, p.2779-2782, 1993.

DOMARACKI, B.E.; EVANS, A.; PRESTON, K.E.; FRAIMOW, H.; VENEZIA, R.A. Increased oxacillin activity associated with glycopeptides in coagulase negative staphylococci. **European Journal of Clinical and Microbiology & Infectious Disease**, v.17, p.143-150, 1998.

DOMINGUES, L.M.; AKESSI, A.C.; SCHOKEN-ITURRINO, R.P.; DUTRA, L.S. Microbiota saprófita associada à doença periodontal em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.4, p.89-100, 1999.

DUNE, M.W.; KURANA, C.; MHOS, A.A.; RODRIGUEZ, A.; ARRIETA, A.; MCLINN, S.; KROGSTAD, J.A.; BLATER, M.; SCHWARTZ, R.; VARGAS, S.L; EMPARANZA, P.; FERNANDEZ, P.; GOOCH, W.M. ASPIN, M.; PODOGORE, J.; ROINE, I.; BLUMER, J.L.; EHRLICH, G.D.; CHOW, J. efficacy of single-dose Azithromycin in treatment of acute otitis media in children after a baseline tympanocentesis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n.8, p.2663-2667, 2003.

DUNKIN, K.T.; JONES, S.; HOWARD, A.J. The *in vitro* activity of CP-62,993 against *Haemophilus influenzae*, *Branhamella catarrhalis*, staphylococci and streptococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.21, p.405-411, 1988.

EDELSTEIN, P.H.; ELDESTEIN, M.A.C.; In vitro activity of azithromycin against clinical isolates of Legionella species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.35, p. 180-181, 1991.

ETTINGER, J.S. **Tratado de medicina interna veterinária**. São Paulo: Manole, 1997.

FARIAS, M.F. Terapêutica otológica. In: **Manual de terapêutica veterinária**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2002.

FORRESTER, S.D.; TROY, G.C.; DALTON, M.N.; HUFFMAN, J.W.; HLTZMAN, G. Retrospective evaluation of urinary tract infection in 42 dogs with hiperadrenocorticism or diabetes mellitus or both. **Journal of Veterinary International Medicine**, v.13, p.557-560, 1999.

FRANK, L.A.; KANIA, S.A.; HNILICA, K.A. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from dogs with pododermatitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.222, p.451-454, 2003.

FRANSSON, B. A; RAGLE, C.A. Canine Pyometra: An Update on Pathogenesis and Treatment. **Compendium**, Washington, v. 25, n. 8, p. 602-612, 2003.

GAHRN-HANSEN, B. Coagulase-negative staphylococci and micrococci in clinical microbiology. **Danish Medicine Bulletin**, v.34, p.96-115, 1987.

GANDOTRA, V.K.; SINGLA, V.K.; KOCHHAR, H.P.S.; CHAUHAN, F.S.; DWIVEDI, P.N. Hematological and bacteriological studies in canine pyometra. **Indian Veterinary Journal**, v.71, p.816-818, 1994.

GASKIN, J.M. microbiology of equine and feline eye. **Veterinary Clinical North American Small Animal Practice**, v.10, p.303-316, 1980.

GILLIS, R.J.; WHITE, K.G.; CHOI, K.; WAGNER, V.E.; SCWEISER, H.P.; IGLEWSKI, B.H. Molecular basis of Azithromycin-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.09, p.3858-3867, 2005.

GIOSO, M.A. **Odontologia veterinária: pequenos animais**. 2.ed. São Paulo, p.45, 1993.

GIRARD, A.E.; GIRARD, D.; RETSEMA, J.A. Correlation of the extravascular pharmacokinetics of Azithromycin with in vivo efficacy in models of localized infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.25, Suppl. A, p.61-71, 1990.

GLAUDE, R.P.; BRIGHT, G.M.; ISAACSON, R.E.; NEWBORG, M.F. In vitro and in vivo uptake of Azithromycin (CP-62,993) by phagocytic cells: possible mechanism of delivery and release at sites of infection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.33, p.277-282, 1990.

GRIFFIN, C.E.; KWOCHKA, K.W.; MACDONALD, J.M. **Current veterinary dermatology**. Missouri: Mosby year book, p.378, 1993.

GUARDABASSI, L.; LOEBER, M. E.; JACOBSON, A. Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. **Veterinary Microbiology**, v.98, n.23, p.7, 2004.

GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D.H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.54, p.321-332, 2004.

HAIR, J.F.; ANDERSON, R.E.; TATHAM, R.L.; BLACK, W.C. **Análise multivariada de dados**, 5ª edição – Porto Alegre, ed. Bookman, 2005.

HANSEN, G.T.; METZLER, K.L.; DECAROLIS, E.; BLONDEAU, J.M. The macrolides. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v.11, n.2, p.189-215, 2002.

HARIHARAN, H.; COLES, M.; POOLE, D.; LUND, L.; PAGE, R. Update on microbial susceptibilities of bacterial isolates from canine and feline otitis externa. **Canadian Veterinarian Journal**. v. 47, p.253-257, 2006.

HARVEY, C.E., EMILY, P.P. **Small animal dentistry**. St. Louis: Mosby Year Book, p.413, 1993.

HIRST, D.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia Veterinária**. ED. Guanabara Koogan , pp.212-215, 2003.

HOFFMAN, H. **O Gato**. Tradução do Inglês Valter Lellis Siqueira. São Paulo: Editora Martins Fontes, Título original: Katzen Richtig Verstehen. Instituto Pasteur. p.173, 1997.

HOLM, B.R.; PETERSSON, U.; MORNER, A. Antimicrobial resistance in staphylococci from canine pyoderma: a prospective study of first-time and recurrent cases in Sweden. **Veterinary Record**, v.151, n.600, p.5, 2002.

HORSTKOTTE, M. A. Rapid detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci by a penicillin-binding protein 2a-specific latex agglutination test. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p.3700-3702, 2002.

INDUDHARAN, R.; HAQ, J.A.; AIYAR, S. Antibiotics in chronic suppurative otitis media: a bacteriologic study. **Journal of Clinical Microbiology**, v.108, n.5, p.440-445, 1999.

ITO, T.; KATAYAMA, Y.; HIRAMATSU, K. Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.43, p.1449-1458, 1999.

ITO T; KATAYAMA Y.; ASADA K.; MORI N.; TSUTSUMIMOTO K.; TIENSASITORN C.; HIRAMATSU K. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *S. aureus*. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**, v.45, p.1323-1336, 2001.

JARLOV, J. O. Evaluation of different methods for the detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.40, p. 241-249, 1997.

JOHNSTON, S. D.; KUSTRITZ, M. V.R.; OLSON, P. N. S. Canine and feline Theriogenology, Philadelphia: WB Saunders Company, p.592, 2001.

LEITE, C.A.L. As otites de cães e gatos. Parte 1– Epidemiologia. *Cães Gatos*, v.15, p.22-26, 2000.

LEVY, C.E. **Aspectos Microbiológicos. Infecções hospitalares: prevenção e controle.** São Paulo, Sarvier. p.591-598, 1997.

LIEBL, W.; KLOSS, W.E.; LUDWIG, W. Plasmid-borne macrolide resistance in *Micrococcus luteus*. **Microbiology**, v.148, pt.8, p.2479-2487, 2002.

LILENBAUM, W.N.; NUNES, E.L.C.; AZEREDO, M.A.I. Prevalence and Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from skin surface of clinically normal cats. **Letters in Applied Microbiology**, v.27, p.224-228, 1998.

