



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**Avaliação do perfil de resistência de agentes bacterianos
isolados em animais de companhia - 2016 a 2018**

Inês Ximenes Ribeiro
Coimbra, outubro 2019



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**Avaliação do perfil de resistência de agentes bacterianos
isolados em animais de companhia - 2016 a 2018**

Coimbra, outubro 2019

Inês Ximenes Ribeiro

Aluna do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Constituição do Júri

Presidente do Júri: Prof. Doutora Ana

Calado Lopes

Arguente: Prof. Doutora Gabriela Jorge da

Silva

Orientador: Prof. Doutora Anabela

Almeida

Orientador Interno

Prof. Doutora Anabela Almeida

Coorientador Interno

Mestre Sofia Anastácio

Orientador Externo

Dra. Margarida Almeida
Hospital Veterinário Universitário de
Coimbra (HVUC)

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

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABELAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
LISTA DE SÍMBOLOS.....	viii
RESUMO	2
ABSTRACT	3
INTRODUÇÃO	5
OBJETIVO	7
MATERIAL E MÉTODOS.....	8
Caracterização do estudo	8
Análise estatística	9
RESULTADOS	10
Parte 1. Caracterização da amostra do estudo (n=206).....	10
Parte 2. Caracterização das infecções simples (n=136)	14
2.1. Caracterização da amostra em estudo.....	14
2.2. Avaliação do perfil de resistência em afeções do sistema urinário	23
2.3. Perfis de resistência observados nos isolados de <i>Escherichia coli</i>	25
2.4. Avaliação do perfil de resistência em infecções cutâneas	26
2.5. Perfil de resistência nos isolados de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	28
DISCUSSÃO	29
REFERÊNCIAS	33
ANEXOS.....	37
Anexo I	37
Anexo II	40
Anexo III	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Percentagem de agentes bacterianos isolados a partir da amostra de estudo inicial (n=206).....	10
Figura 2	Caracterização da amostra em função das variáveis sexo e estado reprodutivo (n=136).....	14
Figura 3	Distribuição percentual gráfica dos agentes bacterianos isolados a partir da amostra de estudo final (n=136).....	18
Figura 4	Distribuição percentual de isolados de <i>Escherichia coli</i> nas várias amostras biológicas de canídeos e felídeos (n=47).....	18
Figura 5	Percentagem de <i>E.coli</i> produtora de beta-lactamases de largo espectro (n=7), isoladas em amostras biológicas de canídeos e felídeos.	19
Figura 6	Distribuição percentual de isolados de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> nas várias amostras biológicas colhidas em canídeos e felídeos (n=16).	20
Figura 7	Percentagem de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> resistente à metilina (n=2).....	21
Figura 8	Distribuição percentual dos principais agentes bacterianos causadores de infeção do trato urinário (n=54).....	24
Figura 9	Distribuição percentual dos principais agentes causadores de infeções cutâneas (n=11).....	27

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1	Caracterização dos agentes etiológicos isolados em infecções bacterianas simples (n=136) versus infecções mistas (n=148).....	11
Tabela 2	Caracterização das amostras relativamente à resistência bacteriana a antibióticos pela produção de beta-lactamases de largo espectro como mecanismo de resistência, isoladas em canídeos e felídeos (n=29).....	12
Tabela 3	Frequência de bactérias resistentes à meticilina isoladas em amostras biológicas de canídeos e felídeos (n=22).....	13
Tabela 4	Caraterização demográfica da amostra relativa a canídeos.....	15
Tabela 5	Caraterização demográfica da amostra relativa a felídeos.....	16
Tabela 6	Comparação do perfil de resistência observado nos microrganismos isolados em infecções do sistema urinário, entre 2016, 2017 e 2018.	23
Tabela 7	Número de isolados resistentes (R), intermédios (I) e sensíveis (S) de <i>E.coli</i> observados nos anos de 2016, 2017 e 2018.....	25
Tabela 8	Comparação do perfil de resistência observado nos microrganismos isolados em infecções cutâneas, entre 2016, 2017 e 2018.....	26
Tabela 9	Número de isolados resistentes (R), Intermédios (I) e sensíveis (S) de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> observados nos anos de 2016, 2017 e 2018.	28

LISTA DE ABREVIATURAS

AB; ABs	Antibiótico; antibióticos
AM; AMs	Antimicrobiano; antimicrobianos
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control; Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças
EFSA	European Food Safety Authority; Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar
EMA	European Medicines Agency; Agência Europeia de Medicamentos
ESBL	<i>Extended spectrum beta-lactamases</i> ; Beta-lactamases de largo espectro
EGM	Elemento genético móvel
ITU	Infeção do trato urinário
MRSP	Methicillin resistant <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> ; <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> resistente à metilina
TSA	Teste de sensibilidade a antimicrobianos
OIE	World organisation for Animal Health; Organização Mundial da Saúde Animal
PBP	<i>Penicillin binding protein</i> ; Proteína ligadora à penicilina
RM	Resistência à metilina
UE	União Europeia
WHO	World Health organisation; Organização Mundial de Saúde

LISTA DE SÍMBOLOS

N	Dimensão de amostras
M±DP	Média±Desvio-padrão
Min-Máx	Mínimo-Máximo
Valor <i>p</i>	Valor de significância
S	Significativo
NS	Não significativo
%	Porcentagem

Avaliação do perfil de resistência de agentes bacterianos isolados em animais de companhia - 2016 a 2018

Inês Ximenes Ribeiro ^a, Margarida Almeida ^b, Sofia Anastácio ^{a,d}, Ricardo Cabeças ^c, Anabela Almeida ^{a,e}

^a Centro de Investigação Vasco da Gama (CIVG), Departamento de Ciências Veterinárias, Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário - Bloco B, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal (ximenes.ribeiro@gmail.com ; sferreira.anastacio@gmail.com; almeida.anabela@gmail.com)

^b Hospital Veterinário Universitário de Coimbra, Avenida José R. Sousa Fernandes 197, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal (margarida.almeida@onevetgroup.pt)

^c Biophotonics Lab, Biomedicum Stem Cell Center (BSCC), University of Helsinki, Finland (icabecas@gmail.com)

^d Center of Neurosciences and Cell Biology (CNC) and Faculty of Pharmacy, University of Coimbra, Portugal.

^e Coimbra Institute for Biomedical Imaging and Translational Research (CIBIT), University of Coimbra, Edifício do ICNAS, Polo 3 Azinhaga de Santa Comba 3000-548 Coimbra, Portugal.

RESUMO

A descoberta dos antibióticos representou um importante avanço no tratamento de infeções bacterianas, tanto na medicina humana como na medicina veterinária, constituindo a base da medicina moderna.

Os antibióticos são amplamente utilizados na rotina de clínicas e hospitais veterinários e o seu uso excessivo e indevido tem conduzido a fenómenos de resistências sendo atualmente uma preocupação mundial na saúde animal e com impacto em saúde pública.

Este estudo teve como objetivo avaliar e comparar o perfil de resistência a antibióticos de bactérias isoladas em amostras de animais atendidos no Hospital Veterinário Universitário de Coimbra, entre março de 2016 e dezembro de 2018.

O estudo foi dividido em duas partes, numa primeira parte foi realizada a caracterização das 206 amostras correspondentes a antibiogramas de bactérias isoladas em canídeos e felídeos. Seguidamente após a aplicação dos critérios de inclusão foram estudadas apenas as infeções simples, tendo sido avaliado o seu perfil de resistência nos três anos em estudo.

