



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**ESTUDO RETROSPETIVO DO PERFIL DE RESISTÊNCIAS A ANTIBIÓTICOS EM
ISOLADOS BACTERIANOS COM ORIGEM EM ANIMAIS DE COMPANHIA (2019 A 2021)**

Filipa Catarina Francisco Fontes

Coimbra, abril de 2022



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Estudo retrospectivo do perfil de resistências a antibióticos em isolados bacterianos com origem em animais de companhia (2019 a 2021)

Coimbra, abril de 2022

Filipa Catarina Francisco Fontes

Aluna do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Constituição do Júri

Presidente do Júri:

*Professora Doutora Maria Eduarda Moreno da
Silveira*

Arguente:

*Professora Doutora Anabela Maduro de Almeida
Francisco*

Orientador:

Professora Doutora Sofia Ferreira Anastácio

Orientador Interno

Prof^a. Dr^a. Sofia Ferreira Anastácio

Coorientador Interno

Mestre José Ricardo Cabeças

Orientador Externo

Dr. Marcelo Santos
(Planeta Animal-Clinica Veterinária)

Dissertação de Estágio Curricular do Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Mestre em
Medicina Veterinária da EUVG

Agradecimentos

Não posso deixar de considerar a minha passagem pela EUVG que me deu a oportunidade de conhecer pessoas fantásticas, docentes com grande conhecimento, os quais não vou esquecer.

A escolha que fiz para a orientação da tese, revelou ter sido a melhor, obrigada à Professora Sofia Anastácio pela ajuda incansável em tantas tarefas desde a escolha do tema, às correções, e sugestões, por todo o apoio e ajuda sem hora de início ou fim.

Ao Professor Ricardo Cabeças pela prontidão com que disse “*sim podes contar comigo*”.

À grande equipa da Clínica Planeta Animal que tão bem me recebeu e me fez sentir em casa, obrigada pelos momentos de diversão aconchegados com doces ou salgados.

Um especial agradecimento ao Dr. Marcelo pela oportunidade de aprender com o primeiro veterinário que conheci e que tanto admiro!

À clínica Animal, que desde sempre faz parte do meu percurso e crescimento, porque foi pela dedicação a esta empresa que me meti nisto.

Meninas do “6 years a slave to education” (Nês, Nesa, Babs, Lixia, Bibs), chegaram finalmente ao fim os 6 anos mais custosos das vossas vidas, foi um prazer enorme conhecer-vos, obrigada pela partilha de emoções e experiências, estamos juntas.

Ana, Sara, Márcia e Maria, as mais parecidas comigo na vida, fizeram-me perceber que não era a única nesta escolha doida, depois dos trinta.

Ao meu filho Dinis a força que me move diariamente e ao Daniel, o impulsionador desta conquista, os dois homens que estão sempre à minha espera e que aturaram o meu *stress* pré e pós exames, as horas de pouco sono, o trabalho sem hora para acabar, apoio sem limites. Lia, Niki, Kiko (velho), Xana e Chico, os meus bichos, que estão sempre lá sem exigirem quase nada, só comidinha.

Aos meus pais, que apesar das diferenças, sei que posso contar com eles, maninho e cunhadinha, o apoio dos emigras que tanto aquece o coração, aos avós que já não estão presentes, mas que sei que seria um motivo de orgulho.

À Tânia, amiga de longa data, obrigada pelo apoio incondicional desde há tantos anos e por estares sempre aí.

Gusta, obrigada pelas sextas à noite, pelos lanches de domingo e pela paciência com o Nini.

Dr. João obrigada por acreditar e arriscar neste projeto.

A tantos outros que de uma forma ou de outra contribuíram direta ou indiretamente para me atirar de cabeça áquilo que não era um sonho, mas passou a ser.

ÍNDICE GERAL

Lista de Abreviaturas e símbolos -----	viii
Resumo -----	ix
Abstract -----	x
Introdução -----	2-6
Material e Métodos -----	6
Resultados -----	7-15
a) Caracterização dos isolados -----	7
a.1) Isolados em cães -----	9
a.2) Isolados em gatos -----	9
b) Análise do perfil de resistência -----	12
b.1) Perfil de resistências em agentes bacterianos isolados em cães -----	12
b.2) Perfil de resistências em agentes bacterianos isolados em gatos -----	13
c) Perfil de resistências antibacteriana em isolados mais frequentes -----	13
d) Perfil de resistências ao longo dos três anos do estudo -----	15
Discussão -----	15
Conclusão -----	17
Referências -----	18
Anexo I -----	I
Anexo II -----	III

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Percentagem de amostras estudadas nas espécies cão e gato -----	7
Gráfico 2: Frequência relativa de amostras biológicas de acordo com o tipo e com a espécie animal (n=182) -----	8
Gráfico 3: Frequência de bactérias isoladas na totalidade das amostras -----	8
Gráfico 4: Percentagem de bactérias isoladas de acordo com coloração de Gram, por espécie -----	9
Gráfico 5: Perfil fenotípico relativamente ao TSA dos agentes bacterianos isolados em amostras biológicas mais frequentes em cães -----	12
Gráfico 6: Perfil fenotípico relativamente ao TSA dos agentes bacterianos isolados em amostras biológicas mais frequentes em gatos -----	13

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Percentagem de agentes bacterianos isolados nos diferentes tipos de amostras biológicas, em cães -----	10
Tabela 2: Percentagem de agentes bacterianos isolados nos diferentes tipos de amostras biológicas, em gatos -----	11
Tabela 3: Percentagem de resistências aos antibióticos em <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> isoladas em amostras clínicas de cães e gatos -----	14
Tabela 4: Frequência relativa dos perfis de resistência de agentes isolados em cães ao longo do período de estudo -----	15
Tabela 5: Frequência relativa dos perfis de resistência de agentes isolados em gatos ao longo do período de estudo -----	15

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ECDC: do inglês *European Centre for Disease Prevention and Control* (Europeu de Controlo de Doenças)

EFSA: do inglês *European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia de Segurança Alimentar)

EMA: do inglês *European Medicines Agency* (Agência Europeia do Medicamento)

ESBL: do inglês *Extended-spectrum β -lactamase* (beta-lactamase de espectro alargado)

IC: Intervalo de Confiança

ITU: Infecção trato urinário

MRSA: *Staphylococcus aureus* metilicina resistente

MRSP: *Staphylococcus pseudintermedius* metilicina resistente

n: número

OIE: *Office International des Epizooties - World Organization for Animal Health* (Organização Mundial para a Saúde Animal)

p: valor de significância

PBP: do inglês *Penicilin binding proteins*

THG: Transferência horizontal de genes

TSA: Teste de susceptibilidade a antibióticos

WHO: do inglês *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)

%: percentagem

RESUMO

Ao longo dos últimos anos, a proporção de agentes bacterianos resistentes a múltiplos antibióticos tem aumentado de forma significativa. Acresce que a importância clínica das resistências adquiridas é uma preocupação em bactérias patogênicas com interesse em medicina veterinária e com implicações em saúde pública.

Um estudo retrospectivo foi realizado na Clínica Veterinária Planeta Animal, em Aveiro, com o objetivo de caracterizar o perfil de resistências a antibióticos em bactérias isoladas em cães e gatos, a partir de dados obtidos em boletins analíticos num período de três anos (2019-2021).

Em cães, as amostras mais comuns foram zaragoas auriculares (21,6%; IC 95%: 15,9-28,3) e urina (20,3%; IC 95%: 14,9-27,1). Em amostras de urina, *Escherichia coli* (46%; IC 95%: 31,0-61,6) foi o principal agente isolado. Contudo, em zaragoas auriculares, *Pseudomonas aeruginosa* (30%; IC 95%: 18,1-45,4) e *Staphylococcus pseudintermedius* (30%; IC 95%: 18,1-45,4) foram *in ex aequo* os agentes mais comuns. Um perfil de multirresistência foi ainda observado em 46% e 40% dos isolados em urina e zaragatoa auricular, respetivamente. Em gatos, a urina (15,4%; IC 95%: 10,6-21,6), zaragatoa cutânea (9,9%; IC 95%: 6,1-15,4) e zaragatoa nasal (8,8%; IC 95%: 4,9-13,5) foram as amostras mais frequentes. Relativamente às amostras de urina, *Escherichia coli* foi a bactéria mais frequente (46%). Em zaragoas cutâneas, a bactéria mais comum foi *Staphylococcus chromogenes* (16,7%; IC 95%: 5,8-39,2) tal como em zaragoas nasais (26,7%; IC95%: 10,9-52,0%). Um perfil de multirresistência foi observado em 61% dos agentes isolados em amostras de urina e em 40% dos agentes isolados em zaragatoa nasal. Já em amostras de zaragatoa cutânea, apenas 11% de agentes isolados apresentaram um perfil de multirresistência.

A frequência de resistências não sofreu alterações significativas ao longo do período de estudo.

PALAVRAS-CHAVE: Teste de Susceptibilidade a Antibióticos, resistência fenotípica, cão, gato.