LILENBAUM, W.N.; VERAS, M.; BLUM, E.; SOUZA, G.N. Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from otitis externa in dogs. **Letters in Applied Microbiology**, v.31, p.42-45, 2000.

LING, G.V.; NORRIS, C.R.; FRANTI, C.E.; EISELE, P.H.; JOHSONN, D.L.; RUBY, A.L.; JANG, S.S. Interrelations of organisms prevalence, specimen collection method, and host

age, sex and breed among 8,354 canine urinary tract infections (1969-1995). **Journal of Veterinary International Medicine**, v.15, p.341-347, 2001.

LOEFFLER, A.; BOAG, A.; SUNG, J.; LINDSAY, J.A.; GUARDABASI, L.; DALSGAARD, A.; SMITH, H.; STEVENS, K.B.; LLOYD, D.H. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small referral hospital in the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.56, n.4, p.692-697, 2005.

LOW, D.E.; AZAVEDO, J.; WIES, K.; MAZZULI, T.; KUHN, M.; CHURCH, D.; FORWARD, K.; ZAHNEL, G.; SIMOR, A.; MCGEER, A. antimicrobial resistance among clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae* in Canada during 2000. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, n.5, p.1295-1301, 2002.

KAMPF, G.; LECKE, C.; CIMBAL, A.; WEIST, K. Evaluation of Mannitol Salt Agar for Detection of Oxacillin Resistance in *Staphylococcus aureus* by Disk Diffusion and Agar Screening. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, n.8, p. 2254–2257, 1998.

KARLOWSKY, J. & SAHM, D. Antibiotic resistance – is resistance detected by surveillance relevant to predicting resistance in clinical setting?. **Current Opinion in Pharmacology**, v.2, n.1471, p.4892-4902, 2002.

KASZANYITZKY E.J.; EGYED Z.; JANOSI S.; KESERU J.; GAL Z.; SZABO I.; VERES Z.; SOMOGY, I. Staphylococci isolated from animals and food with phenotypically reduced susceptibility to beta-lactamase-resistant beta-lactam antibiotics. **Acta Veterinaria Hungarica.**, v.52, n.1, p.7-17, 2004.

KATAJA, J.; HUOVINEN, M.; SKURNIK, M.; SEPPÄLA, H. Erythromycin resistance genes in group A streptococci in Finland. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, n.05, p.48-52, 1999.

KATCHER, A.; FRIEDMAN E. Potential health value of pet ownership. **Practices Veterinary**, v.2, p.117, 1980.

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. Genetic organization of the chromosome region surrounding *mecA* in clinical staphylococcal strains: role of *IS431*-mediated *mecI* deletion in expression of resistance in *mecA*-carrying, low-level methicillin-resistant *Staphylococcus haemolyticus*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n.7, p. 1955-1963, 2001.

KIM, E. L.; CHING, D. L.; e PIEN, F. D., Bacterial endocarditis at a small community hospital. **American Journal Medicine Science**, v.229, p.87-93, 1990.

KISS, G.; RADVANYVI, S.; SZIGETI, G. New combination for therapy of canine otitis externa. **Journal of Small Animal Practice**, v.38, p.51-56, 1997.

KOGIKA, M.M.; FORTUNATO, V.A.B.; MAMIZUKA, E.M.; HAGIWARA, M.K.; PAVAN, M.F.B.; GROSSO, S.N.A.: Etiologic study of urinary tract infection in dogs. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.32, p.31-36, 1995.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN, J.R., W.C. **Diagnóstico Microbiológico**, 5.ed. Rio de Janeiro: Editora MEDSI, p.1465, 2001.

KOHNER, J.P.; UHL, J.; KOLBERT, C.; PERSING, D.; COCKERILL, F. A Comparison of susceptibility testing methods with *mecA* Gene analysis for determining oxacilin (methicilin) resistance in clinical isolates of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative *Staphylococcus* spp. **Journal of Clinical Microbiology**. v.37, n.9, p.2952-2961, 1999.

KURODA, M.; OHTA, T.; UCHIYAMA, I.; BABA, T.; YUZAWA, H.; KOBAYASHI, I.; CUI, L; OGUCHI, A.; AOKI, K.; NAGAI, Y. Whole genome sequencing of meticillin-resistant. **The Lancet**, v.357, I.9264, p.1225-1240, 2001.

MANN, C.M.; MARKHAM, J.L.A New method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.84, p.538-544, 1998.

MANIAN, F.A. Asymptomatic nasal carriage of mupirocin-resistant, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a pet dog associated with MRSA infection in household contacts. **Clinical Infectious Disease**, v.36, p.26-28, 2003.

MASKELL, J.P.; SEFTON, A.M.; WILLIAMS, J.D. Comparative *in vitro* activity of Azithromycin against Gram-positive cocci *Haemophilus influenzae* and anaerobes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.25, Suppl.A, p.19-24, 1990.

MARTINEAU, F., PICARD, F.J., LANSAC, N., MÉNARD, C., ROY, P.H., OUELLETTE, M.E BERGERON, M.G. Correlation between the Resistance Genotype Determined by Multiplex PCR Assays and the Antibiotic Susceptibility Patterns of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 44, p.231-238, 2000.

MARTIN BARRASA, J.L.; LUPIOLA, G.P.; GONZALEZ, L.Z. Antibacterial susceptibility patterns of *Pseudomonas* strains isolated from chronic canine otitis externa. **Journal of Veterinary Medicine**, B.47, p.191-196, 2000.

MAY, E.R.; HNILICA, K.A.; FRANK, L.A.; JONES, R.D.; BEMIS, D.A. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from healthy dogs and dogs with otitis, pyoderma, or both. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.227, n.6, p.928, 2005.

McKINNEY, T. K.; SHARMA, V. K.; CRAIG, W. A.; ARCHER, G. L. Transcription of the gene mediating methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* (*mecA*) is corepressed but not coinduced by cognate *mecA* and β -lactamase regulators. **Journal of Bacteriology**, v.183, n.23, p.6862-8, 2001.

McPHEE, T.; COWLEY, G. **Essentials of periodontology and periodontics**. 3ed, Oxford: Blackwell Scientific, 1981.

MEDELEAU, L.; LONG, R.E.; BROWN, J.; MILLER, W.H. Frequency and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from canine pyoderma. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, n.2, p.229-231, 1986.

MISHELIA, G.D.; AMIN, J.D.; CHAUNDHARY, S.U.R. Vaginal bacterial flora of Nigeria local bitches during different stages of reproductive cycle. **International Journal of Agriculture & Biology**, v.03, n.2, p.183-185, 2001.

MITRA, M.; MAHANTA, S.K.; GUHA, C.; PRAMANKI, A.K. Comparative efficacy of gentamicin, norfloxacin and nitrofurantoin against urinary tract infection in canine. **Indian Veterinary Journal**, v.16, p.299-301, 1994.

MOORE, R.D.; HELLER, N.; MAJORS, L.J.; WHITLEY, R.D.; BURGESS, E.C.; WEBWR, J. Prevalence of ocular microorganisms in hospitalized and stabled horses. **American Journal and Veterinary Research**, v.49, p.773-777, 1988.

MULLER, G.H.; KIRK, R.W.; SCOTT, D.W. **Dermatologia de Pequenos Animais**. 3ed. São Paulo ed. Manole, p.199, 1995.

MURAKAMI, K.W.; MINAMIDE, K.; WADA, W.; NAKAMURA, E.; TERAOKA, H.; WATANBE, S. Identification of methicillin resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, p. 2240-2244, 1991.