Em relação à avaliação do perfil de resistência ao longo dos três anos, para as amostras de urina (n=54), verificou-se um aumento da resistência à amicacina dos agentes bacterianos isolados, no ano de 2018 relativamente aos dois anos anteriores ($p=0,02$).

No que respeita aos agentes etiológicos isolados em amostra de zaragatoa cutânea (n=13), verificou-se que ao longo dos três anos, um aumento da resistência destes agentes ao trimetoprim/sulfametoxazole ($p=0,04$).

Os agentes etiológicos identificados em maior percentagem foram *Escherichia coli* (61%) e *Staphylococcus pseudintermedius* (27%), sendo que para *E.coli* foi possível encontrar diferença significativa no perfil de resistência para a tetraciclina ($p=0,002$) ao longo dos três anos. Verificou-se uma tendência ($p=0,06$) para o aumento no perfil de resistência nos antibióticos cloranfenicol e amicacina.

Este estudo permitiu verificar uma alteração no perfil de resistências em animais de companhia, nomeadamente em infeções provocadas por *E.coli*, tal como se tem verificado em estudos nacionais e internacionais publicados recentemente.

Considera-se assim crucial a consciencialização dos profissionais de saúde e população em geral em relação à utilização e prescrição prudentes dos antibióticos.

Palavras chave: *Escherichia coli*; *Staphylococcus pseudintermedius*, Resistência, Antimicrobianos

ABSTRACT

The antibiotics discovery was a big advance in the treatment of bacterial infections, in human and in veterinary medicine, being the basis of modern medicine.

Antibiotics are widely used in veterinary clinics and hospitals in its daily routine and their excessive or inadequate use in animals has led to the appearance of resistant bacteria. This phenomenon is nowadays a worldwide concern due to its impact in animal health as well as in human health.

The main objective of this study was to analyse and compare antibiotics resistance profiles in bacteria isolated from animal samples attended at the Hospital Veterinário Universitário de Coimbra, from March 2016 to December 2018.

This study was conducted in two steps. Firstly, a descriptive characterization of the 206 samples corresponding to the results obtained from antimicrobial susceptibility tests in bacteria isolated from dogs and cats, was performed. Secondly, and after considering the defined inclusion criteria, an analysis was developed using only cases of single bacterial infections by the evaluation of its resistance profile among the three years of study

So, during the study period, the resistance profiles in isolates obtained in urine samples (n=54) showed an increase in amikacin resistance in 2018, when compared to the previous two years ($p=0,02$).

Bacterial agents isolated from cutaneous swab (n=13), evidenced an increase in the resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole ($p=0,04$) during the three years of study. A higher percentage of isolates belonged to *Escherichia coli* (61%) and *Staphylococcus pseudintermedius* (27%) species, and considering *E. coli* a significant difference in the resistance profile for tetracycline ($p=0.002$) was observed from 2016 to 2018. Also, regarding the same bacterium, it was observed a tendency ($p=0,06$) for an increase of the resistance profile in amikacin and cloranfenicol.

This study demonstrated an increase in the resistance profiles in isolates obtained from companion animals such as cats and dogs, especially in infections caused by *E.coli*. These data is in accordance to other national and international studies recently published.

Thus, an awareness of healthcare professionals and of the general population is crucial for the conscient and prudent prescription and use of antibiotics.

Keywords: *Escherichia coli*; *Staphylococcus pseudintermedius*, Resistance, Antimicrobials

INTRODUÇÃO

Após a invenção do microscópio, na década de 1670, Antonie van Leeywenhoek identificou pela primeira vez microrganismos unicelulares, designados posteriormente como bactérias (Guimarães, Momesso, & Pupo, 2010). Porém, apenas no século XIX, foi considerada a possibilidade do seu envolvimento como agentes causadores de infecção no Homem e animais (Guimarães et al., 2010). Encetaram-se estudos orientados para a pesquisa de agentes químicos com atividade antimicrobiana, iniciando-se assim a “Era dos antibióticos”(Kon & Rai, 2016). Paul Ehrlich, em 1910, desenvolveu o primeiro antibiótico de origem sintética, Salvarsan[®] (Peterson & Kaur, 2018), que primeiramente foi usado em coelhos infetados pelo agente da sífilis, e posteriormente exibiu grande potencial para tratar doentes humanos (Kon & Rai, 2016). Contudo, o grande marco histórico no tratamento das infecções bacterianas surgiu em 1928, devido à descoberta ocasional da penicilina, por Alexander Fleming, que observou a inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus*, numa zona contaminada por um fungo do género *Penicillium* (Kon & Rai, 2016). Esta descoberta marcou o início da antibioterapia moderna, e motivou o desenvolvimento e descoberta de novos antibióticos (Guimarães et al., 2010). Atualmente, os antibióticos são a base da medicina moderna (Runcie, 2015), sendo a sua descoberta o maior avanço no tratamento de infeções bacterianas, na medicina humana e veterinária (Kohl, Pontarolo, & Pedrassani, 2016).

Os antibióticos são substâncias pertencentes ao grupo dos antimicrobianos que podem ser de origem natural, semissintética ou sintética com atividade antimicrobiana, isto é, com capacidade de matar ou inibir o crescimento de microrganismos em concentrações atingíveis *in vivo* (OIE, 2019). Os antibióticos bacteriostáticos têm apenas a capacidade de inibir o desenvolvimento de microrganismos enquanto que os bactericidas levam à morte da bactéria (Lima, Benjamim, & Santos, 2017). Originalmente tinham uma origem natural (e.g. penicilina) sendo que atualmente os mais utilizados são os de origem semissintética modificados pelo Homem com compostos químicos (Choffnes, Relman, & Mack, 2010). Segundo Gajdács, o antibiótico ideal é aquele que se caracteriza pelas seguintes propriedades: está disponível para administração oral, atua como pró-fármaco, pertence à classe I no sistema de classificação biofarmacêutico, apresenta a capacidade de se acumular em macrófagos, não possui efeitos teratogénicos, apresenta excreção pelo organismo na forma inalterada, é bactericida com amplo espectro de ação, possui ação sobre biofilmes, e atividade em concentrações nanomolares, apresenta bom alcance em infeções de difícil acesso, atua em múltiplos alvos essenciais das bactérias e forma ligações covalentes irreversíveis dentro das células bacterianas (Gajdács, 2019). Contudo, todas essas propriedades são difíceis de serem obtidas devido à relação, não linear entre o antibiótico e a bactéria (Da Costa & Silva Junior, 2017).

No entanto, e quase simultaneamente à sua descoberta, surgiu o fenómeno de *resistência antimicrobiana* (Clatworthy, Pierson, & Hung, 2007), definida como a “capacidade de um microrganismo resistir à ação de um ou mais agentes microbianos” (ECDC, 2018), devido ao uso generalizado, indevido e excessivo de antibióticos, tanto em humanos como em

animais (Dugassa & Shukuri, 2017). Este fenómeno de resisténcia antimicrobiana a inúmeros agentes infecciosos tem vindo a aumentar (WHO, 2017), o que tem despertado uma preocupação mundial, em vários países, setores e entidades. Novos mecanismos de resisténcia estão constantemente a surgir e a disseminar-se globalmente, sendo atualmente considerada como uma ameaça à medicina moderna e à capacidade de tratar doenças infecciosas, resultando em tratamentos ineficazes e/ou prolongados e custos aumentados nos cuidados de saúde (WHO, 2017). Foi também neste contexto, que o relatório da WHO 2014 se referiu a este fenómeno como capaz de se tornar num dos mais sérios problemas de saúde pública, advogando-se que a “Era Pós-Antibiótica” poderá ser uma realidade ainda no século XXI (WHO, 2014).