ABSTRACT

Over the past years, the proportion of bacterial agents resistant to multiple antibiotics has increased significantly. Furthermore, the clinical importance of acquired resistance is a concern in pathogenic bacteria of veterinary interest with implications for human health.

A retrospective study was conducted at Planeta Animal veterinary clinic, in Aveiro, aiming to characterize antimicrobial susceptibility patterns in bacteria isolated from dogs and cats from data obtained in laboratory analytical reports over a three-year period (2019-2021).

In dogs, the most common samples were ear swabs (21,6%; IC 95%: 15,9-28,3) and urine (20,3%; IC 95%: 14,9-27,1). In urine samples, *Escherichia coli* (46%; IC 95%: 31,0-61,6) was the major isolated agent. However, in ear swabs *Pseudomonas aeruginosa* (30%; IC 95%: 18,1-45,4) and *Staphylococcus pseudointermedius* (30%; IC 95%: 18,1-45,4) were *in ex aequo* the most common agents. A multi-resistant profile was observed in 46% and 40% of isolates from urine and ear swabs respectively.

In cats, urine (15,4%; IC 95%: 10,6-21,6), skin swabs (9,9%; IC 95%: 6,1-15,4) and nasal swabs (8,8%; IC 95%: 4,9-13,5) were the most common samples. Regarding urine samples, *Escherichia coli* was the most frequent bacterium (46%). In skin swabs the most common bacterium was *Staphylococcus chromogenes* (16,7%; IC 95%: 5,8-39,2) as well as in nasal swabs (26,7%; IC95%: 10,9-52,0%). A multi-resistant profile was detected in 61% bacteria isolated from urine samples and in 40% of bacteria isolated from nasal swabs. Concerning skin swabs, only 11% of isolated bacteria presented a multi-resistant profile.

The frequency of resistance did not change significantly over the study period.

KEYWORDS: Antimicrobial Susceptibility Testing, Phenotypic resistance, Dog, Cat.

Estudo retrospectivo do perfil de resistências a antibióticos em isolados bacterianos com origem em animais de companhia (2019 a 2021)

Filipa Fontes^a, Marcelo Santos^b, José Ricardo Cabeças^a, Sofia Anastácio^{a,c}

^a Departamento de Ciências Veterinárias, Escola Universitária Vasco da Gama e Centro de Investigação Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário- Bloco B, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal (filipa.fontes@live.com.pt, ricardo.cabeças@euvg.pt, sofia.anastacio@euvg.pt)

^b Clínica Veterinária Planeta Animal, Aveiro

^c Centre for Innovative Biomedicine and Biotechnology, University of Coimbra, Coimbra, Portugal (sofia.anastacio@euvg.pt)

INTRODUÇÃO

As bactérias são microrganismos unicelulares, procariotas, metabolicamente ativos e que apresentam uma replicação por fissão binária (Baron, 1996; Quinn *et al.*, 2016). Muitas bactérias encontram-se no meio ambiente, outras são comensais em organismos vivos, como animais ou humanos, constituindo uma parte do seu microbiota natural; e apenas algumas são causadoras de infecções, sendo designadas de patogênicas (Baron, 1996). A replicação descontrolada de bactérias patogênicas num hospedeiro está normalmente associada a uma falha dos mecanismos de defesa intrínsecos, conduzindo a uma infecção bacteriana que se traduz pela ocorrência de doença (WHO, 2021).

A descoberta de substâncias inibidoras do crescimento bacteriano, os antibióticos, foi um marco importante na história da humanidade (Reygaert, 2018; Lerminiaux & Cameron, 2019). Os primeiros antibióticos clinicamente bem-sucedidos foram as sulfonamidas desenvolvidas, em 1935, por Paul Ehrlich na sequência do seu trabalho com corantes sintéticos. Foi, contudo, a descoberta da penicilina, em 1928, por Alexander Fleming que iniciou a “Era dos Antibióticos”. Fleming verificou que numa cultura de *Staphylococcus aureus* contaminada por um fungo as colónias bacterianas se encontravam lisadas. Esta observação conduziu à descoberta do primeiro antibiótico de origem natural, a Penicilina, com origem no fungo *Penicillium notatum*. Durante a Segunda Guerra Mundial, este antibiótico foi utilizado de forma massiva tendo permitido salvar muitas vidas, e tendo estimulado a pesquisa de mais antibióticos (Prescott, 2013).

Os antibióticos podem ser classificados de acordo com i) a origem, ii) o espectro de ação, iii) o tipo de atividade, e iv) o mecanismo de ação. Os antibióticos de origem natural são obtidos a partir de microrganismos produtores de metabolitos inibidores da replicação bacteriana. A origem semissintética está associada à existência de uma modificação química de substâncias antibacterianas com origem natural. Os antibióticos com origem exclusivamente sintética (*i.e.*, síntese química) são menos frequentes (Prescott, 2013; OIE, 2021). O espectro de ação dos antibióticos pode ser estreito (*e.g.*, bacitracina em bactérias de Gram negativo e eritromicina em bactérias de Gram positivo) ou largo (*e.g.*, tetraciclina em bactérias de Gram positivo e negativo). Quanto ao tipo de atividade os antibióticos podem ser bacteriostáticos ou bactericidas. Esta distinção depende do antibiótico e também da sua concentração. Os antibióticos bactericidas inativam a bactéria a uma concentração próxima da que provoca uma inibição do crescimento, enquanto os antibióticos bacteriostáticos inibem o crescimento em concentrações inferiores e apenas em concentrações mais elevadas inativam o agente bacteriano (Songer, 2005; Prescott, 2013). O mecanismo de ação dos antibióticos diferencia-se em quatro categorias: i) inibição da síntese da parede celular, ii) alteração da função da membrana celular, iii) inibição da síntese ou da função de ácidos nucleicos, e iv) inibição da síntese de proteínas (Prescott, 2013; Reygaert, 2018).

As bactérias de Gram positivo apresentam uma parede celular constituída por uma camada espessa de peptidoglicanos que confere rigidez à célula e mantém elevada a pressão osmótica intracelular. Nas bactérias de Gram negativo esta camada é mais fina e a pressão osmótica intracelular é mais baixa. Os antibióticos beta-lactâmicos impedem a formação das ligações transpeptídicas cruzadas na parede

celular, inibindo a sua síntese e criando pontos de fragilidade na sua estrutura (Prescott, 2013; Quinn *et al.*, 2016). Neste grupo incluem-se as penicilinas e cefalosporinas (beta-lactâmicos), a bacitracina e a vancomicina. As *penicilin-binding proteins* (PBP) que são muitas vezes transpeptidases responsáveis pela formação de parede celular, durante a divisão e crescimento celular, são um alvo destes antibióticos. Existem diferentes PBP e diferentes afinidades de antibióticos, o que explica a variação no espectro de ação de antibióticos beta-lactâmicos (Prescott, 2013; Reygaert, 2018). Na síntese da parede celular ocorrem ainda alguns mecanismos degradativos promovidos por autolisinas. Algumas moléculas da classe das penicilinas atuam também na diminuição da inibição normal das autolisinas (Prescott, 2013). A maior atividade de beta-lactâmicos em bactérias de Gram positivo deve-se à maior quantidade de peptidoglicanos, à maior pressão osmótica intracelular nestas bactérias, e também ao facto de em bactérias de Gram negativo se verificar uma impermeabilidade associada aos lipopolissacáridos e lípidos exteriores, e ainda à presença de beta-lactamases (Prescott, 2013; Reygaert, 2018). A boa atividade das penicilinas e cefalosporinas mais recentes frente a bactérias de Gram negativo, deve-se à maior capacidade para entrar nas células e ligar-se a PBPs; e também à capacidade para resistir a uma variedade de beta-lactamases presentes no espaço periplasmático. O desenvolvimento de substâncias inibidoras de beta-lactamases, sem actividade antibacteriana intrínseca, como ácido clavulânico e sulbactano, permitiu a sua associação a amoxicilina ou ticarcilina alargando o seu espectro de ação através da neutralização de enzimas que de outra forma as degradariam (Prescott, 2013).

A função reguladora da membrana celular fica comprometida com antibióticos que alteram a função da membrana celular (*e.g.*, polimixina), permitindo a saída de constituintes celulares (*e.g.*, proteínas, iões ou nucleótidos) que levam à lesão e morte celular (Prescott, 2013).

Os antibióticos que interferem com a síntese de ácidos nucleicos ligam-se ao ácido desoxirribonucleico (ADN) e inibem a replicação ou a transcrição (*e.g.*, nitrofuranos, ácido nalidíxico, fluoroquinolonas, sulfonamidas, trimetoprim) (Prescott, 2013).

A inibição da síntese proteica ocorre pela ação ao nível ribossomal na subunidade 30S (*e.g.*, tetraciclina e aminoglicosídeos) ou 50S (*e.g.*, cloranfenicol, macrólidos, lincosamidas) (Prescott, 2013; Quinn *et al.*, 2016).