NEU, H.C. Clinical Microbiology of Azithromycin. **The American Journal of Medicine**, v.91, Suppl.3A, p.3A-12S, 1991.

NEU, H.C.; CHIN, N.X.; SAHA, G.; LABTHAVIKUL, P. Comparative *in vitro* activity of the new oral macrolide azithromycin. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Disease**, v. 7, p.541-544, 1990.

NOBRE, M.O.; CASTRO, A.P.; NASCENTE, P.S. Occurrence of *Malassezia pachydermatis* and others Infectious agents as cause of External Otitis in Dogs from Rio Grande do Sul State, Brazil (1996/1997). **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.245-249, 2001.

NORMAND, E.H.; GIBSON, N. R.; TAYLOR, D.J. Trends of antimicrobial resistance in bacterial isolates from a small animal referral hospital. **Veterinary Record**, v.146, p.151-155, 2000.

ODENSVICK, K.; GRAVE, K.; GREKO, C. Antimicrobial drugs prescribed for dogs and cats in Sweden and Norway 1990-1998. **Acta Veterinaria Scandinavia**, v.42, p.189-1998, 2001.

OLIVEIRA, L. C.; MEDEIROS, C. M. O.; SILVA, I. N. G.; MONTEIRO, A. J.; LEITE, C. A. L.; CARVALHO, C. B. M. Susceptibilidade de bactérias isoladas de otite externa canina a distintos antimicrobianos na cidade de Fortaleza/Ceará. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte/MG, v. 57, n.3, p.1325-1330, 2005.

OLIVEIRA, L.C.; LEITE, C.A.L.; BRILHANTE, R.S.N.; CARVALHO, C.B.M. Etiology of canine otitis media and antimicrobial susceptibility of coagulase-positive *Staphylococcus* in Fortaleza city, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p.144-147, 2006.

OSBORNE, C.A. **Feline lower urinary tract disorders**. In: ETTINGER, S.J. Textbook of veterinary internal medicine: diseases of the dog and cat. 3.ed. Philadelphia: Saunders, p.2057, 1989.

LOUDIZ, R.J.; WIDLITZ, A.; BECKMANN, X.J.; CAMANGA, D.; ALFIE, J.; BRUNDAGE, B.H.; BARST, R.J. Micrococcus-associated Central Venous Catheter infection in patients with pulmonary arterial hypertension. **American College of Chest Physicians**, v.126, p.90-94, 2004.

PELLERIN, J.L.; BOURDEAU, P.; SEBBAG, H.; PERSON, J.M. Epidemiology of antimicrobial compound resistance of *Staphylococcus intermedius* clinical isolates from canine pyoderma. **Compendium of Immunology and Microbiology & Infectious Disease**, v.21, p.115-133, 1998.

PEREIRA, M.G. Epidemiologia teoria e prática. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan AS. p.358-375, 1995.

PETERS, D.H.; FRIEDEL, H.A.; MCTAVISH, D. Azithromycin- A review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and clinical efficacy. **Drugs**, v.44, n.5, p.750-799, 1992.

PETINAKI, E.; DIMITRACOPOULOS, G.; SPILIOPOULOU, I. Decreased affinity of PBP3 to methicillin in a clinical isolate of *Staphylococcus epidermidis* with borderline resistance to methicillin and free of the *mecA* gene. **Microbial Drug Resistance**, v.7, n.3, p.297-300, 2001.

PRESCOTT, J.F.; HANNA, W.J.B.; REID-SMITH, R. Antimicrobial Drug Use and Resistance in Dogs. **Canadian Veterinary Journal- Reveu Veterinaire Canadienne**, v.43, p.107-116, 2002.

RECHER JUNIOR, A; HAGIWARA, M.K.; MAMIZUKA, E.; Estudo clínico da doença do trato urinário inferior em gatos domésticos de São Paulo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.35, n.2, p., 1998.

RECHER JUNIOR, A. A orbifloxacina no tratamento das cistites bacterianas em gatos domésticos. **Ciência Rural**, v.35, n.6, p.1325-1330, Nov./Dec, 2005.

RETSEMA, J.; GIRARD, A.; SCHELKLEY, W. Spectrum and mode of action of azithromycin (CP-62,993), a new 15-membered-ring macrolide with improve potency against gram-negative organisms. **Antimicrobial Agentes and Chemotherapy**, v.31, p.1937-1947, 1987.

RETSEMA, J.A.; BRENNAN, L.A.; GIRARD, A.E. Effects of environmental factors on the in vitro potency of azithromycin. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.10, n.10, p.834-842, 1991.

RETSEMA, J.A. Susceptibility and Resistance emergence studies with Macrolides. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.11, Suppl.1, p.S15-S21, 1999.

RITZ, C; STREIBIG, J.C. Bioassay analysis using R. **Journal of Statistical Software**, January, v.12, 2005.

R. Development Core Team R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria, ISBN 3-900051-07-0, 2006. <http://www.R-project.org>.

SAKOULAS, G.; GOLD H.S.; VENKATARAMAN, L.; DEGIROLAMI, P.C. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Comparison of Susceptibility Testing Methods and Analysis of *mecA*-Positive Susceptible Strains. **Journal of Clinical Microbiology**. v.39, n.11, p. 3946–3951, 2001.

ŠEOL, B. Comparative in vitro activities of enrofloxacin, ciprofloxacin and marbofloxacin against *Staphylococcus intermedius* isolated from dogs. **Veterinarski Arhiv**, v.75, n.3, pp.189-194, 2005.

SERPELL, J. **The domestic dog: its evolution, behaviour and interactions with people**. Cambridge: Cambridge University Press, p.268, 1995.

SEPPÄLA, U.; KLAUKKA, J.; VUOPIO-VARKILA, A.; MUOTIALA, H.; HELENUS, K.; LAGER, P. The Effect of Changes in Consumption of Macrolide antibiotics on Erythromycin resistance Grupo A streptococci in Finland. **The New England Journal of Medicine**, v.337, p.4441-446, 1997.

SCOTT, D.W.; MILLER Jr., W.H.; GRIFFIN, C.E. *Dermatologia dos pequenos animais*. Interlivros, 5 ed., p.256-300, 1995.

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.J.; GRIFFIN, C.G. *Small animal dermatology*. Philadelphia: Saunders, p.1528, 2001.

SHEPARD, R.M.; FALKENR, F.C. Pharmacokinetics of azithromycin in rats and dogs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.25, Suppl.A, p.49-60, 1990.

SHUHAIBAR, M.N.; FALKINER, F.R. The prevalence, antibiotic susceptibility and phage-type of nasally carried *Staphylococcus aureus* in the Dublin community. **Journal of Clinical Microbiology**, v.161, n.10, p.589-592, 1992.

SIERADZKI, K.; TOMASZ, A. Inhibition of cell wall turnover and autolysis by vancomycin in a highly vancomycin-resistant mutant of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v.179, p.2557–2566, 1997.

SILVA, N. Identification and antimicrobial susceptibility patterns of *Staphylococcus* spp. isolated from canine chronic otitis externa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.2, p.197–201, 2001.

SIMOONS-SMIT, A.M; SAVELKOUL, P.H.M.; STOOF, J.; STARINK, T.M. VANDENBROUCKE-GRAULS, C.M.J. Transmission of *Staphylococcus aureus* Between Humans and Domestic Animals in a Household. **Journal of Clinical Microbiology**, v.36, p.115–117, 1998.

SLANEY, L.; CHUBB, H.; RONALD, A.; BRUHAM, R. In vitro activity of Azithromycin, erythromycin, ciprofloxacin and norfloxacin against *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus ducreyi* and *Chlamydia trachomatis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.25, supplA, p.1-5, 1990.