Outro fenómeno a salientar é o aparecimento de bactérias multirresistentes - bactérias resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos (Schmidt et al., 2018). Este fenómeno tem-se sobreposto ao desenvolvimento e introdução de novos fármacos, uma vez que a descoberta e a síntese de novos antibióticos requer tempo e elevado investimento (Kohl et al., 2016).

Atualmente, são conhecidos vários mecanismos de resisténcia e de transmissão de resisténcia (ECDC, 2018). A resisténcia intrínseca é codificada em cromossomas e relacionada com a fisiologia geral do microrganismo, surgindo a partir de propriedades estruturais da célula, como a complexidade da parede celular, mecanismos de efluxo ou inativação enzimática (Da Costa & Silva Junior, 2017). Por contraposição, a resisténcia extrínseca pode surgir a partir de uma mutação genética ou por meio da transferência, via plasmídeo ou bacteriófago, de material genético que codifique genes de resisténcia, ou ainda por meio de transposões que contém sequências de integrões (Quinn, Markey, Leonard, E.S.Fitzpatrick, & S, 2016). A aquisição de resisténcia a antibióticos ocorre por meio de mutação cromossómica espontânea e recombinação de genes, criando variabilidade genética (Ishii, Freitas, & Arias, 2011), através de transformação (obtenção de DNA exógeno de meio externo), transdução (troca de material genético através de bacteriófagos), transposição e conjugação (transferência de plasmídeos e transposões por meio de contato direto entre as bactérias, ou através da transmissão de cópias genéticas através do *pilus* sexual) (Lima et al., 2017). A informação genética pode ser transmitida entre diferentes espécies e géneros bacterianos, patogénicos ou não, assim como a vários hospedeiros e reservatórios ambientais (Loureiro, Roque, Rodrigues, Herdeiro, & Ramalheira, 2016). Os mecanismos de *resisténcia a antimicrobianos* podem ser agrupados em três categorias: I) redução do antimicrobiano dentro da bactéria; II) inativação antimicrobiana; e III) modificação do alvo onde o antibiótico vai atuar (Florez-Cuadrado, Moreno, Ugarte-Ruíz, & Domínguez, 2018). Vários são os estudos publicados sobre esta temática (Tabela B1- Anexo II, página 38).

Tendo em consideração esta preocupação mundial, a Organização Mundial de Saúde, o Centro Europeu de Prevenção e Controlo de Doenças desenvolveram nos últimos anos programas e ações com o propósito de aumentar a consciencialização deste problema e

promover a utilização racional destes medicamentos. Em Portugal salientam-se, o Programa Nacional de Prevenção e Controlo de Infeções e Resistências aos Antimicrobianos e o Plano de Ação Nacional para a Redução do Uso de Antibióticos nos Animais. Este último plano tem como objetivo diminuir o consumo de antibióticos, no cumprimento do projeto *European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption*, cujas quantidades são contabilizadas e disponíveis para consulta através da *European Medicines Agency* (EMA, 2018).

Dois dos principais domínios de intervenção da União Europeia (UE), no combate à resistência antimicrobiana, são a proibição do uso de antimicrobianos como promotores de crescimento em 2006 (Regulamento (CE) n.º 1831/2003, 2003) e a legislação e controlo de salmonelas (Regulamento (CE) N.º 2160/2003, 2003), de forma a reduzir o risco de exposição dos seres humanos a bactérias potencialmente resistentes. Em medicina veterinária é feita a monitorização da utilização de antimicrobianos em animais assim como a monitorização de *resistência a antimicrobianos* de agentes zoonóticos (ECDC & EMA, 2015).

Atualmente os animais de companhia, principalmente o cão e o gato, têm um papel importante na sociedade mantendo contato próximo com os seus tutores (Marques et al., 2017). Este contato próximo tem contribuído para o aumento de bactérias zoonóticas multirresistentes pois os animais podem comportar-se como reservatórios e fontes de transmissão de genes de resistência (Pomba et al., 2016). Assim, têm emergido bactérias como *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (Argudín et al., 2017), *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à metilina (*MRSP*), enterobactérias produtoras de beta-lactamases de largo espetro (*ESBL*) (Hartantyo et al., 2018), enterobactérias produtoras de *AmpC* e bactérias gram-negativas não fermentadoras multirresistentes (Pomba et al., 2016).

Segundo o Grupo de Estudo de Microbiologia Veterinária da Sociedade Europeia de Microbiologia Clínica e Doenças Infeciosas e a análise feita pela Federação Veterinária da Europa, os testes de sensibilidade a antibióticos ainda são poucos utilizados na medicina veterinária em comparação com a medicina humana (Guardabassi et al., 2017). Assim sendo, é muito importante a consciencialização para o uso e prescrição racional e prudente dos antibióticos e a educação e alerta para o uso de testes de sensibilidade a antibióticos.

OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo avaliar e caracterizar o perfil de sensibilidade a antibióticos, em cães e gatos submetidos a tratamento antibiótico, no âmbito da rotina clínica do Hospital Veterinário Universitário de Coimbra, num período de três anos.

MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização do estudo

Foi realizado um estudo observacional descritivo, e com carácter retrospectivo, com o objetivo de analisar os boletins analíticos referentes aos resultados de antibiogramas efetuados no âmbito do tratamento de infeções provocadas por agentes etiológicos isolados em 206 amostras de canídeos e felídeos, no Hospital Veterinário Universitário de Coimbra (HVUC). Este estudo foi realizado após autorização da Direção Clínica do referido hospital e aprovação da Comissão de Ética da EUVG.

Foram considerados para o estudo todos os casos da rotina clínica do HVUC, entre março de 2016 e dezembro de 2018, que apresentaram amostras com resultado positivo após colheita de uma amostra biológica (urina; zaragatoa auricular, cutânea, nasal, ocular e óssea), com o objetivo de identificar e caracterizar o agente bacteriano causador da infeção, incluindo a análise do seu perfil de resistência a antibióticos.

Os antibiogramas analisados incluíam, de acordo com o agente etiológico isolado, os seguintes grupos farmacológicos: anfenicóis (cloranfenicol e florfenicol), aminoglicosídeos (amicacina, gentamicina, tobramicina), beta-lactâmicos (ampicilina, amoxicilina, amoxicilina+ácido clavulânico, oxacilina, penicilina, piperacilina, cefalotina, cefotaxima, ceftazidima), fluoroquinolonas (enrofloxacina, levofloxacina, marbofloxacina), lincosamidas (clindamicina), macrólidos (eritromicina), nitrofuranos (nitrofurantoína), quinolonas (ciprofloxacina), sulfonamidas (trimetoprim/sulfametoxazol), tetraciclinas (tetraciclina, doxiciclina) e fosfomicina.