O sucesso da terapia com antibióticos em infeções bacterianas depende de vários fatores. Se a existência de resistências intrínsecas deve ser considerada, também a aquisição de resistências por parte das bactérias não deve ser descurada (Songer, 2005; Quinn *et al.*, 2016; Reygaert, 2018). Na sequência do “entusiasmo” associado à disponibilidade de antibióticos para o controlo de infeções, percebeu-se que as bactérias são capazes de desenvolver, adquirir e disseminar numerosos mecanismos de resistência. Já em 1945, Fleming alertou a comunidade científica sobre a possibilidade de desenvolvimento de resistências aos antibióticos por parte das bactérias (WHO, 2014; Mohr, 2016). Ao longo do tempo, tem-se verificado que a cada descoberta de um novo antibiótico, segue-se a descoberta do desenvolvimento de mecanismos de resistência à sua ação (Goossens, 2009; WHO, 2014).

Os mecanismos de resistência a antibióticos sistematizam-se em i) limitar o *uptake* do antibiótico, ii) modificar o alvo do antibiótico, iii) inativar o antibiótico e iv) ativar bombas de efluxo. A resistência intrínseca pode ocorrer por limitação do *uptake* do antibiótico, inativação do antibiótico e ativação de bombas de efluxo. A resistência adquirida pode ocorrer por modificação do alvo do antibiótico, inativação do antibiótico e ativação de bombas de efluxo. As bactérias de Gram negativo podem usar os quatro mecanismos enquanto as bactérias de Gram positivo raramente recorrem à limitação do *uptake* do antibiótico e não têm capacidade para determinados mecanismos de efluxo (Reygaert, 2018). A resistência intrínseca é determinada por genes em cromossomas bacterianos, estando relacionada com a fisiologia da célula bacteriana, como a complexidade da parede celular, com a existência de mecanismos de efluxo ou com sistemas de inativação enzimática de um antibiótico (Quinn *et al.*, 2016). A resistência adquirida pode ocorrer por mutação ou por aquisição de elementos genéticos (Songer, 2005; Quinn *et al.*, 2016). De facto, as bactérias conseguem transferir entre si genes que as tornam resistentes a antibióticos. Esta transferência de material genético, designada de transferência horizontal de genes (THG), pode transformar bactérias que antes eram sensíveis em superbactérias resistentes a antibióticos (Hiltunen *et al.*, 2017; Mobarki *et al.*, 2019; Evans *et al.*, 2020). A THG pode ocorrer tanto entre bactérias filogeneticamente próximas como entre bactérias filogeneticamente distantes (Lerminiaux & Cameron, 2019).

Os mecanismos de THG são i) transformação, ii) transdução, iii) conjugação, e iv) transposição. A transformação ocorre quando o ADN libertado por uma célula bacteriana é adquirido por outra célula diretamente do meio, com a inserção no novo genoma por recombinação. Na transdução, um bacteriófago transfere genes de resistência entre bactérias, ocorrendo normalmente entre membros da mesma espécie. A conjugação envolve a transferência de ADN na sequência do contacto célula com célula através dos *pili*. Este processo pode resultar na troca de genes de resistência de cromossomas ou de plasmídeos (Songer, 2005; Lerminiaux & Cameron, 2019). A transposição ocorre através da ação de transposões, classificados como elementos genéticos móveis. Estes elementos genéticos inserem-se no ADN bacteriano independentemente da ocorrência de recombinação, uma vez que não requerem a presença de uma sequência homóloga na cadeia recetora. Os transposões podem mover-se entre plasmídeos explicando o progressivo desenvolvimento de múltiplos fenótipos de resistência a antibióticos (Songer, 2005). A THG, em contexto clínico, ocorre primariamente por conjugação apesar de estudos *in vitro* demonstrarem a transformação e a transdução como mecanismos que podem contribuir para a disseminação de genes de resistência (Lerminiaux & Cameron, 2019).

Historicamente, muitas doenças bacterianas eram tratadas com base na experiência clínica e o tratamento empírico era dirigido ao agente bacteriano que se pensava ser causador da infeção. (Songer, 2005). Sabe-se hoje que o amplo e, muitas vezes indiscriminado, uso de antibióticos pode conduzir à seleção de bactérias com resistência intrínseca que, por sua vez, podem transferir material genético a outras bactérias conferindo capacidade de resistência às bactérias recetoras. Ao longo dos últimos anos, a proporção de agentes bacterianos resistentes a múltiplos antibióticos aumentou de forma significativa (Songer, 2005; Lerminiaux & Cameron, 2019). A importância clínica das resistências

adquiridas constitui uma preocupação em bactérias patogênicas com interesse veterinário com implicações na saúde humana (Prescott, 2013; OIE, 2022). A resistência a antibióticos continua a emergir, a diversificar e a disseminar-se rapidamente constituindo um grande desafio nos cuidados de saúde (Quinn *et al.*, 2016; Lerminiaux & Cameron, 2019; ECDC, 2021; WHO, 2021). Populações de bactérias resistentes disseminam-se quando os antibióticos exercem uma pressão seletiva que favorece a resistência. Por outro lado, os antibióticos eliminam as bactérias suscetíveis, reduzindo a competição e favorecendo os recursos disponíveis para bactérias resistentes (Mobarki *et al.*, 2019; Lerminiaux & Cameron, 2019).

A presença de vários genes de resistência em plasmídeos e elementos móveis frequentemente permite à bactéria tornar-se resistente a vários antibióticos de diferentes classes. Este tipo de resistência pode ser rapidamente transferido entre géneros bacterianos originando isolados multirresistentes (Quinn *et al.*, 2016).

A resistência adquirida a penicilinas é frequente em estafilococos coagulase positivos. Recentemente, a emergência de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e, em cães, de *Staphylococcus pseudointermedius* meticilina resistentes (MRSP) tem causado preocupação (Bertelloni, 2021).

Também em bactérias da família *Enterobacteriaceae*, como *Salmonella* spp. e *Escherichia coli*, o problema associado a resistências adquiridas tem causado preocupação. O desenvolvimento de resistência é particularmente importante entre bactérias entéricas nos animais. O intestino é um local importante na transferência de genes de resistência devido à concentração, à diversidade bacteriana, à administração oral de antibióticos e à disseminação de bactérias em ambientes fortemente contaminados (Prescott, 2013).

As bactérias resistentes a antibióticos presentes em animais podem transferir genes de resistência a outras bactérias que afetam a população humana (Prescott, 2013). Apesar de uma grande percentagem de bactérias resistentes a antibióticos isoladas em infeções humanas terem origem na utilização de antibióticos em medicina humana; bactérias resistentes a antibióticos de origem animal, como *Enterococcus* spp., *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. podem colonizar o intestino do Homem. Além disso, a contaminação da carne por bactérias intestinais em matadouro pode ser uma via importante de difusão de bactérias resistentes aos humanos (Prescott, 2013; ECDC, 2021).

A multirresistência corresponde à capacidade de uma bactéria ser resistente a pelo menos um antibiótico de pelo menos três classes distintas (Awosile *et al.*, 2018). A emergência de bactérias multirresistentes, como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina, bactérias da família *Enterobacteriaceae* produtoras de beta-lactamases de espectro alargado (ESBL), é uma preocupação crescente ao nível mundial (ECDC, 2021).

De acordo com a *World Health Organization* (WHO), a prevenção e o controlo das resistências a antibióticos contemplam cinco aspetos essenciais: i) realização, sempre que possível, de cultura e Teste de susceptibilidade a antibióticos (TSA), ii) prescrição de antibiótico apenas quando necessário, iii) administração de antibiótico na dose correta e duração adequada do tratamento, iv) aplicação de

medidas de higiene das mãos, materiais e instrumentos; v) manutenção do estatuto vacinal da população (WHO, 2021).

O uso racional de antibióticos tem sido uma preocupação crescente nas décadas mais recentes. Designadamente, em 2006, foi implementado o regulamento comunitário que proibiu o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento (Regulamento CE n.º 1831/2003). Mais recentemente, o uso de antibióticos em animais de companhia é estritamente controlado e regulamentado pelas agências competentes (Regulamento UE 2019/6).

A resistência antimicrobiana é um problema de saúde pública global, interferindo com a eficácia dos antibióticos e conduzindo à aplicação de medidas de restrição na utilização destes fármacos. A importância do isolamento bacteriano associado à realização de um TSA é cada vez maior (Mobarki *et al.*, 2019). Acresce ainda a necessidade de vigilância permanente dos perfis de resistência de isolados bacterianos que circulam nas populações (WHO, 2021).

O presente estudo teve como objetivos i) caracterizar os isolados bacterianos obtidos em amostras clínicas de cães e gatos, entre 2019 e 2021, em Aveiro; ii) analisar o perfil de suscetibilidade a antibióticos dos isolados; e iii) comparar os resultados obtidos com outros estudos realizados.