SPELDOOREN, V.; HEYM, B.; LABIA, R.; NICOLAS-CHANOINE, M. Discriminatory detection of inhibitor-resistant β -lactamases in *Escherichia coli* by single-strand conformation polymorphism-PCR. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.42, p.879-884, 1998.

SNARY, E.L.; KELLY, L.A.; DAVISON, H.C.; TEALE, C.; WOOLDRIDGE, M. Antimicrobial resistance: a microbial risk assessment perspective. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.53, n.6, p.906-917, 2004.

SLATER, D. **Fundamentals of veterinary ophthalmology**. 2ed. Philadelphia: W.B. Saunders, p. 630, 1990.

SCHENTAG, J.J.; BALOW, C.H. Tissue- directed pharmacokinetics. **American Journal of Medicine**, suppl.3A, p.5S-11S, 1991.

TAHNKIWALE, S.S. Methicillin resistance among isolates of *Staphylococcus aureus*: antibiotic sensitivity pattern & phage typing. **Archives of International Medicine**, v. 56, n.7, p.330, 2002.

TAIT-KAMARADT, A.; DAVIES, T.; APPELBAUM, P.C.; DEPARDIEU, F.; COURVALIN, P.; PETIPAS, J.; WONDRACK, L.; WALKER, A.; JACOBS, M.R.; SUTCLIFFE, J. Two New Mechanisms of Macrolide Resistance in Clinical Strains of *Streptococcus pneumoniae* from Eastern Europe and North America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, p.3395-3401, 2000.

TEJEDOR JUNCO, M.T.; MARTIN BARRASA, J.L. Identification And Antimicrobial Susceptibility of Coagulase Positive Staphylococci Isolated From Healthy Dogs And Dogs Suffering From Otitis Externa. **Journal of Veterinary Medicine**, B49, p.419-423, 2002.

TOKUE, Y.; SHOJI, S.; SATOH, K.; MOTOMYIA, M. Comparison of a polymerase chain reaction assay and a conventional microbiologic method for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.36, p. 6-9, 1992.

TERASAWA, B.L.; Caracterização da resistência à oxacilina em estafilococos coagulase-negativa isolados no hospital de clínicas de Curitiba – Paraná. In: **Dissertação de mestrado**: Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Setores de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal do Paraná, p.60-64, 2006.

VAN-DUIJKEREN, E.; HOUWERS, D. *Salmonella enteridis* in dogs, not relevant? **Tijdschrift voor Diergeneeskunde**, v.127, p.716-717, 2002.

WALL, P.G.; THRELLFALL, E.J.; WARD, L.R. Multiresistant *Salmonella* Typhimurium DT104 in cats: a public health risk. **Lancet**, v.348, p.471, 1996.

WANDELLER, A.I.; MATTER, H.C.; KAPPELER, A.K.; BUDDE, A. The ecology of dogs and canine rabies: a selective review. **Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)**, v.12, n.1, p. 51-71, 1993.

WATSON, A.D.J.; ROSIN, E. Antimicrobial drug use in dogs and cats. **Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine**, 3rd ed Iowa State University Press USA, pp.537-575, 2000.

WHITLEY, R.D.; MOORE, C.P. Microbiology of the equine eye in health and disease. **Veterinary Clinical of North America in Large Animal Practice**, v.6, p.451-466, 1984.

WIELDERS, A.L.C.; FLUIT, A.C.; BRISSE, S.; VERHOEF, J.; SCHMITZ, F.J. *MecA* gene is widely disseminated in *Staphylococcus aureus* population. **Journal of clinical microbiology**, v.40, n.11, p. 3970-3975, 2002.

WIERUP, M. Bacteriological examination of urine specimens from non-catheterized and catheterized dogs with symptoms of urinary tract infection. **Nord. Veterinary Medicine**, v.30, p.318-323, 1978.

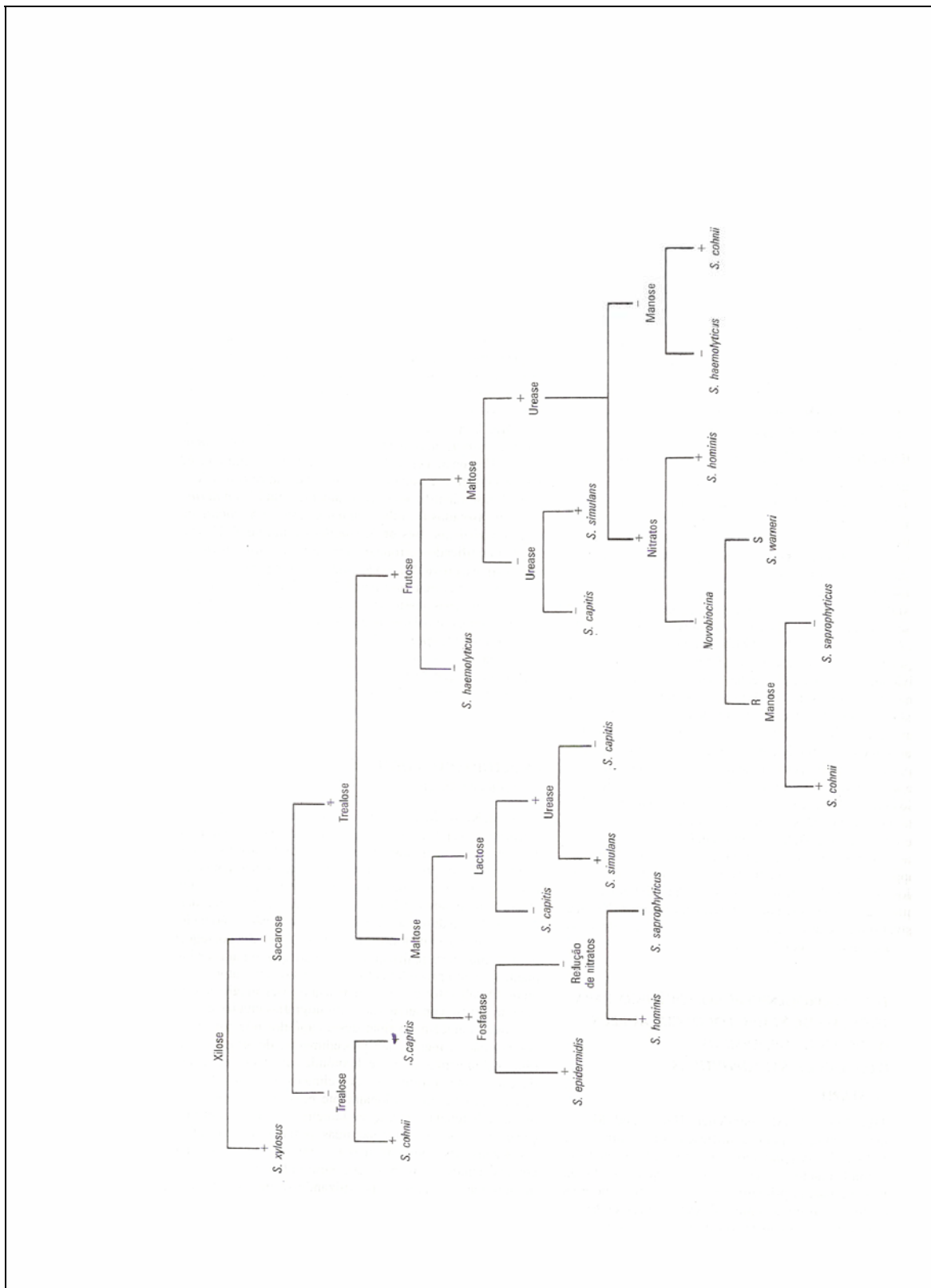
YAMAGUCHI, T.; HASHIKITA, G.; TAKASHASHI, S.; ITABASHI, A.; YAMAZAKI, T.; MAESAKI, S. In vitro activity of β -lactams, macrolide, telithromycin, and fluoroquinolones against clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*: correlation between drug resistance and genetic characteristics. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v.11, p.262-264, 2005.