O estudo consistiu nas seguintes duas partes: Parte 1) Em primeiro lugar foi realizada a caracterização das 206 amostras de canídeos e felídeos no que respeita à ocorrência de infeções simples e mistas nos 3 anos, considerando-se uma infeção simples uma infeção bacteriana por um único agente e infeção mista quando causada por mais do que um agente bacteriano. Para além disso foram também caracterizados nestas infeções os agentes etiológicos mais frequentemente isolados e a ocorrência de produção de ESBL e resistência à metilicina; Parte 2) De seguida, após aplicação dos critérios de inclusão, num total de 136 amostras, foi realizada uma análise descritiva, seguida de uma análise estatística dos casos. Os critérios de exclusão para análise estatística foram os seguintes: i) quando se verificou isolamento de mais do que um agente bacteriano por amostra; e ii) quando se observaram mais do que uma amostra biológica por animal. Com base nos agentes isolados com maior frequência, avaliou-se a sua percentagem nos produtos biológicos e identificou-se a ocorrência de mecanismos de resistência. Tendo em vista avaliar a existência de alterações no perfil de resistência foi efetuada uma comparação ao longo dos três anos. Assim foram caracterizados os perfis de resistência obtidos nas infeções do trato urinário, utilizando para tal as amostras de urina destes 136 casos. Foram igualmente analisados os agentes causadores de infeções da

pele, considerando a amostra de zaragatoa cutânea. Finalmente, foram estudados apenas os casos em que foram identificados os dois seguintes agentes etiológicos: *Escherichia coli*, e *Staphylococcus pseudintermedius*, tendo sido também comparados os perfis de resistência nos 3 anos.

Análise estatística

Para a realização deste estudo foram consideradas as seguintes variáveis de caracterização: demográficas (espécie, sexo, raça, idade e estado reprodutivo) e analíticas (tipo de amostra, agentes etiológicos e perfil de resistência). Os dados foram registados em base de dados, através do programa Excel[®], que foi também utilizado para análise descritiva, tendo sido posteriormente submetidos a análise estatística.

O tratamento estatístico foi realizado utilizando o programa R[®], recorrendo ao teste Qui-Quadrado, considerando-se um resultado significativo sempre que o nível de significância revelou ser inferior a $p < 0.05$.

RESULTADOS

Parte 1. Caracterização da amostra do estudo (n=206)

A amostra inicial (n=206), correspondeu a 129 canídeos, 55 felídeos, sendo que 22 animais não apresentaram dados sobre a espécie (espécie indeterminada). As amostras biológicas colhidas corresponderam maioritariamente a amostras de urina (28%), seguidas de zaragatoas de ouvido (17%), cutânea (8%), nasal (6%), óssea (6%) e ocular (5%). Os restantes 30% incluíram bexiga, bÍlis, biÓpsia cutânea, cultura de lavagem bronco-alveolar, cultura bilateral de massa e tecido, cultura cutânea, cultura de ferida, cultura nasal, cultura óssea, genital, lavagem brônquica, líquido inflamatório, líquido prostático, material ósseo, rim e zaragatoas: abscesso, articular, de placa ortopédica, sutura, unha, derrame abdominal, efusão peritoneal, ferida cirúrgica, gânglio, infeção, intra-articular, oral, oronasal, próstata, secreção purulenta, subcutânea e tumefação.

Diversos agentes bacterianos foram identificados tal como se encontra representado na Figura 1, nomeadamente *Escherichia coli* (23%), *Staphylococcus pseudintermedius* (13%), *Proteus spp.* (10%), *Staphylococcus spp.* (9%), *Pseudomonas aeruginosa* (6%), *Enterococcus faecalis* (6%). Os dois agentes mais isolados foram *Escherichia coli* e *Staphylococcus pseudintermedius*.

Os restantes 33% corresponderam a agentes bacterianos identificados em percentagens muito baixas tais como *Acinetobacter baumannii*, *Bacillus spp.*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus spp.*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella spp.*, *Pasteurella multocida*, *Peptostreptococcus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Serratia spp.*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.* e *Veillonella spp.*

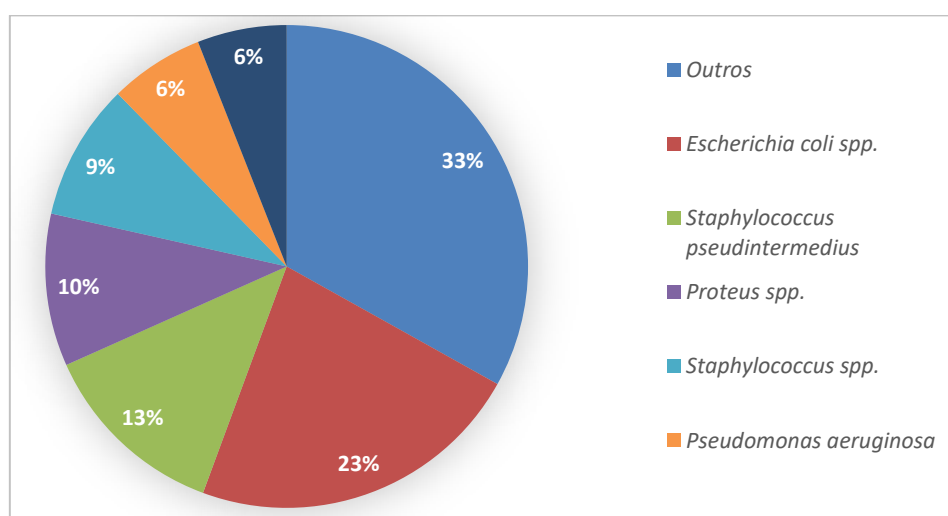


Figura 1 Percentagem de agentes bacterianos isolados a partir da amostra de estudo inicial (n=206).

A análise da Tabela 1 permite observar que os microrganismos isolados com maior frequência em infecções simples foram *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.. Com uma percentagem similar, tanto em infecções simples como em infecções mistas, foi identificada a bactéria *Proteus* spp.. Em infecções mistas as bactérias *Enterobacter* spp., *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus pseudintermedius* foram mais frequentemente identificadas.

Tabela 1 Caracterização dos agentes etiológicos isolados em infecções bacterianas simples (n=136) versus infecções mistas (n=148).

Microorganismo	Infecções simples (n=136)		Infecções mistas (n=148)	
	n	%	n	%
<i>Enterobacter</i> spp.	2	1%	7	5%
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	1%	15	10%
<i>Escherichia coli</i>	47	35%	19	13%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6	4%	4	3%
<i>Proteus</i> spp.	13	10%	15	10%
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6	4%	12	8%
<i>Staphylococcus</i> spp.	14	10%	12	8%
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	16	12%	21	14%
<i>Streptococcus</i> spp.	5	4%	1	1%
Outros	25	18%	42	28%

n= dimensão da amostra %=percentagem

Escherichia coli foi identificada com o maior valor percentual de produção de enzimas beta-lactamases de largo espectro, correspondendo a 41% (n=12). Com valores percentuais mais baixos foram identificadas as bactérias *Proteus* spp. (17%), *Klebsiella pneumoniae* (14%), *Enterobacter* spp. (10%), *Serratia marcescens* (7%), *Serratia* spp. (7%) e *Klebsiella* spp. (7%), conforme se pode verificar na Tabela 2. Os agentes bacterianos foram isolados em amostras biológicas de urina e zaragatoa: auricular, nasal e líquido de efusão peritoneal.