MATERIAL E MÉTODOS

De forma a concretizar os objetivos propostos, foi delineado um estudo observacional descritivo com carácter retrospectivo. A obtenção dos dados necessários foi concretizada mediante a consulta dos boletins analíticos laboratoriais de análises bacteriológicas em amostras biológicas de cães e gatos, testados entre janeiro de 2019 e dezembro de 2021. A consulta foi realizada mediante consentimento da Direção Clínica Planeta Animal (Anexo I) e aprovação da Comissão de Ética da EUVG (CEN001_2022).

O critério de inclusão para o estudo foi o isolamento de um agente bacteriano e a realização de TSA. Assim, dos 306 boletins consultados foram selecionados 182 que apresentavam um agente isolado na análise bacteriológica e um TSA realizado; tendo sido excluídos 124 boletins que correspondiam a resultados negativos no exame bacteriológico ou ausência de um TSA.

Cada boletim analítico foi codificado com um número ordenado e os dados foram codificados e registados numa tabela (Microsoft Excel, 2021, Microsoft®) (Anexo II). Na análise dos dados, uma bactéria foi considerada resistente quando apresentava resistência a pelo menos um antibiótico de uma ou mais classes; e multirresistente quando apresentava um perfil de resistência a pelo menos um antibiótico de três classes diferentes (Awosile *et al.*, 2018). Os isolados de *Staphylococcus* spp. coagulase positivos resistentes a antibióticos beta-lactâmicos foram considerados meticilina resistentes (Bertelloni, 2021).

Uma análise estatística descritiva foi realizada utilizando o programa EpiInfo (versão 7.2.5 CDC) e a determinação de associações estatísticas foi realizada utilizando o programa estatístico R Core Team (2019). As associações entre as variáveis estudadas foram considerada significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

No total de 182 boletins analíticos incluídos neste estudo, 102 (56,0%; IC 95%: 48,5-63,3) correspondiam a amostras de cães e 80 (44%; IC 95%: 0,3-0,5) correspondiam a amostras de gatos (Gráfico 1).

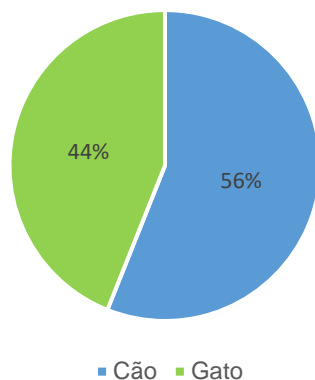


Gráfico 1: Percentagem de amostras estudadas nas espécies cão e gato (n=182).

a) Caracterização dos isolados

No total de amostras, verificou-se que 35,7% (n=65; IC 95%: 28,9-43,2) correspondiam a amostras de urina, 26,4% (n=48; IC 95%: 20,3-33,5) eram amostras de zaragatoa de ouvido, 15,4% (n=28; IC 95%: 10,6-21,6) eram amostras de zaragatoa cutânea, 11,0% (n=20; IC 95%: 7,0-16,7) eram amostras de zaragatoa nasal, 8,2% (n=15; IC 95%: 4,9-13,5) eram amostras de zaragatoa de produto biológico, 2,2% (n=4; IC 95%: 0,7-5,9) correspondiam a amostras de zaragatoa de fistula, e com a mesma frequência 0,6% (n=1; IC 95%: 0,03-3,5) foram analisadas amostras de zaragatoa de ferida cirúrgica e de zaragatoa de nódulo. Em cães as amostras mais frequentes foram zaragatoa de ouvido (n=40; 21,6%; IC 95%: 15,9-28,3) e urina (n=37; 20,3%; IC 95%: 14,9-27,1). Em gatos foram mais frequentes amostras de urina (n=28; 15,4%; IC 95%: 10,6-21,6), zaragatoa cutânea (n=18; 9,9%; IC 95%: 6,1-15,4) e zaragatoa nasal (n= 15; 8,8%; IC 95%: 4,9-13,5) (Gráfico 2).

Relativamente aos agentes bacterianos isolados no total das amostras, verificou-se que *Escherichia coli* (23%) foi a bactéria mais isolada, seguindo-se *Pseudomonas aeruginosa* (10%), *Staphylococcus pseudointermedius* (9%), *Staphylococcus chromogenes* (8%), *Klebsiella pneumoniae* (8%), *Proteus mirabilis* (8%), *Staphylococcus aureus* (5%), *Enterococcus faecalis* (5%) e *Pasteurella multocida* (3%). Os restantes 21% corresponderam a bactérias isoladas em percentagem residual tais como: *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae complex*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus spp.*, *Pantoea spp.*, *Pasteurella canis*, *Pasteurella dagmatis*, *Proteus spp.*, *Raoultella ornithinolytica*, *Serratia macerzens*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA), *Staphylococcus cohnii* subspécie *cohnii*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus simulans*, *Staphylococcus warnei*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus canis*,

Streptococcus dysgalactiae subspécie *equisimilis*, *Streptococcus* spp., *Streptococcus thoralensis* e *Terrisporobacter glycolicus* (Gráfico 3).

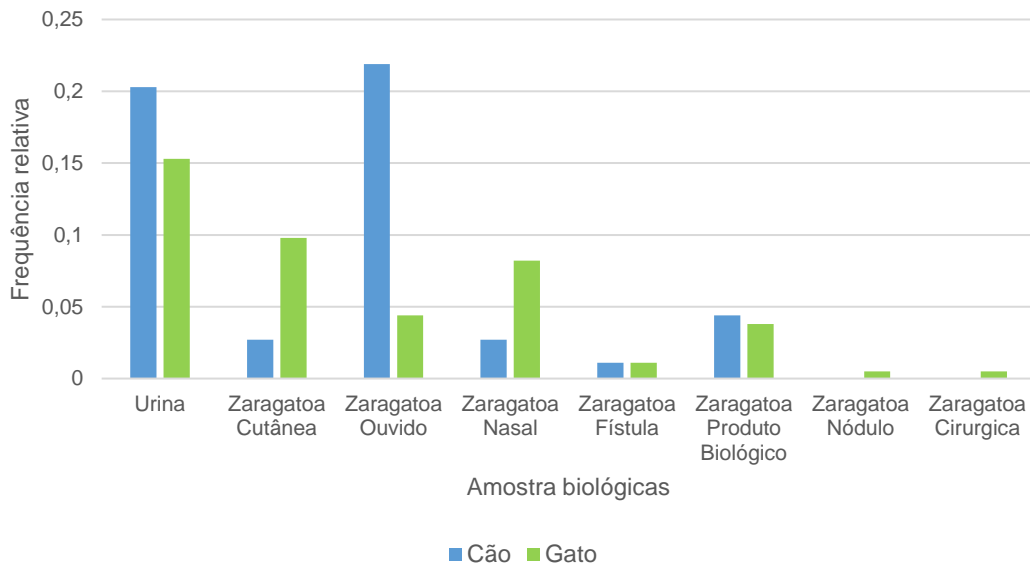


Gráfico 2: Frequência relativa de amostras biológicas de acordo com o tipo e com a espécie animal (n=182).

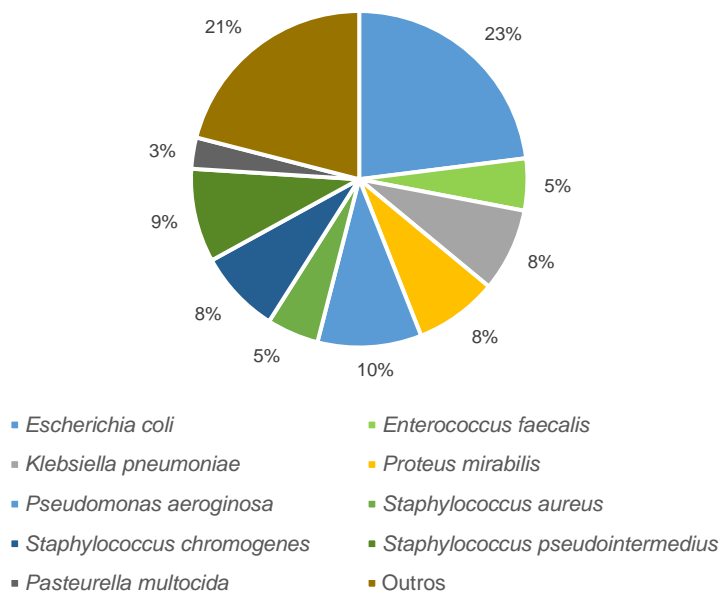


Gráfico 3: Frequência de bactérias isoladas na totalidade das amostras (n=182).

De acordo com o tipo de coloração de Gram, verificou-se que as bactérias de Gram negativo foram mais frequentes na espécie canina (37,4%) enquanto as bactérias de Gram positivo foram mais frequentes em gatos (20,3%) (Gráfico 4).