YORK, M.K.; GIBBS, L.; CHEHAN, F.; BROOKS, G.F. Comparison of PCR detection of *mecA* with standard susceptibility testing methods to determine methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, p.249–253, 1999.

Anexo 01. Testes de identificação das espécies de *Staphylococcus* spp. coagulase-positivos segundo Koneman et al. (2001).

<i>Staphylococcus</i> spp.	Maltose	Caldo Nitratado	VP
<i>S. aureus aureus</i>	+	+	+
<i>S. aureus</i> subsp <i>anaerobius</i>	+	-	-
<i>S. schleiferi</i> subsp <i>coagulans</i>	-	+	+
<i>S. intermedius</i>	+/-	+	-

Anexo 02 Testes de identificação das espécies de *Staphylococcus* spp coagulase-negativos, segundo Koneman e colaboradores (2001).



Anexo 03 Antimicrobianos avaliados nos diferentes sítios infecciosos.

Antibióticos	Sítios de Processos Infecciosos		
	Otite externa	Trato Urinário	Pele
Ampicilina (AMP-10µg)	X	X	X
Amp+sulb (ASB-10/10µg)	X	X	X
Gentamicina (GEN-10µg)	X	X	-
Penicilina G (PEN-10UI)	X	X	X
Oxacilina (OXA-1µg)	X	X	X
Vancomicina (VAN-30µg)	X	-	-
Azitromicina (AZI-15µg)	X	-	X
Cefalotina (CFL-30µg)	X	-	X
Cefotaxima (CTX-30µg)	X	X	X
Ciprofloxacina (CIP-5µg)	-	X	X
Clindamicina (CLI-2µg)	-	-	X
Cloranfenicol (CLO-30µg)	X	-	X
Eritromicina (ERI-15µg)	-	-	X
Nitrofurantoína(NIT-300µg)	-	X	-
Norfloxacina (NOR-10µg)	-	X	-
Enrofloxacina (ENO-5µg)	X	X	X
Ceftriaxona (CEF-30µg)	-	X	-
Amoxicilina (AMX-20µg)	X	X	-
Neomicina (NEO)	X	-	-

Anexo 04 Zonas de inibição avaliadas pelo diâmetro (mm) dos antibióticos utilizados.

Antibióticos	Zonas de inibição		
	Resistente	Intermediário	Sensível
Ampicilina (AMP)	≤28	-	≥92
Amp+sulbactam (ASB)	≤11	12-14	≥15
Gentamicina (GEN)	≤12	13-14	≥15
Penicilina G (PEN)	≤28	-	≥29
Oxacilina (OXA)	≤10	11-12	≥13
Vancomicina (VAN)	≤12	13-14	≥15
Azitromicina (AZI)	≤13	13-14	≥18
Cefalotina (CFL)	≤14	15-17	≥18
Cefotaxima (CTX)	≤14	15-22	≥23
Ciprofloxacina (CIP)	≤15	16-20	≥12
Clindamicina (CLI)	≤14	15-20	≥12
Cloranfenicol (CLO)	≤12	13-17	≥18
Eritromicina (ERI)	≤13	14-22	≥23
Nitrofurantóina (NIT)	≤14	15-16	≥17
Norfloxacina (NOR)	≤12	13-16	≥17
Enrofloxacina (ENO)	≤17	18-21	≥22
Ceftriaxona (CEF)	≤13	14-20	≥21

Anexo 05 Análises Estatísticas: Determinação da CIM para Azitromicina

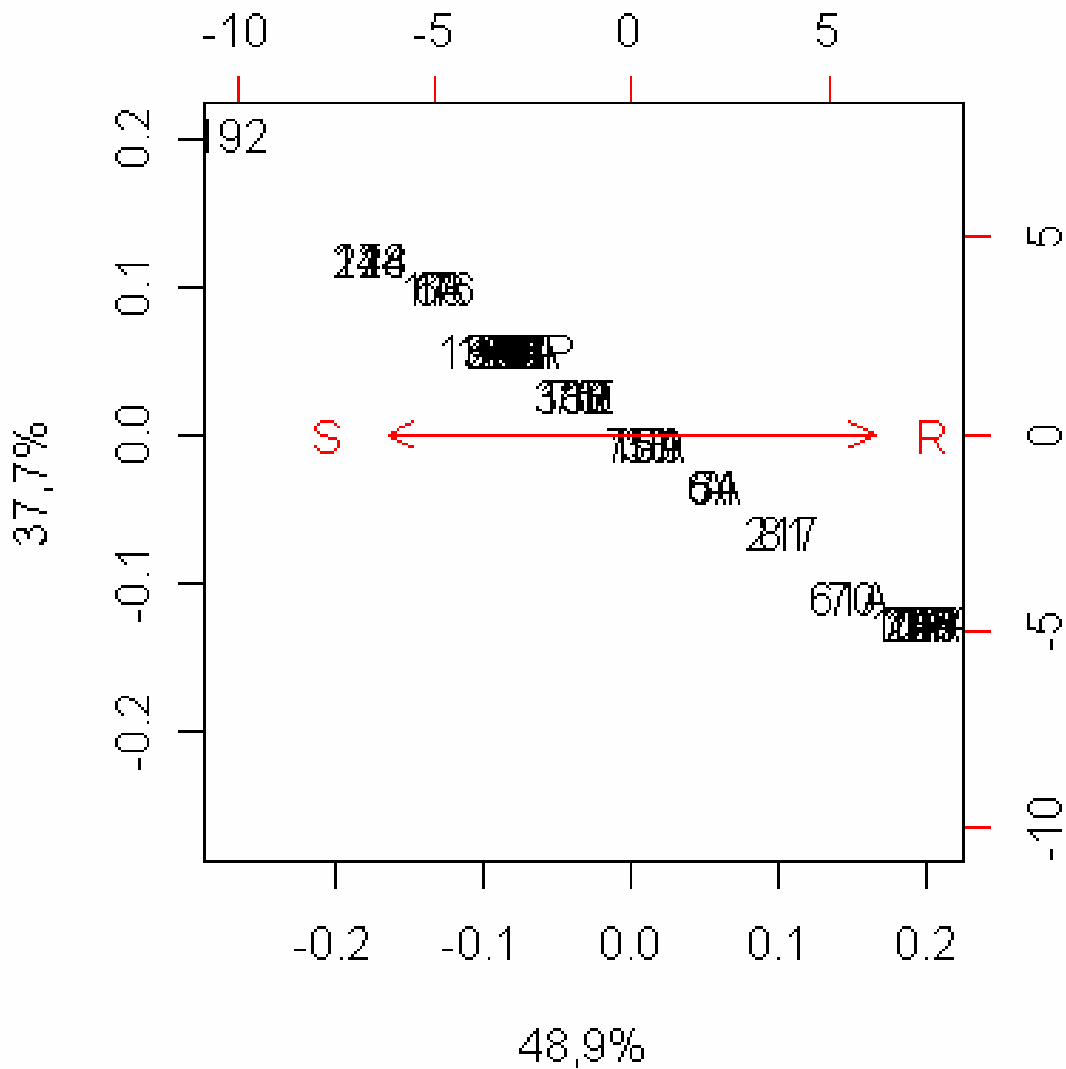
Tabela dos coeficientes para regressão logística dos ensaios de dose-resposta