Tabela 2 Caracterização das amostras relativamente à resistência bacteriana a antibióticos pela produção de beta-lactamases de largo espectro como mecanismo de resistência, isoladas

Microrganismo	Produção de beta-lactamases de largo espectro	
	n	%
<i>Escherichia coli</i>	12	41%
<i>Proteus</i> spp.	5	17%
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4	14%
<i>Enterobacter</i> spp.	3	10%
<i>Serratia marcescens</i>	2	7%
<i>Serratia</i> spp.	2	7%
<i>Klebsiella</i> spp.	1	3%

em canídeos e felídeos (n=29).

n= dimensão da amostra %=percentagem

Staphylococcus pseudintermedius foi a bactéria identificada com a percentagem mais elevada de resistência à metilina, correspondendo a 50%. Com valores percentuais inferiores foram identificadas as bactérias *Staphylococcus* spp. e *Staphylococcus aureus* (Tabela 3). As amostras biológicas foram de: zaragatoa cutânea, auricular e óssea.

Tabela 3 Frequência de bactérias resistentes à metilina isoladas em amostras biológicas de canídeos e felídeos (n=22).

Microrganismo	Resistência à metilina	
	n	%
<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	11	50%
<i>Staphylococcus</i> spp.	7	32%
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	18%

n= dimensão da amostra %=percentagem

Parte 2. Caracterização das infecções simples (n=136)

2.1. Caracterização da amostra em estudo

No que respeita às amostras isoladas em infecções simples, considerando os critérios de exclusão estabelecidos para o presente estudo, foram assim excluídas 70 amostras, tendo sido analisados 136 antibiogramas relativos a 82 canídeos, 34 felídeos e 20 animais não apresentaram dados sobre a espécie (espécie indeterminada).

Na Figura 2 a amostra é caracterizada em função do sexo e estado reprodutivo dos animais, sendo identificados 63 machos (seis esterilizados) e 53 fêmeas (nove esterilizadas).

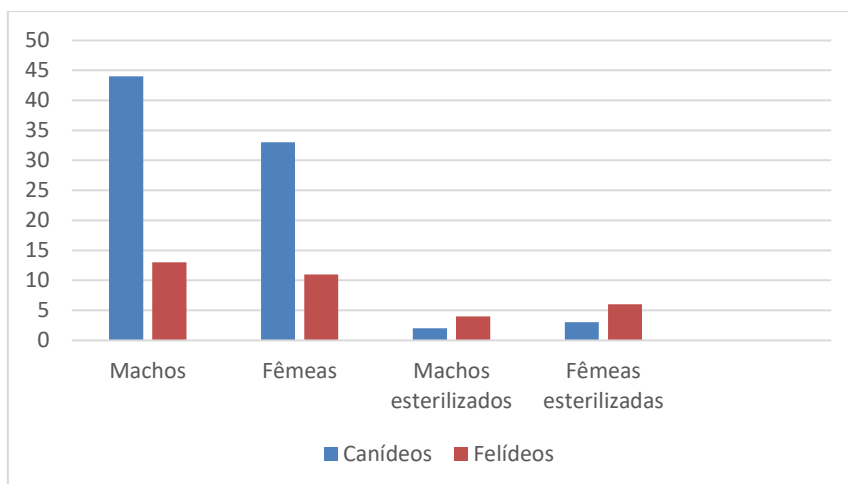


Figura 2 Caracterização da amostra em função das variáveis sexo e estado reprodutivo (n=136).

Relativamente aos canídeos (Tabela 4), a idade média em meses foi de $89,6 \pm 54,39$ (média \pm desvio padrão) variando entre 0,16 a 240 meses. As raças identificadas por ordem decrescente foram: labrador retriever (n=19), sem raça definida (n=13), pastor alemão (n=6), bulldog francês (n=6), dobermann pinscher (n=4) e terra nova (n=4). As identificadas como “outras” foram as seguintes: beagle (n=3), pequinês (n=3), borboel (n=2), caniche (n=2), yorkshire terrier (n=2), cavalier king charles (n=2), boxer (n=1), dogue argentino (n=1), sharpei (n=1), são bernardo (n=1), teckel (n=1), bull terrier (n=1), cocker spaniel (n=1), staffordshire bull terrier (n=1), husky siberiano (n=1), dobermann (n=1), grande boiadeiro suíço (n=1), cane corso (n=1), border collie (n=1), golden retriever (n=1), perdigueiro português (n=1) e serra da estrela (n=1).

Tabela 4 Caracterização demográfica da amostra relativa a canídeos.

		n
Espécie	Canídeo	82
Sexo	Macho	46
	Fêmea	36
Raça	sem raça definida	13
	labrador retriever	19
	pastor-alemão	6
	bulldog francês	6
	dobermann pinscher	4
	terra nova	4
	outras	30
Idade (meses)	M \pm DP	80,6 \pm 54,39
	Min-Máx	0,16-240
Estado reprodutivo	Esterilizado	5

n=dimensão da amostra; M \pm DP=média \pm desvio-padrão; Min-Máx=mínimo-máximo

A idade média dos felídeos em meses foi de $98,05 \pm 60,61$ (média \pm desvio padrão), variando entre 1 a 168 meses. As raças identificadas foram as seguintes: europeu comum (n=21), persa (n=5), sem raça definida (n=5), bosques da noruega (n=1) e outras que não foram identificadas (n=2).

		n
Espécie	Felídeo	34
Sexo	Macho	13
	Fêmea	11
Raça	europeu comum	21
	sem raça definida	5
	persa	5
	bosques da noruega	1
	outras	2
Idade (meses)	M \pm DP	98,05 \pm 60,61
	Min-Máx	1-168
Estado reprodutivo	Esterilizado	10

Tabela 5 Caracterização demográfica da amostra relativa a felídeos.

n=dimensão da amostra; M \pm DP=média \pm desvio-padrão; Min-Máx=mínimo-máximo

As amostras colhidas correspondem maioritariamente a amostras de urina (40%), zaragatoa cutânea (10%), auricular (10%) e ocular (6%). Os restantes 34% incluíram líquido inflamatório, líquido prostático, cultura bilateral de massa e tecido, cultura de ferida, cultura cutânea, cultura de lavagem bronco-alveolar, genital, lavagem bronco-alveolar, biópsia cutânea, rim e zaragatoa de: abscesso, efusão pleural, ferida cirúrgica, gânglio, nasal, oral, oronasal, óssea, próstata, secreção purulenta, subcutânea, tumefação e unha.

Os agentes bacterianos mais prevalentes, representados na Figura 3 foram: *Escherichia coli* (35%), *Staphylococcus pseudintermedius* (12%), *Staphylococcus spp.* (10%), *Proteus spp.* (10%), *Klebsiella pneumoniae* (5%), *Pseudomonas aeruginosa* (4%), *Staphylococcus aureus* (2%) e *Streptococcus spp.* (4%) e “outros agentes” (18%). Os agentes em menor percentagem identificados como “outros agentes” foram: *Citrobacter spp.* (3%), *Enterobacter spp.* (1%), *Enterococcus faecalis* (1%), *Enterococcus faecium* (1%), *Enterococcus spp.* (1%), *Klebsiella spp.* (1%), *Pasteurella multocida* (1%), *Pseudomonas spp.* (2%), *Serratia spp.* (1%) e *Serratia marcescens* (1%).