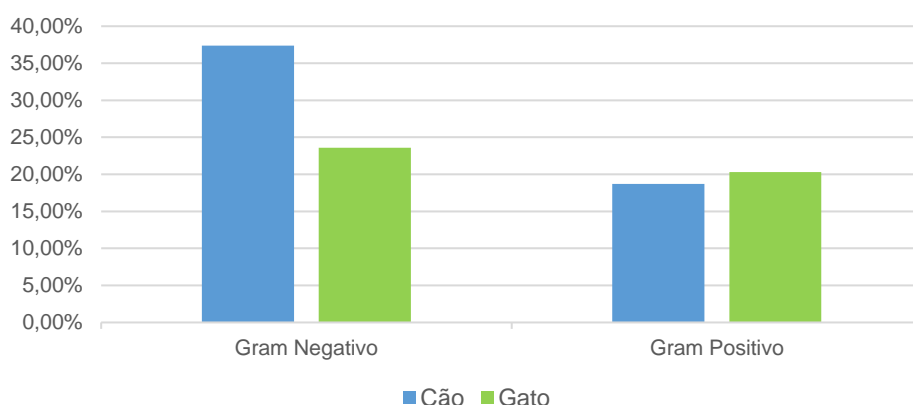


Gráfico 4: Percentagem de bactérias isoladas de acordo com coloração de Gram, por espécie (n=182).

a.1) Isolados em cães

Uma análise dos resultados obtidos em cães (n=102) permitiu verificar que em amostras de urina o agente mais isolado foi *Escherichia coli* (46%; IC 95%: 31,0-61,6), seguido de *Proteus mirabilis* (27,0%; IC 95%: 15,4-43,0). Em amostras de zaragatoa de ouvido verificou-se que os agentes mais isolados foram *Pseudomonas aeruginosa* (30%; IC 95%: 18,1-45,4) e *Staphylococcus pseudointermedius* (30%; IC 95%: 18,1-45,4) (Tabela 1).

a.2) Isolados em gatos

Uma análise dos resultados obtidos em gatos (n=80) permitiu verificar em amostras de urina o agente mais isolado foi *Escherichia coli* (46,4%; IC 95%: 29,5-64,2), seguindo-se *Klebsiella pneumoniae* (17,9%; IC 95%: 0,08-36). Relativamente às amostras de zaragatoa cutânea e nasal verificou-se que o agente mais isolado foi *Staphylococcus chromogenes* (16,7%; IC 95%: 5,8-39,2) *in ex aequo* (Tabela 2).

Tabela 1: Percentagem de agentes bacterianos isolados nos diferentes tipos de amostras biológicas, em cães.

Amostras biológicas	n	<i>E. coli</i> % (95% CI)	<i>P. mirabilis</i> % (95% CI)	<i>K. pneumoniae</i> % (95% CI)	<i>Proteus spp.</i> % (95% CI)	<i>S. pseudointermedius</i> % (95% CI)	<i>P. aeruginosa</i> % (95% CI)	<i>S. aureus</i> % (95% CI)	<i>B. bronchiseptica</i> % (95% CI)	<i>P. canis</i> % (95% CI)
Urina	37	46% (31,0-61,6)	27,0% (15,4-43,0)	13,5% (5,9-28,0)	5,4% (1,5-17,7)	0	0	0	0	0
Zaragatoa cutânea	10	10% (1,8-40,4)	20% (5,7-51,0)	0	0	20% (5,7-51,0)	10% (1,8-40,4)	0	0	10% (1,8-40,4)
Zaragatoa ouvido	40	10% (4,0-23,1)	2,5% (0,4-12,9)	0	0	30% (18,1-45,4)	30% (18,1-45,4)	7,5% (2,6-19,9)	0	0
Zaragatoa nasal	5	0	0	0	0	0	0	0	20% (3,6-62,5)	20% (3,6-62,5)
Zaragatoa fistula	2	50% (9,5-90,6)	0	0	0	0	0	50% (9,5-90,6)	0	0
Zaragatoa produto biológico	8	25% (7,2-59,1)	0	0	0	25% (7,2-59,1)	12,5% (2,2-47,1)	12,5% (2,2-47,1)	0	0

Tabela 2: Percentagem de agentes bacterianos isolados nos diferentes tipos de amostras biológicas, em gatos.

Amostras biológicas	n	<i>P. multocida</i> % (95% CI)	<i>S. chromogenes</i> % (95% CI)	<i>E. coli</i> % (95% CI)	<i>S. marcescens</i> % (95% CI)	<i>S. aureus</i> % (95% CI)	MRSA % (95% CI)	<i>P. aeruginosa</i> % (95% CI)	<i>E. faecalis</i> % (95% CI)	<i>K. pneumoniae</i> % (95% CI)
Urina	28	0	7,1% (2,0-22,6)	46,4% (29,5-64,2)	0	0	3,6% (0,6-17,7)	0	14,3% (5,7-31,5)	17,9% (7,9-35,9)
Zaragatoa cutânea	18	5,6% (1,0-25,8)	16,7% (5,8-39,2)	5,6% (1,0-25,8)	0	5,6% (1,0-25,8)	0	0	0	5,6% (1,0-25,8)
Zaragatoa nasal	15	20% (7,1-45,2)	26,7% (10,9-52,0)	13,3% (3,7-37,9)	0	0	0	0	0	0
Zaragatoa ouvido	8	0	37,5% (13,7-69,4)	0	0	12,5% (2,2-47,1)	0	37,5% (13,7-69,4)	0	0
Zaragatoa produto biológico	7	0	0	14,3% (2,6-51,3)	0	0	0	0	42,9% (15,8-75,0)	0
Zaragatoa fistula	2	0	0	0	0	100% (34,2-100)	0	0	0	0
Zaragatoa nódulo	1	0	0	0	0	0	100% (20,7-100)	0	0	0
Zaragatoa ferida cirúrgica	1	0	100% (20,7-100)	0	0	0	0	0	0	0

b) Análise do perfil de resistência

No total de boletins analíticos de TSA verificou-se que foram testadas as seguintes classes de antibióticos: aminoglicosídeos (espectinomicina, canamicina, neomicina, gentamicina, tobramicina, ampicilina); anfenicóis (florfenicol, cloranfenicol); cefalosporinas 1ª geração (cefalexina, cefalotina); cefalosporinas 3ª geração (ceftiofur, ceftiofur, cefpodoxima); carbapenemos (imipeneme); ácido fusídico; lincosamidas (clindamicina, lincomicina); macrólidos (eritromicina); penicilinas (benzilpenicilina, amoxicilina, ampicilina, amoxicilina+ácido clavulânico, ticarcilina, oxacilina); polipéptidos (polimixina B), quinolonas (enrofloxacina, marbofloxacina, orbifloxacina, pradofloxacina); sulfonamidas (trimetoprim+sulfametoxazol); tetraciclina (tetraciclina, oxitetraciclina, doxiciclina) e nitrofuranos (nitrofurantoína).

b.1) Perfil de resistências em agentes bacterianos isolados em cães

Relativamente às amostras biológicas mais frequentes em cães (*i.e.*, zaragatoa de ouvido e urina), verificou-se que em urina (n=37), 35% dos agentes isolados apresentavam um perfil de resistência a pelo menos uma classe de antibióticos, sendo que 46% apresentaram um perfil de multirresistência; e apenas 19% dos agentes apresentou um perfil de suscetibilidade às diferentes classes testadas. No que respeita à zaragatoa de ouvido (n=40), 40% dos agentes bacterianos isolados em zaragatoa de ouvido (n=40) apresentaram um perfil de resistência a pelo menos uma classe de antibióticos, sendo que 30% apresentavam um perfil de multirresistência (Gráfico 5).

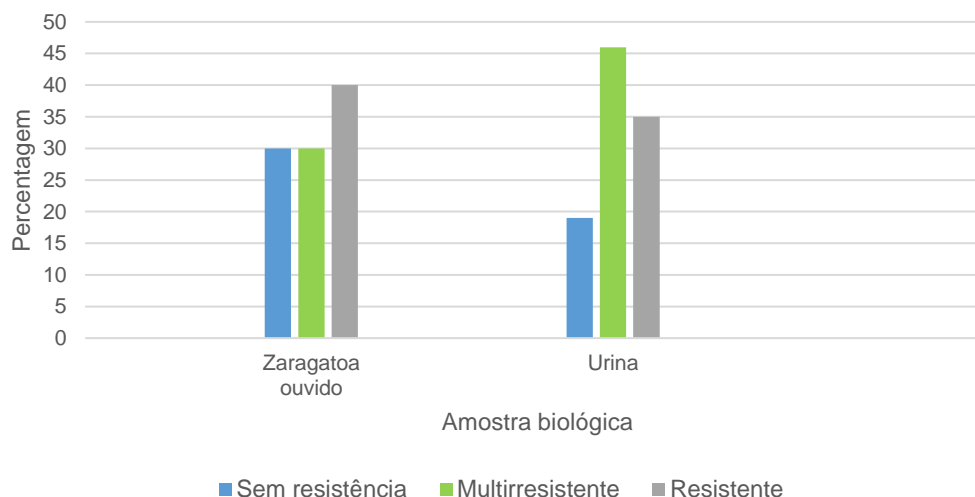


Gráfico 5: Perfil fenotípico relativamente ao TSA dos agentes bacterianos isolados em amostras biológicas mais frequentes em cães.

b.2) Perfil de resistências em agentes bacterianos isolados em gatos

No que respeita às amostras mais frequentes em gatos (*i.e.*, urina, zaragatoa nasal e zaragatoa cutânea) tal como verificado em cães, verificou-se que os agentes bacterianos isolados apresentavam uma elevada percentagem de resistência a antibióticos. Em urina (n=28), verificou-se 28% dos agentes isolados apresentaram um perfil de resistência a pelo menos uma classe de antibióticos sendo que 61% apresentaram um perfil de multirresistência. Em zaragatoa nasal (n=15) verificou-se que 27% dos agentes isolados apresentaram um perfil de resistência a pelo menos uma classe de antibióticos sendo que 40% apresentaram um perfil de multirresistência. Já em amostras de zaragatoa cutânea (n=18), a percentagem de agentes isolados sensíveis às diferentes classes de antibióticos testados foi superior (61%) e 28% dos agentes isolados apresentaram um perfil de resistência a pelo menos uma classe de antibióticos em que apenas 11% de agentes isolados apresentaram um perfil de multirresistência (Gráfico 6).