Tratamento	Coeficiente			
	b	c	d	e
Azitromicina-caldo				
24 horas				
<i>S. intermedius</i>	-0,23666	-0,66894	1,16359	1,18894
<i>S. aureus aureus</i>	-3,382326	0,15328	0,61906	4,697323
ECN	-0,846724	0,250737	1,091044	518,679019
48 horas				
<i>S. intermedius</i>	-0,38385	-0,42329	0,93299	3,31924
<i>S. aureus aureus</i>	-2,0436729	-0,0014044	0,5734700	6,0652258
ECN	-0,389851	0,026587	1,121390	552,921095
Azitromicina-placa				
24 horas				
<i>S. intermedius</i>	-2,91881450	0,00071138	0,82744729	11,62357233
<i>S. aureus aureus</i>	-1,484265	0,057973	0,568590	17,180479
ECN	-1,2648282	-0,0031721	0,7272831	25,3821295
48 horas				
<i>S. intermedius</i>	-2,7225789	-0,0010511	0,8311908	12,6948721
<i>S. aureus aureus</i>	-1,705662	-0,002685	0,555686	14,340468
ECN	-1,0386420	-0,0026846	0,8082957	51,9845778
Bastonetes-placa				
24 horas				
ECN	-1,159846	0,043043	1,233092	251,468650
48 horas				
ECN	-1,067489	0,034290	1,599884	462,078402
Bastonetes-caldo				
24 horas				
ECN	-1,164704	0,046696	1,233013	253,031607
48 horas				
ECN	-1,077964	0,038202	1,587837	457,599596

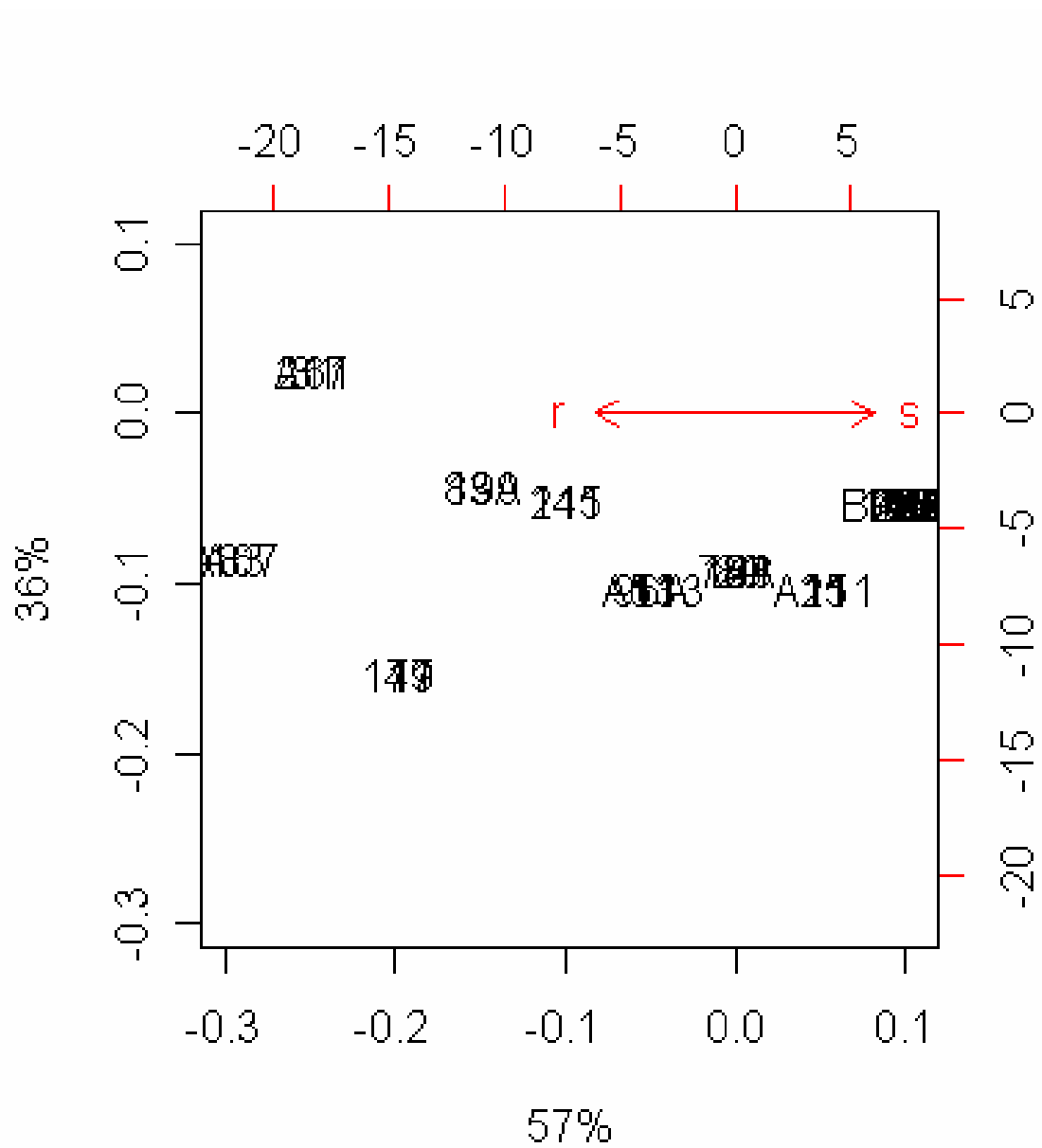
Tabela para valores da CIM

Tratamento	Concentração inibitória mínima ($\mu\text{ ml}^{-1}$)		
	90%	50%	10%
Azitromicina-caldo			
24 horas			
<i>S. intermedius</i>	1281,00	1,18 IC = [1,07; 1,30]	0,0001
<i>S. aureus aureus</i>	8,99	4,69 IC = [4,62; 4,77]	2,45
ECN	6948,32	518,67 IC = [516,32; 519,13]	38,71
48 horas			
<i>S. intermedius</i>	1016,33	3,32 IC = [3,28; 3,41]	0,01
<i>S. aureus aureus</i>	17,77	6,06 IC = [5,88; 6,23]	2,07
ECN	155020,00	552,98 IC = [549,52; 554,65]	1,97
Azitromicina-placa			
24 horas			
<i>S. intermedius</i>	24,67	11,62 IC = [11,53; 11,71]	5,47
<i>S. aureus aureus</i>	75,50	17,18 IC = [17,11; 17,22]	3,90
ECN	144,20	25,38 IC = [24,10; 26,23]	
48 horas			
<i>S. intermedius</i>	28,45	12,70 IC = [12,65; 12,75]	5,66
<i>S. aureus aureus</i>	52,00	14,34 IC = [14,26; 14,41]	3,95
ECN	431,13	51,98 IC = [51,09; 52,43]	6,26
Oxacilina-placa			
24 horas			
<i>S. intermedius</i>	1645,19	16,00 IC = [15,92; 16,07]	0,15
<i>S. aureus aureus</i>	647,00	19,06 IC = [18,95; 19,16]	0,56
ECN	19,09	4,87 IC = [4,32; 5,21]	1,24
48 horas			
<i>S. intermedius</i>	225,62	2,38 IC = [2,30; 2,45]	0,02
<i>S. aureus aureus</i>	1476,32	18,79 IC = [18,68; 18,89]	0,23
ECN	4696,76	30,34 IC = [29,56; 30,89]	0,19
Oxacilina-caldo			
24 horas			
<i>S. intermedius</i>	1,02	0,79 IC = [0,71; 0,88]	0,62
ECN	1,08	0,81 IC = [0,64; 1,12]	0,61
48 horas			
<i>S. intermedius</i>	1,05	0,80 IC = [0,71; 0,89]	0,61
ECN	3,16	0,12 IC = [0,09; 1,15]	0,004
Bastonetes-placa			
24 horas			
ECN	1671,92	251,47 IC = [250,86; 252,03]	37,82
48 horas			
ECN	3619,33	462,07 IC = [461,52; 462,86]	
Bastonetes-caldo			
24 horas			
ECN	1669,07	253,03 IC = [251,43; 258,13]	38,36
48 horas			
ECN	3513,28	457,60 IC = [456,68; 458,09]	59,60