Os dois agentes mais isolados em várias amostras biológicas relativas aos 136 antibiogramas foram *Escherichia coli* e *Staphylococcus pseudintermedius*.

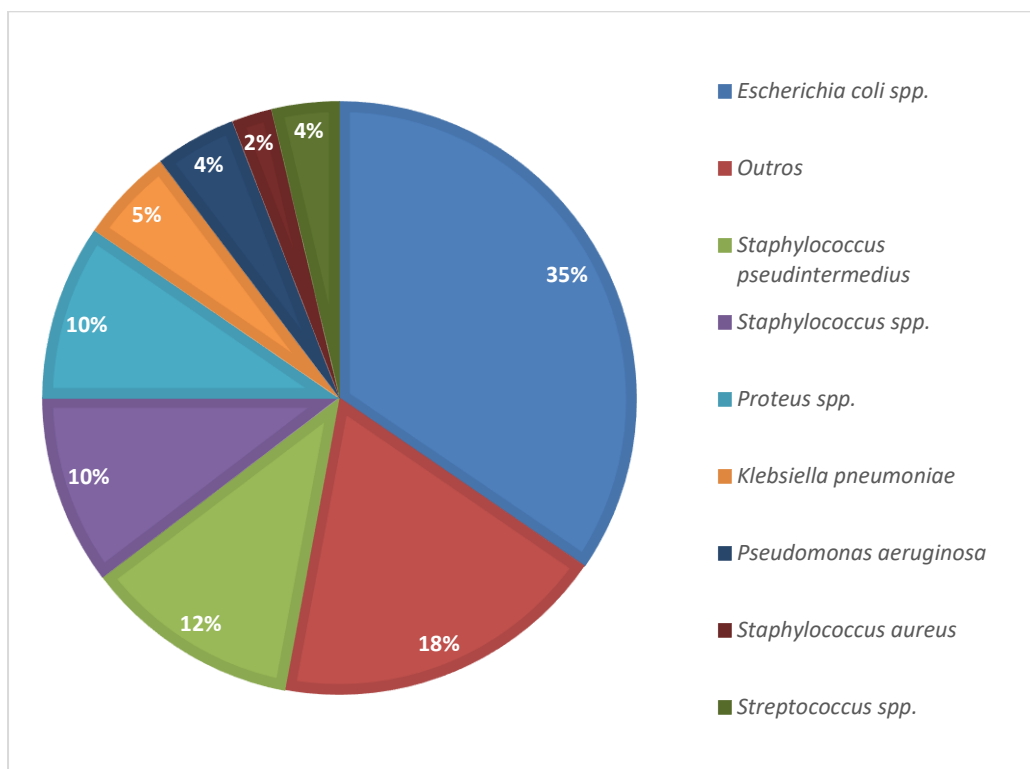


Figura 3 Distribuição percentual gráfica dos agentes bacterianos isolados a partir da amostra de estudo final (n=136).

Na Figura 4 podemos concluir que a bactéria *Escherichia coli* (n=54) foi identificada com maior percentagem na urina correspondendo a 70% (n=47). Em menor percentagem ocorreu em zaragatoa de abscesso (6%), zaragatoa auricular (4%), bexiga (4%), líquido prostático (2%), líquido inflamatório (2%), zaragatoa cutânea (2%), zaragatoa de secreção purulenta (2%), zaragatoa oral (2%), zaragatoa ocular (2%) e rim (2%).

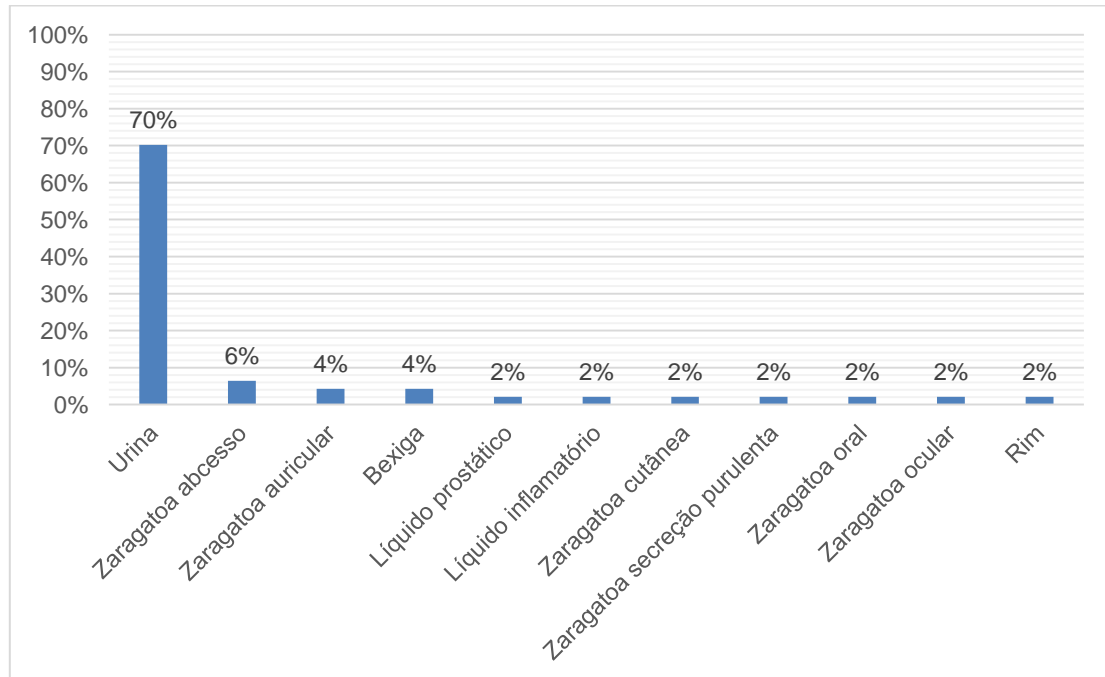
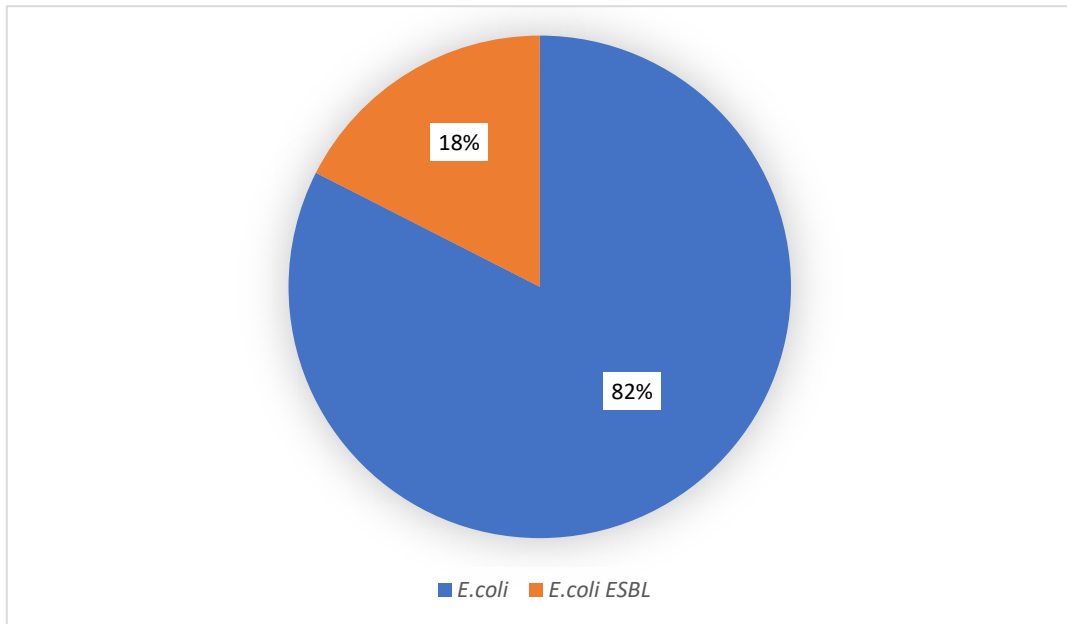


Figura 4 Distribuição percentual de isolados de *Escherichia coli* nas várias amostras biológicas de canídeos e felídeos (n=47).