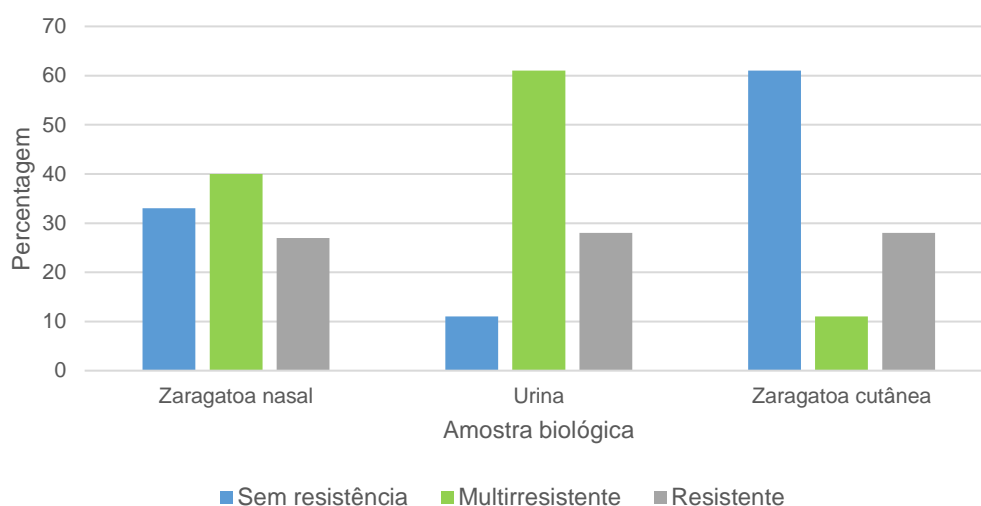


Gráfico 6: Perfil fenotípico relativamente ao TSA dos agentes bacterianos isolados em amostras biológicas mais frequentes em gatos.

c) Perfil de resistência antibacteriana em isolados mais frequentes

Na tabela 3 são apresentados os valores de frequência de resistência a antibióticos pelas duas espécies bacterianas mais frequentemente isoladas em cães e gatos. Em *E. coli* foi estatisticamente significativa a resistência a gentamicina ($p < 0,001$), cloranfenicol ($p < 0,001$), cefalexina ($p < 0,001$), cefpodoxima ($p < 0,001$), ampicilina ($p < 0,001$), amoxicilina + ácido clavulânico ($p < 0,001$), enrofloxacina ($p < 0,001$), marbofloxacina ($p < 0,05$), trimetopim + sulfametoxazol ($p < 0,001$), tetraciclina ($p < 0,001$) e doxiciclina ($p < 0,001$). Nesta espécie, verificou-se que 40,5% dos isolados apresentaram um perfil fenotípico multirresistente. Em *P. aeruginosa* foi estatisticamente significativa a resistência a neomicina ($p < 0,001$) e enrofloxacina ($p < 0,001$), não tendo sido identificados perfis fenotípicos multirresistentes.

Tabela 3: Percentagem de isolados de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* com perfil de resistências às diferentes classes de antibióticos testados em cães e gatos.

Isolados	n	AMK (%)	NEO (%)	GEN (%)	CLOR (%)	CEF (%)	CFX (%)	AMP (%)	AMC (%)	ENR (%)	MAR (%)	SXT (%)	TET (%)	DOX (%)	MR (%)
<i>E. coli</i>	42	0,5	0,5	3,3 (p<0,001)	4,4 (p<0,001)	20 (p<0,001)	4,4 (p<0,001)	8,8 (p<0,001)	5,5 (p<0,001)	7,7 (p<0,001)	6 (p<0,05)	4,9 (p<0,001)	7,7 (p<0,001)	7,7 (p<0,001)	40,5
<i>P. aeruginosa</i>	19	0	4,4 (p<0,001)	0	RI	RI	RI	RI	RI	3,3 (p<0,001)	0	RI	RI	RI	0

AMK- amicacina; NEO – neomicina; GEN – gentamicina; CLOR – cloranfenicol; CEF – cefalexina; CFX – cefpodoxima; AMP – ampicilina; AMC – amoxicilina + ácido clavulânico; ENR – enrofloxacina; MAR – marbofloxacina; SXT – trimetopim + sulfametoxazol; TET – tetraciclina; DOX – doxiciclina; RI – resistência intrínseca; MR - multirresistência.

d) Perfil de resistências ao longo dos três anos do estudo

A análise dos resultados obtidos, nos três anos estudados, permitiu verificar que houve uma variação no perfil fenotípico de bactérias isoladas em amostras clínicas. Enquanto em cães se verificou um decréscimo na percentagem de bactérias com perfil de suscetibilidade às diferentes classes de antibióticos testadas; em gatos verificou-se uma tendência inversa com o aumento da percentagem de bactérias com perfil fenotípico sensível (Tabelas 4 e 5).

Tabela 4: Frequência relativa dos perfis de resistência em agentes isolados em cães ao longo do período de estudo (n=102).

	2019	2020	2021
Suscetível (%) (IC 95%)	32% (17,9-50,7)	20% (8,9-39,1)	24% (14,6-38,09)
Multirresistente (%) (IC 95%)	32% (17,9-50,7)	40% (23,4-59,3)	41% (28,2-54,7)
Resistente (%) (IC 95%)	36% (20,7-54,2)	40% (23,4-59,3)	35% (22,9-48,7)

Tabela 5: Frequência relativa dos perfis de resistência em agentes isolados em gatos ao longo do período de estudo (n=80).

	2019	2020	2021
Suscetível (%) (IC 95%)	16 % (5,5-37,6)	23% (10,1-43,4)	38% (24,9-54,1)
Multirresistente (%) (IC 95%)	53% (31,7-72,7)	32% (16,4-52,7)	41% (27,1-56,6)
Resistente (%) (IC 95%)	31% (15,4-54)	45% (26,9-65,3)	21% (10,8-35,5)

DISCUSSÃO

A problemática associada à resistência aos antimicrobianos tem sido uma preocupação crescente ao nível mundial (WHO, 2021). Desde a descoberta do primeiro antibiótico, a comunidade científica percebeu que as bactérias desenvolvem estratégias de resistência a estes fármacos. Atualmente, a deteção de bactérias com perfil fenotípico de panresistência é alvo de uma preocupação global tanto em saúde animal como na saúde humana (Raygaert, 2018).

A consciência dos problemas associados à ocorrência de infecções por bactérias multi ou panresistentes foi determinante para o desenvolvimento deste estudo. Porém, ao longo da sua realização foram detetadas algumas limitações que dificultaram a análise dos resultados. Considerando que, sendo um estudo de carácter retrospectivo, verificou-se que os boletins seleccionados para este estudo eram provenientes de laboratórios diferentes. Ao nível internacional existem *Comités* que visam a uniformização das metodologias utilizadas na realização dos TSA *in vitro* tanto em medicina humana como animal (e.g., *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, Clinical and Laboratory Standards Institute* e *Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie*). No entanto, verificou-se que as recomendações para testagem de um conjunto de antibióticos em cada espécie bacteriana nem sempre são seguidas. Em alguns casos foram testados antibióticos para os quais se reconhece a existência de resistência intrínseca. Acresceu ainda que para um determinado agente, nem sempre foram testadas as mesmas classes de antibióticos. As divergências verificadas foram indubitavelmente uma limitação para uma análise integrada dos resultados obtidos.