Análise de Correspondência dos isolados nos testes de suscetibilidade à azitromicina



Análise de Correspondência dos isolados nos testes de suscetibilidade à oxacilina



Anexo 06 Tabela das Amostras

Amostras coletadas de cães com otite externa						
Nº	Sexo	Idade	Raça	Sinais Clínicos	Local*	Antibiótico*
02	♂	adulto	SRD	Sc. Purulenta escura	ES	-
11	+	adulto	SRD	Otite crônica recidivante	ES	-
12	♂	adulto	Pastor alem.	Sc. purulenta+hemorrágica+miíase	ES	ENO
15	+	adulto	SRD	Sc. Purulenta	ES	-
20	♂	adulto	Pointer	Sc. Purulenta	ES	-
22	+	adulto	SRD	Edema e sc. Purulenta	ES	-
25	+	adulto	Boxer	Sarna demodécica+sc. purulenta	ES	-
26	+	adulto	SRD	Sc. Purulenta	ES	-
28	♂	adulto	SRD	Sc. Purulenta	ES	-
31	♂	adulto	Dog alem.	Otite média crônica	ES	ENO
41	+	adulto	Pastor alem.	Sc. Purulenta escura	ES	-
53	♂	filhote	Pittbull	Edema hemorragia+sc. purulenta	ES	ENO
54	+	adulto	SRD	Sc. Purulenta	ES	-
55	♂	adulto	SRD	Sc. Purulenta	ES	-
56	♂	adulto	Poodle	Sc. Purulenta	ES	-
58	♂	adulto	Cocker spain.	Otite crônica recidivante	ES	PEN
59	♂	adulto	Poodle	Sc. purulenta	ES	-
60	+	adulto	Dálmata	Sc. Purulenta	ES	-
64	+	filhote	Dashund	Sc. Purulenta	ES	-
65	+	adulto	Lhasa Apsu	Sc. Purulenta	ES	ENO
67	+	adulto	Rottweiler	Otite crônica recidivante	ES	-
72	♂	idoso	Cocker spain.	Sc. Purulenta e miíase	ES	-
75	♂	adulto	Pastor alem.	Sc. Purulenta e miíase	ES	CFX
80	+	adulto	SRD	Sc. escura	ES	-
81	+	filhote	SRD	Sc. Purulenta	ES	-
92	+	adulto	SRD	Otite crônica recidivante	ES	-
93	♂	adulto	Cocker spain.	Otite aguda purulenta	ES	CFX
95	+	adulto	Boxer	Sc. Purulenta escura	ES	ENO
100	♂	adulto	Poodle	Sc. Purulenta escura	ES	-
106	♂	adulto	Beagle	Sc. Purulenta	ES	-
118	♂	filhote	Labrador	Sc. Purulenta escura	ES	-
121	+	adulto	Cocker spain.	Sc. Purulenta	ES	-

Amostras coletadas de animais com infecção da pele

Nº	Espécie	Sexo	Idade	Raça	Sinais Clínicos	Local*	Antibiótico*
04	CAN	+	adulto	SRD	Fístula com sc. purulenta (Mordida)	ES	-
05	CAN	+	adulto	Yorkshire	Ferida lacerante com sc. purulenta	ES	MET
06	FEL	+	adulto	PCB	Fístula secundária miíase	ES	-
16	CAN	+	adulto	Husky	Miíase	ES	-
21	CAN	+	adulto	Pointer	Otohematoma c/ Fístula sc. purulenta	ES	-
18	FEL	+	adulto	Perça	Carcinoma mamário c/ sc. purulenta	ES	-
30	FEL	+	adulto	Ciamês	Pioderma profundo	ES	-
42	CAN	+	adulto	Sharpei	Demodicose e pioderma	ES	-
44	CAN	+	adulto	Chowchow	Pioderma profundo	ES	-
49	CAN	+	adulto	Bulldog ing.	Demodicose c/ pioderma	ES	-
66	CAN	+	adulto	Lhasa apsu	DUA c/ sc purulenta	ES	ENO
70	CAN	+	adulto	SRD	Pioderma profundo	ES	MET
73	CAN	+	adulto	Dashund	Pústulas, crostas e prurido.	ES	-
74	CAN	+	adulto	Labrador	Pústulas	ES	ENO
102	CAN	+	adulto	Poodle	Pio/Pododermite c/ queratose	ES	-
104	CAN	+	adulto	SRD	Pioderma (mordida)	ES	-
105	CAN	+	adulto	SRD	Piodermite e necrose	JW	-
107	CAN	+	adulto	SRD	Pústula	JW	-
109	CAN	+	adulto	SRD	Miíase e sc. purulenta	JW	-
111	CAN	+	adulto	Pittbull	Miíase e sc. purulenta	JW	-
112	CAN	+	adulto	SRD	Carcinoma mamário c/ sc. purulenta	ES	-
117	CAN	+	idoso	Golden Ret	DUA e sc. purulenta	ES	-
6A	FEL	+	adulto	PCB	Lesão purulenta+carcinoma mamário	ES	-
45	FEL	+	adulto	PCB	Pústulas e crostas	JW	-
83A	CAN	+	idoso	SRD	Fístula com secreção purulenta	JW	-
1A	CAN	+	adulto	SRD	Piodermite	JW	-
125	FEL	+	idoso	Perça	Pioderma profundo	JW	-
78A	CAN	+	adulto	SRD	Pioderma	JW	-
111A	CAN	+	adulto	SRD	Miíase e sc. purulenta	JW	-
107A	CAN	+	adulto	SRD	Pioderma profundo com fistulas	JW	-
113A	CAN	+	adulto	Pittbull	Miíase com secreção purulenta	ES	-
126	FEL	+	idoso	PCB	Miíase	ES	-
128	FEL	+	adulto	PCB	Pioderma	ES	-