Tal como evidenciado na Figura 5, verificou-se que num total de 33 amostras, 18% (representado a laranja) corresponde a *E.coli* produtora de beta-lactamases de largo espectro (n=7), isoladas em amostras de canídeos e felídeos. As amostras corresponderam a urina e



zaragatoa: auricular e cutânea.

Figura 5 Percentagem de *E.coli* produtora de beta-lactamases de largo espetro (n=7), isoladas em amostras biológicas de canídeos e felídeos. ESBL= Extended spectrum beta-lactamases.

A análise da Figura 6 permite concluir que a bactéria *Staphylococcus pseudintermedius* (n=16) foi identificada com mais frequência na zaragatoa cutânea (n=3) e zaragatoa auricular (n=3) correspondente a 19%, em ambos os casos. Este agente bacteriano foi também isolado em urina (13%), zaragatoa óssea (13%), zaragatoa de abcesso (6%), zaragatoa ocular (6%), zaragatoa subcutânea (6%), zaragatoa tumefação (6%), cultura de ferida cirúrgica (6%) e zaragatoa próstata (6%).

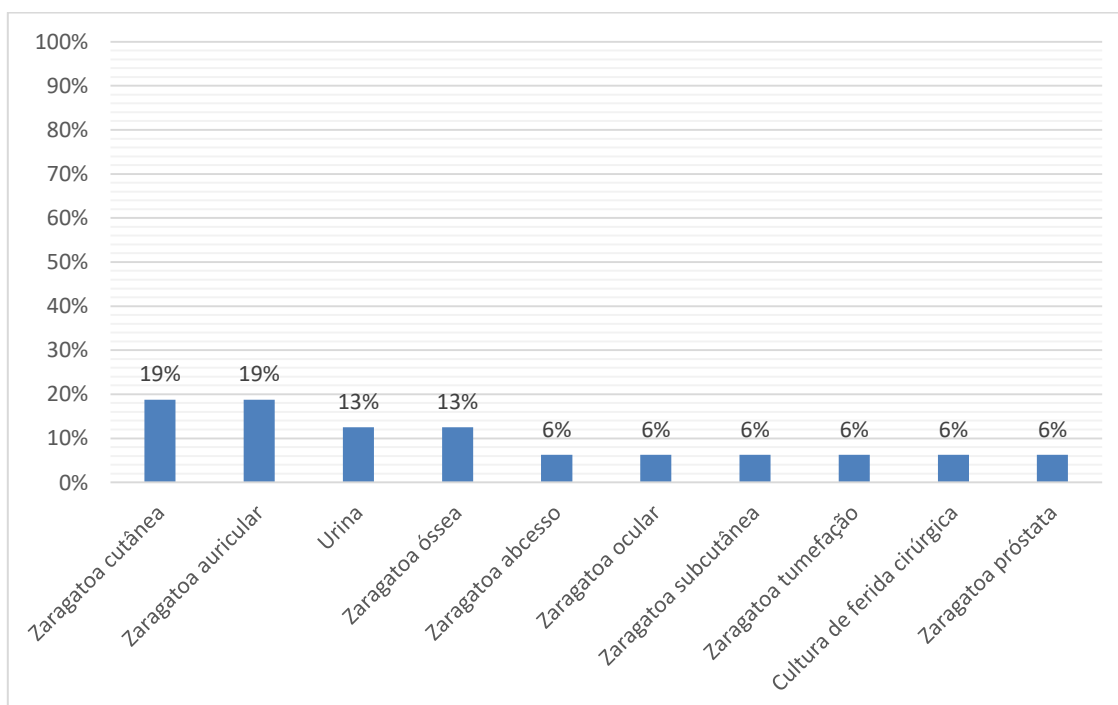


Figura 6 Distribuição percentual de isolados de *Staphylococcus pseudintermedius* nas várias amostras biológicas colhidas em canídeos e felídeos (n=16).

Na Figura 7, num total de 11 amostras, o valor 15% (representado a azul) corresponde a *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à metilina (n=2), isolado em amostras biológicas de canídeos e felídeos. As amostras biológicas corresponderam a zaragatoa de urina e cutânea.

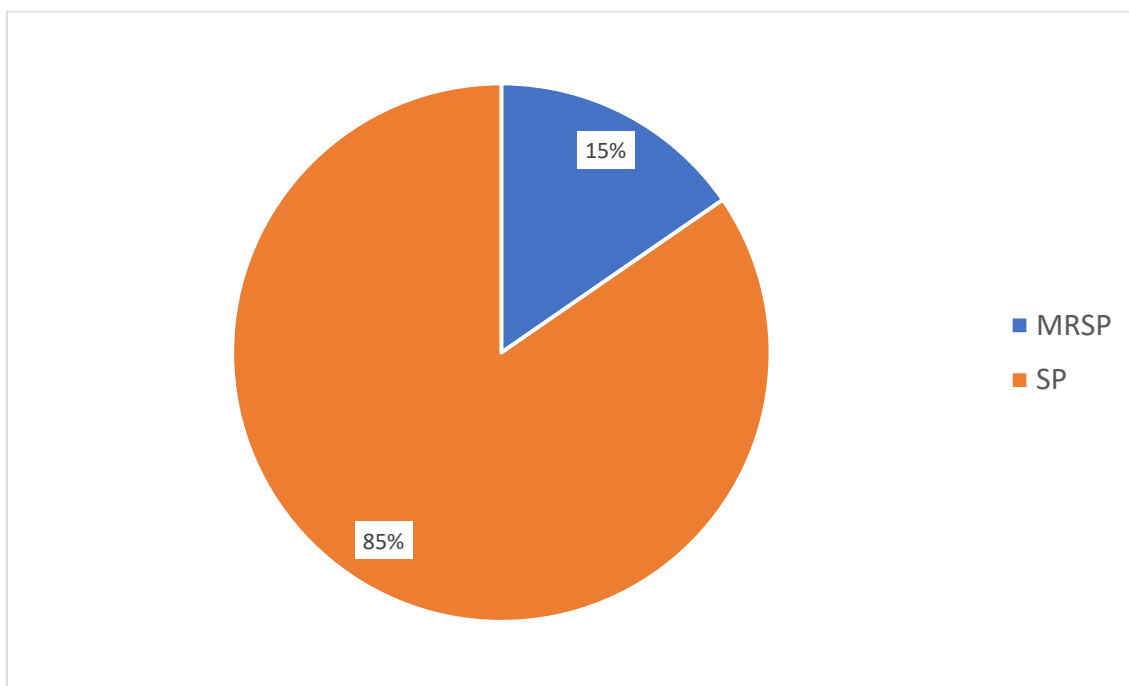


Figura 7 Percentagem de *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à metilina (n=2), isoladas em canídeos e felídeos. MRSP=Methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius*; SP= *Staphylococcus Pseudintermedius*

2.2. Avaliação do perfil de resistência em afecções do sistema urinário

Para avaliar o perfil de sensibilidade em afecções do sistema urinário foram utilizados diversos fármacos (Tabela 6), tais como: amicacina, ciprofloxacina, eritromicina, penicilina, amoxicilina, tetraciclina, gentamicina, enrofloxacina, cefotaxima, cefalotina, clindamicina, trimetoprim/sulfametoxazol, cefoxitina, ceftazidima, nitrofurantoína e amoxicilina+ácido clavulânico. A amicacina, pertencente à classe dos aminoglicosídeos, apresentou diferenças significativas no perfil de resistência relativamente ao ano de 2016, 2017 e 2018 com um valor p de 0,01.