Neste estudo, a urina foi a amostra biológica mais frequentemente analisada tanto em cães (36%) como em gatos (35%) e *E. coli* foi o agente mais isolado nesta amostra em ambas as espécies, 46,0% e 46,4% respetivamente. Estudos prévios, nacionais e internacionais, apresentam resultados similares com predomínio de *E. coli* isolado em amostras de urina (Awosile *et al.*, 2018; Ribeiro *et al.*, 2019). As infecções do trato urinário (ITU) em animais de companhia são consideradas um motivo frequente de consulta sendo esta maioritariamente causada por *E. coli* (Marques *et al.*, 2016). Em ITU não grave, os antibióticos beta-lactâmicos são muitas vezes uma escolha em primeira linha de tratamento (Awosile *et al.*, 2018; Weese *et al.*, 2019). A utilização empírica de antibióticos no tratamento de infecções por *E. coli* deve ser ponderada devido ao rápido desenvolvimento de resistência pela síntese de beta-lactamases (Li *et al.*, 2014; Awosile *et al.*, 2018). Estas enzimas contribuem para um dos mecanismos de resistência mais importantes em bactérias de Gram negativo (Oliveira *et al.*, 2020). Este facto pode explicar a elevada percentagem de isolados de *E. coli* resistentes a cefalexina (20%) e ampicilina (8,8%), ambos pertencentes à classe de antibióticos beta-lactâmicos. A utilização não racional de antibióticos pode ainda contribuir para o desenvolvimento de ESBL (Li *et al.*, 2014; Courtice *et al.*, 2020).

A otite é também uma patologia comum em animais de companhia (Bourély *et al.*, 2018). Neste estudo, a zaragatoa de ouvido correspondeu a 39,2% das amostras em cães e a 10% em gatos. *Pseudomonas aeruginosa* foi o agente mais isolado nestas amostras, com 30% de isolados em cães e 37,5% em gatos. *Pseudomonas* spp. apresenta uma resistência intrínseca a múltiplos antibióticos (Awosile *et al.*, 2018). *Pseudomonas aeruginosa* apresentou neste estudo resistência a neomicina (4,4%) e enrofloxacina (3,3%). Outros estudos revelaram resultados similares neste tipo de amostra acrescentando ainda o isolamento de *Staphylococcus pseudintermedius*, que também se verificou em amostras de cães (30%) (Bourély *et al.*, 2018; Dégi *et al.*, 2021).

Staphylococcus aureus resistente a meticilina (MRSA) é considerado um agente patogénico emergente e com grande importância em saúde pública (Algammal *et al.*, 2020). Neste estudo foi ainda possível verificar a presença de MRSA em três tipos de amostra em gatos (i.e., urina, zaragatoa de nódulo e

zaragatoa cutânea). A origem pode estar associada com o contato próximo de gatos com os seus tutores, estando descrita a transmissão de MRSA entre humanos e animais de companhia (Haenni *et al.*, 2017). A resistência à metilina pode ser determinada pela detecção com PCR do gene *mecA* que codifica as PBP responsáveis por este tipo de resistência (Algammal *et al.*, 2020).

A disseminação de MRSA é considerada uma ameaça à comunidade pois o desenvolvimento de multirresistências é o principal obstáculo no tratamento de infecções causadas por MRSA (Algammal *et al.*, 2020).

Neste estudo verificamos que ao longo dos três anos o perfil de resistências aos antibióticos não se alterou significativamente, sendo que a quantidade de amostras biológicas analisadas aumentou quase que proporcionalmente. Por outro lado, outros estudos têm demonstrado o oposto, ou seja, a ocorrência de aumento significativo de bactérias resistentes e multirresistentes a antibióticos (Awosile *et al.*, 2018; Ribeiro *et al.*, 2019).

CONCLUSÃO

Este estudo permitiu reforçar, a existência de bactérias causadoras de infecção e com perfis de resistência e multirresistência a antimicrobianos em animais de companhia.

A prévia utilização indiscriminada de antibióticos, em animais e em humanos, conduziu a uma crise sanitária com impacto global. Atualmente é uma prioridade o uso racional de antibióticos assim como a sensibilização da população para o problema associado à sua utilização não racional. A realização de uma antibioterapia suportada em TSA é uma das medidas a adotar na rotina clínica para promover a utilização racional de antibióticos e, desta forma, a classe médica e médica veterinária têm uma responsabilidade enquanto agentes de saúde pública.

Considera-se ainda que é essencial a uniformização das técnicas de execução de TSA para que seja possível uma monitorização passiva do perfil fenotípico dos isolados em amostras biológicas de casos clínicos e, conseqüentemente, uma comparação dos resultados obtidos.

REFERÊNCIAS

- Algammal A, Hetta HF, Elkelish A, Alkhalifah D, Hozzein W, Batiha G, El Nahhas N, Mabrok M. (2020). Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): One Health Perspective Approach to the Bacterium Epidemiology, Virulence Factors, Antibiotic-Resistance, and Zoonotic Impact. *Infect Drug Resist.* 13: 3255-3265. <http://doi.org/10.2147/IDR.S272733> (Acedido 08-03-2022)
- Awosile B., Trenton M., Saab M., Heider L. (2018). Antimicrobial resistance in bacteria isolated from cats and dogs from the Atlantic Provinces, Canada 1994-2013. *Can Vet J.*, 59, 885–893.
- Baron S. (1996). Medical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Bertelloni F., Cagnoli G., Eban V. (2021). Virulence and Antimicrobial Resistance in Canine *Staphylococcus* spp. Isolates. *Microorganisms*, 9,515.<https://doi.org/10.3390/microorganisms9030515>.
- Bourély C., Cazeau G., Jarrige N., Leblond A., Madec J., Haenni M., Gay E. (2018). Antimicrobial resistance patterns of bacteria isolated from dogs with otitis. *Epidemiology and Infection*, 147, e121, 1-10. <https://doi.org/10.1017/S0950268818003278>
- Courtice R., Sniatynski M., Rubin J. (2020) Characterization of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* causing urinary tract infections in dogs: Passive surveillance in Saskatchewan, Canada 2014 to 2018. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. ACVIM. DOI: 10.1111/jvim.16103
- Dégi, J., Motco, O., Dégi, D., Suici, D., Mares, M., Imre, K., Cristina, R. (2021) Antibiotic Susceptibility Profile of *Pseudomonas aeruginosa* canine isolates from a multicentric study in Romania. *Antibiotics*, 10, 846. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10070846>
- ECDC. (2021). European Center for Disease Prevention and Control. Factsheets for experts-antimicrobial resistance. Online: <https://www.ecdc.europa.eu> (Acedido 31-12-2021)
- EMA. (2021) Agência Europeia do Medicamento. Online: <https://www.ema.europa.eu> (Acedido 31-12-2021)
- EMA. (2021) Agência Europeia do Medicamento. Use of antibiotics in animals is decreasing. News 30-06-2021. Online: <https://www.ema.europa.eu> (Acedido 5-2-2022)
- EUCAST. (2021) European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing-document vetcast. Online: <https://www.eucast.org> (Acedido 10-1-2022)
- Evans, D. R., Griffith, M. P., Sundermann, A. J., Shutt, K. A., Saul, M. I., Mustapha, M. M., Marsh, J. W., Cooper, V. S., Harrison, L. H., & Van Tyne, D. (2020). Systematic detection of horizontal gene transfer across genera among multidrug-resistant bacteria in a single hospital. *eLife*, 9, e53886. <https://doi.org/10.7554/eLife.53886>
- Goossens H. (2009) Antibiotic consumption and link to resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 15 (s3), 12-15. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.02725.x>
- Haenni M., Châtre P., Dupieux-Chabert C., Métayer V., Bes M., Madec J.Y. Laurent, F. (2017). Molecular Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Horses, Cats, and Dogs Over a 5-Year Period in France. *Frontiers in Microbiology*, 8. DOI:10.3389/fmicb.2017.02493.

Hiltunen T., Virta M., Laine A-L. (2017). Antibiotic resistance in the wild: an eco-evolutionary perspective. *Phil. Trans. R. Soc. B*, 372: 20160039. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2016.0039>

Lerminiaux A., Cameron A. (2019). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology*, 65 (1). <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0275>

Li P., Wu D., Liu K., Suolang S. (2014) Investigation of Antimicrobial Resistance in Escherichia coli and Enterococci Isolated from Tibetan Pigs. *PLOS ONE*, 9 (4):1-3. doi:10.1371/journal.pone.0095623

Marques C., Gama L., Belas A., Bergström K., Beurlet S., Briend-Marchal A., Broens E., Costa M., Criel D., Damborg P., Dijk M., Dongen A., Dorsch R., Espada C., Gerber B., Konstantinou M., Loncaric I., Mion D., Misic D., Movilla R., Overesch G., Perreten V., Roura X., Steenbergen J., Timofte D., Wolf G., Zaroni R., Schmitt S., Guardabassi L., Pomba C. (2016). European multicenter study on antimicrobial resistance in bacteria isolated from companion animal urinary tract infections. *BMC Vet Res*, 12, 213. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0840-3>.

Mobarki N., Almerabi B., Hattan A. (2019). Antibiotic resistance crisis. *International Journal of Medicine in Developing Countries*, 3 (6):561–564. <https://doi.org/10.24911/IJMDC.51-1549060699>.