Amostras coletadas de animais com infecção do trato urinário

Nº	Espécie	Idade	Sexo	Raça	Sinais Clínicos	Local*	EAS	Antibiótico*
01	CAN	adulto	♂	SRD	Obstrução uretral	ES	Bacteriúria	-
09	CAN	idoso	♂	Dog alem	IRC	ES	Cilindros	TER
14	CAN	adulto	+0	SRD	IRC+ Mastocitoma	ES	Bact/nitrito+	-
24	CAN	adulto	+0	SRD	IRC	ES	Cilindros +	-
33	CAN	idoso	♂	Pastor	Nefrose e nefrite	ES	Hematúria	-
34	FEL	adulto	♂	PCB	Urolitíase	ES	Piócitos	-
36	CAN	adulto	♂	SRD	Cistite hemorrágica	ES	Hematúria	-
39	CAN	idoso	♂	Poodle	IRC	ES	Bilirrubinúria	-
40	CAN	adulto	♂	SRD	IRC	ES	Hematúria	-
43	CAN	adulto	♂	SRD	Nefrite	ES	Piocitose	MET/CEF/ENO
45	FEL	idoso	♂	Perça	Cistite e urolitíase	JW	-	-
46	CAN	filhote	♂	Pittbull	IRC recidivante	ES	-	CEF/AMC
47	CAN	adulto	♂	Dog alem.	Cistite hematúria	ES	Hematúria	CEF
48	CAN	adulto	♂	SRD	Cistite	ES	Piúria/nitrito	-
50	CAN	adulto	+0	SRD	IRC + erlichiose	ES	-	DOX
61	CAN	adulto	♂	SRD	Nefrite	ES	-	DOX
62	CAN	idoso	+0	Pastor ale.	Cistite	ES	Bacteriúria	-
63	CAN	adulto	♂	SRD	Nefrite+erlichiose	ES	-	-
68	CAN	filhote	+0	Dashund	Cistite	ES	-	DOX
69	CAN	idoso	♂	Cocker sp.	Cistite hemorrág.	ES	-	-
76	CAN	adulto	+0	Poodle	Cistite	ES	Bacteriúria	-
77	CAN	idoso	♂	Husky	IRC+carcinoma hep.	ES	-	-
78	CAN	idoso	+0	Cocker sp.	Cistite	ES	Bacteriúria	-
79	CAN	idoso	♂	Boxer	CISTITE	JW	Bacteriúria	ENO
82	CAN	idoso	+0	Golden Re	IRC	JW	-	ENO
86	FEL	adulto	♂	PCB	Urolitíase	ES	-	CTX/MET
84	CAN	idoso	♂	Pastro ale.	Cistite e prostatite	ES	Nitrito +++	-
85	CAN	idoso	♂	Poodle	Cistite piocitose	ES	Piócitos	-
86	FEL	adulto	♂	PCB	Cistite e urolitíase	ES	Piócitos	ENO
87	CAN	idoso	+0	Boxer	IRC	ES	-	-
88	CAN	idoso	+0	Doberman	Cistite	ES	-	-
89	CAN	adulto	+0	SRD	Urolitíase	ES	-	TER
96	CAN	filhote	♂	Pittbull	IRC recidivante	JW	Piócitos+Bact	DOX/ENO/AMX
97	FEL	adulto	♂	PCB	Cistite e urolitíase	JW	Bacteriúria	-
98	CAN	adulto	+0	Poodle	Cistite	JW	Bacteriúria	-
101	CAN	filhote	♂	Cocker sp.	Cistite	JW	-	-
119	FEL	adulto	♂	Perça	Urolitíase	ES	Urato amônia	-
120	CAN	filhote	♂	Dálmata	Cistite	JW	-	-
122	FEL	adulto	♂	PCB	Urolitíase	JW	-	-
133	FEL	adulto	♂	PCB	Urolitíase	JW	-	-
134	FEL	adulto	♂	PCB	Cistite	JW	-	-
135	FEL	adulto	♂	PCB	Cistite hemorrágica	JW	-	-
141	FEL	adulto	+0	PCB	Cistite	JW	-	-
143	FEL	adulto	♂	Ciamês	IRC	ES	-	-
146	CAN	adulto	♂	Poodle	Cistite hemorrágica	ES	-	-
140	CAN	idoso	+0	SRD	Cistite	ES	Bacteriúria	-
144	FEL	idoso	♂	PCB	Cistite	ES	Bacteriúria	-
150	FEL	adulto	♂	PCB	Obstrução uretral	ES	-	-
151	FEL	adulto	♂	PCB	Obstrução uretral	ES	-	-

Nº	Espécie	Sexo	Idade	Raça	Sinais Clínicos	Local*	Antibióticos*
Infecções uterinas em cadelas							
03	CAN	♀	adulto	Pastor alemão	Piometra	ES	MET
13	CAN	♀	adulto	Poodle	Piometra	ES	ENO/DOX/MET
23	CAN	♀	adulto	Poodle	Piometra	ES	ENO/DOX/MET
52	CAN	♀	adulto	Rottweiler	Piometra+vulvovaginite	ES	-
57	CAN	♀	adulto	SRD	Piometra	ES	ENO/PEN
90	CAN	♀	adulto	SRD	Piometra+Vulvovaginite	ES	TER
Infecções da Mucosa Conjuntival							
07	CAN	♀	adulto	Weimaraner	Conjuntivite+miíase	ES	ENO
51	CAN	♀	idoso	Rottweiler	Conjuntivite+sc purulenta	ES	-
103	CAN	♀	filhote	beagle	Uveíte+conjuntivite	ES	-
108	CAN	♀	adulto	SRD	Uveíte+conjuntivite	JW	-
110	CAN	♀	filhote	SRD	Uveíte traumática	ES	-
114	CAN	♀	filhote	SRD	Uveíte+conjuntivite	ES	-
116	CAN	♀	filhote	SRD	Conjuntivite	ES	MET
54A	CAN	♀	adulto	Husky	Miíase	JW	-
75A	CAN	♀	filhote	Beagle	Uveíte	JW	-
82A	CAN	♀	adulto	SRD	Uveíte traumática	JW	-
96A	CAN	♂	filhote	SRD	Uveíte	JW	-
104A	CAN	♀	adulto	SRD	Uveíte traumática	JW	-
41A	CAN	♀	adulto	beagle	Uveíte	JW	-
Infecções do Trato respiratório							
08	CAN	C	adulto	Waimaraner	Sec nasal purulenta+miíase	ES	ENO
35	CAN	♀	idoso	poodle	Bronquite+efusão pleural opaca	ES	DOX/AMP
38	CAN	♀	idoso	poodle	Bronquite+efusão pleural opaca	ES	DOX/AMP
115	CAN	♀	adulto	SRD	Sec nasal purulenta	ES	-
108	CAN	♂	adulto	Poodle	Bronquite+efusão pleural opaca	ES	-
26	CAN	♂	adulto	Weimaraner	Sec nasal purulenta+miíase	ES	-
Infecções da Cavidade Oral							
17	CAN	♀	adulto	husky	Miíase na mucosa oral	ES	-
19	CAN	♀	adulto	pittbull	Abcessos gengivais	ES	-
114'	CAN	♀	idoso	SRD	Periodontite	ES	-
32	CAN	♀	filhote	SRD	Periodontite	JW	-
27A	CAN	♀	adulto	SRD	Abcesso gengival	JW	-
94	CAN	♂	adulto	SRD	Periodontite	JW	MET
99	CAN	♀	adulto	SRD	Periodontite	JW	-
113	CAN	♂	adulto	SRD	Periodontite	JW	-
120	CAN	♂	adulto	SRD	Periodontite	JW	-
124	CAN	♂	adulto	SRD	Periodontite	JW	-
125	CAN	♂	adulto	SRD	Periodontite	JW	-

CAN: espécie canina, FEL: espécie felina, Filhote: animais com idade até 1 ano e seis meses, Adulto: animais cm idade até sete anos, Idoso: animais com idade acima de sete anos, ♂: sexo masculino, ♀: sexo feminino, SRD: cães sem raça definida, PDB: felinos pêlo curto brasileiro, * instituição de coleta da amostra, * antibioticoterapia realizada antes da coleta das amostras, JW: Instituto Veterinário Municipal Jorge Waitsman, ES: Universidade Estácio de Sá.