Mohr K. (2016). History of Antibiotics Research. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 398:237-272. doi: 10.1007/82_2016_499

Mulu W., Abera B., Yimer M., Hailu T., Ayele H., Abate D. (2017) Bacterial agents and antibiotic resistance profiles of infections from different sites that occurred among patients at Debre Markos Referral Hospital, Ethiopia: a cross-sectional study. *BMC Res Notes*, 10, 254. <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2584-y>

Oliveira D., Forde B., Kidd T., Harris P., Schembri M., Beatson S., Paterson D., Walter M. (2020). Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin Microbiol Rev.*, May 13;33(3):e00181-19. doi: 10.1128/CMR.00181-19.

OIE (2021). Antimicrobial Resistance. Online: <https://www.oie.int/en/what-we-do/global-initiatives/antimicrobial-resistance/> (acedido em 08-02-2022).

Prescott J.F. (2013). Antimicrobial Chemotherapy. In: *Veterinary Microbiology (3rd Edition)*. McVey, D.S., Kennedy, M. & Chengappa, M.M. Iowa-USA: John Wiley & Sons, Inc. (pp 26-44)

Quinn P.J., Markey B.K., Leonard F.C., Fitzpatrick E.S., Fanning S. (2016). *Concise Review of Veterinary Microbiology*. (2nd Edition). United Kingdom: John Wiley & Sons, Inc. (pp 18-23).

R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Online: <https://www.R-project.org/>.

Regulamento n.º 1831/2003. Online: <https://eur-lex.europa.eu> (Acedido 2-2-2022)

Regulamento n.º 2019/6. Medicamentos Veterinários. Online: <https://www.dgav.pt> (Acedido 2-2-2022)

Reygaert W., (2018). An Overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, 4(3): 482-501. doi: 10.3934/microbiol.2018.3.482.

Ribeiro I.X., Almeida M., Anastácio S., Cabeças R., Almeida, A. (2019). Evaluation of the resistance profiles in bacteria isolated from companion animals – 2016 to 2018. *Proceedings of Congress of Microbiology and Biotechnology*, December 5th-7th, 2019. University of Coimbra (Pólo II). P314, pp379.

Songer J.G. (2005). *Veterinary Microbiology: Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease*. Missouri: Elsevier Saunders. (1223 pp, 65-94)

Weese J., Blondeaub J., Boothed D., Guardabassie G., Gumleyg N., Papichh M., Jesseni L., Lappinj M., Rankink S., Westroppl J., Sykesl J. (2019). International Society for Companion Animal Infectious Diseases (ISCAID) guidelines for the diagnosis and management of bacterial urinary tract infections in dogs and cats. *Vet J.*, 247:8-25.

World Health Organization (2021). Fact sheets, details – antimicrobial resistance. Online: <https://www.who.int> (Acedido 25-12-2021)

World Health Organization (2014) *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, pp 232.

World Health Organization (2021). Self-prescription of antibiotics boosts superbugs epidemic in the European Region. Online: <https://www.euro.who.int>

Anexo I

CONSENTIMENTO INFORMADO, ESCLARECIDO E LIVRE PARA PARTICIPAÇÃO EM ESTUDOS DE INVESTIGAÇÃO (de acordo com a Declaração de Helsínquia e a Convenção de Oviedo)

Título do estudo: Estudo retrospectivo do perfil de resistências a antibióticos em isolados bacterianos com origem em animais de companhia (2019 a 2021).

Enquadramento: O presente estudo é realizado no âmbito da dissertação final para obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária, Escola Universitária Vasco da Gama. A resistência aos antimicrobianos é um tema contemplado na lista de ações da Organização Mundial de Saúde (OMS), sendo um dos objetivos incrementar o conhecimento através de evidências baseadas num sistema de monitorização e vigilância. A integração da vigilância em diferentes sectores é um desafio importante na perspetiva de Uma Saúde Global. Assim, a monitorização das resistências a antimicrobianos nas populações animais é essencial. Este estudo tem como objetivos: i) caracterizar ao longo do período de estudo os isolados bacterianos em animais de companhia em função da espécie animal e da amostra biológica; ii) caracterizar ao longo do período de estudo o perfil de resistências dos isolados bacterianos; iii) comparar os resultados obtidos com outros estudos realizados ao nível nacional e internacional.

Explicação do estudo: A concretização dos objetivos do estudo proposto depende da consulta de boletins analíticos laboratoriais que constam em processos clínicos dos animais no local de acolhimento da estudante Filipa Fontes durante o período de estágio.

Condições e financiamento: Para os devidos efeitos declara-se que este estudo não é financiado, sendo voluntária a participação, pela autorização da estudante na consulta dos processos. Informa-se ainda que o estudo foi avaliado e mereceu parecer favorável pela Comissão de Ética da EUVG.

Confidencialidade e anonimato: Os dados recolhidos para a realização do estudo serão tratados de forma confidencial e usados exclusivamente para o presente estudo. Os elementos relativos a identificações individuais serão mantidos anónimos.

Agradece-se a prestimosa colaboração no presente estudo.

Investigador responsável (Orientador Interno) – Sofia Ferreira Anastácio, Professora Auxiliar na Escola Universitária Vasco da Gama (sofia.anastacio@euvg.pt, 239444444).

Estudante - Filipa Fontes (estagiária)

Por favor, leia com atenção a seguinte informação. Se achar que algo está incorreto ou que não está claro, não hesite em solicitar mais informações. Se concorda com a proposta que lhe foi feita, queira assinar este documento.

Assinatura/s de quem pede consentimento:

Sofia Amador.
Filipa Catarina Francisco Lentes.

Declaro ter lido e compreendido este documento, bem como as informações verbais que me foram fornecidas pelas pessoas que acima assinam. Foi-me garantida a possibilidade de, em qualquer altura, recusar participar neste estudo sem qualquer tipo de consequências. Desta forma, aceito participar neste estudo e permito a utilização dos dados que de forma voluntária forneço, confiando em que apenas serão utilizados para esta investigação e nas garantias de confidencialidade e anonimato que me são dadas pela investigadora.

Nome: Manoel Francisco dos Santos

Assinatura:

Manoel Santos

Data: 07 / 02 / 2022

ESTE DOCUMENTO É COMPOSTO POR 2 PÁGINAS E FEITO EM DUPLICADO : UMA VIA PARA A INVESTIGADORA , OUTRA PARA A PESSOA QUE CONSENTE.

Anexo II

Códigos a colocar nos AB

0 Resistente

1 Intermédio
2 Sensível
NT Não testado

Isolado 1
Isolado 2
Isolado 3
Isolado 4
Isolado 4
Isolado 5
Isolado 6
Isolado 6
Isolado 7
Isolado 8
Isolado 9
Isolado 9
Isolado 10
Isolado 11
Isolado 12
Isolado 13
Isolado 14
Isolado 15
Isolado 16
Isolado 17
Isolado 18
Isolado 19
Isolado 20
Isolado 21
Isolado 22
Isolado 23
Isolado 24
Isolado 25
Isolado 26
Isolado 26
Isolado 27
Isolado 28
Isolado 29
Isolado 30
Isolado 31
Isolado 32
Isolado 33
Isolado 34
Isolado 35
Isolado 36
Isolado 37
Isolado 38
Isolado 39
Isolado 39
Isolado 40
Isolado 41
Isolado 42

Espectinomina
Estreptomina
Dihidroestreptomi
Kanamicina
Neomicina
Apramicina
Gentamicina
Tobramicina
Amikacina
Florfenicol
Tianfenicol
Cloranfenicol
Cefalexina
Cefalotina
Cefazolina
Cefuroxima
Cefoperazona
Ceftiofur
Ceftriaxona
Cefovecina*
Cefpodoxima*
Cefquinoma
Carbapenems
ácido fusídico
Pirlimicina
Lincomicina
Eritromicina
Tulatromicina
Espiramicina
Tilosina
Benzylenicillin
Amoxicillin
Ampicilina
Amoxicillin +AC
Ticarcillin
Oxacillin
Fosfomicin
Bacitracin
Colistin
Polymixin
Flumequin
Oxolinic acid
Enrofloxacin
Marbofloxacin
Norfloxacin
Pradofloxacin
Trimethoprim+Sulfonamide
Virginiamycin
Tetracycline
Oxytetracycline
Doxycycline
MDR
agente isolado
Gram
amostra biológica
origem
idade (meses)
género
data (cultura)

Aminoglicosídeos

Anfencóis

Cefalosporinas 1ª geração

Cefalosporinas 2ª geração

Cefalosporinas 3ª geração

Cefalosporinas 4ª geração

Carbapenems

Lincosamidas

Macrólidos

Penicilinas

PHOSPHONIC ACID

POLYPEPTIDES

QUINOLONES

SULFONAMIDES+DIAMINOPYRIMIDINES

STREPTOGRAMINS

TETRACYCLINES