Tabela 6 Comparação do perfil de resistência observado nos microrganismos isolados em infecções do sistema urinário, entre 2016, 2017 e 2018.

Fármaco	Valor p	Diferenças obtidas
Amicacina	0,01	S
Ciprofloxacina	-	NA
Eritromicina	-	NA
Penicilina	-	NA
Amoxicilina	0,1	NS
Tetraciclina	0,2	NS
Gentamicina	0,4	NS
Enrofloxacina	0,6	NS
Cefotaxima	0,6	NS
Cefalotina	0,7	NS
Clindamicina	0,7	NS
Trimetoprim/Sulfametoxazol	0,7	NS
Cefoxitina	0,8	NS
Ceftazidima	0,8	NS
Nitrofurantoína	0,9	NS
Amoxicilina+Ácido clavulânico	0,9	NS

Valor p =valor de significância S=significativo NS=não significativo NA=não aplicável

Tal como evidenciado na Figura 8, *E.coli* foi o agente bacteriano predominantemente isolado em afeções urinárias, com uma percentagem de 61%. Os outros agentes bacterianos, identificados por ordem decrescente, foram os seguintes: *Proteus* spp. (15%), e *Klebsiella pneumoniae* (9%), *Staphylococcus pseudintermedius* (4%), *Enterococcus faecalis* (4%), *Staphylococcus* spp. (2%), *Pseudomonas aeruginosa* (2%), *Staphylococcus aureus* (2%), *Enterococcus faecium* (2%).

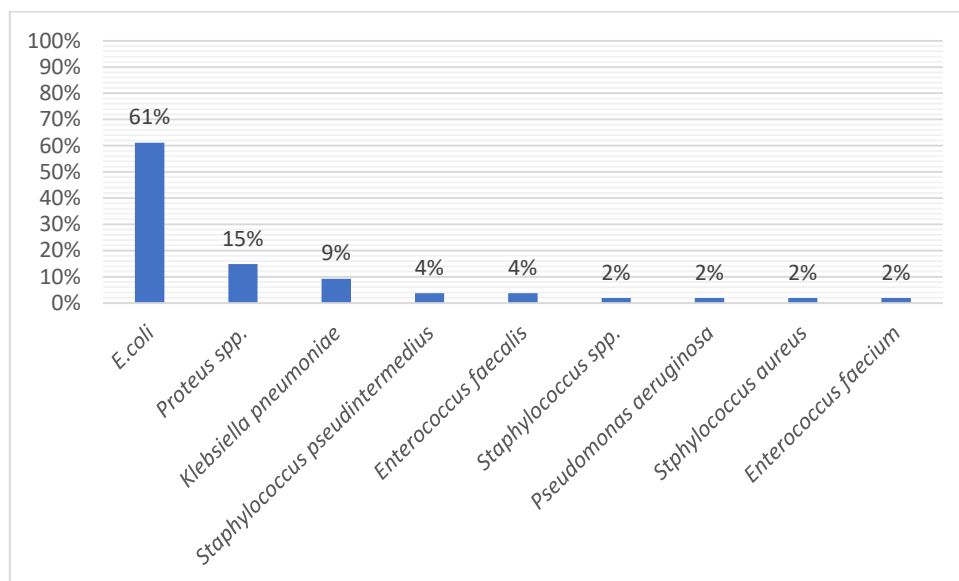


Figura 8 Distribuição percentual dos principais agentes bacterianos causadores de infecção do trato urinário (n=54).

2.3. Perfis de resistência observados nos isolados de *Escherichia coli*

Relativamente ao agente bacteriano *E.coli*, após análise do número de isolados resistentes à tetraciclina foi possível obter uma diferença significativa entre os três anos considerados ($p=0,002$). Para a amicacina e cloranfenicol, embora não se tivesse verificada diferença significativa, foi possível verificar uma tendência ($p=0.06$) com aumento de isolados resistentes no ano de 2018 (Tabela 7).

Tabela 7 Número de isolados resistentes (R), intermédios (I) e sensíveis (S) de *E.coli* observados nos anos de 2016, 2017 e 2018.

		2016	2017	2018	valor p
Amicacina	S	8	15	16	0,06
	I	0	0	4	
	R	0	0	4	
Cloranfenicol	S	4	3	3	0,06
	I	0	0	0	
	R	0	0	4	
Tetraciclina	S	8	0	0	0,002
	I	0	1	0	
	R	0	6	18	

S - sensível I – intermédio R - resistente valor p - valor de significância

2.4. Avaliação do perfil de resistência em infecções cutâneas

Para avaliar o perfil de sensibilidade em infecções cutâneas (Tabela 8), foram utilizados os seguintes fármacos: amicacina, amoxicilina, amoxicilina+ácido clavulânico, cefoxitina, ciprofloxacina, clindamicina, cloranfenicol, enrofloxacina, eritromicina, gentamicina, oxacilina, penicilina, tetraciclina e trimetoprim/sulfametoxazole. De todos os antibióticos analisados, apenas o trimetoprim/sulfametoxazole revelou diferenças significativas quando comparado o perfil de resistência das bactérias isoladas em afeções cutâneas nos três anos ($p=0,04$).

Tabela 8 Comparação do perfil de resistência observado nos microrganismos isolados em infecções cutâneas, entre 2016, 2017 e 2018

Fármaco	valor p	Diferenças obtidas
Trimetoprim/Sulfametoxazol	0,04	S
Cefoxitina	-	NA
Ciprofloxacina	-	NA
Eritromicina	-	NA
Penicilina	-	NA
Clindamicina	-	NA
Oxacilina	-	NA
Enrofloxacina	0,2	NS
Cloranfenicol	0,2	NS
Gentamicina	0,3	NS
Amoxicilina	0,5	NS
Amicacina	0,6	NS
Tetraciclina	0,6	NS
Amoxicilina+ácido clavulânico	0,7	NS

Valor p =valor de significância S=significativo NS=não significativo NA=não aplicável

Na Figura 9 os agentes bacterianos predominantes em infecções cutâneas foram *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus spp.* com uma percentagem de 27% cada um. Os outros agentes bacterianos identificados por ordem percentual decrescente foram: *Serratia marcescens* (18%), *Citrobacter spp.* (18%), *Staphylococcus aureus* (9%) e *Pseudomonas aeruginosa* (9%).

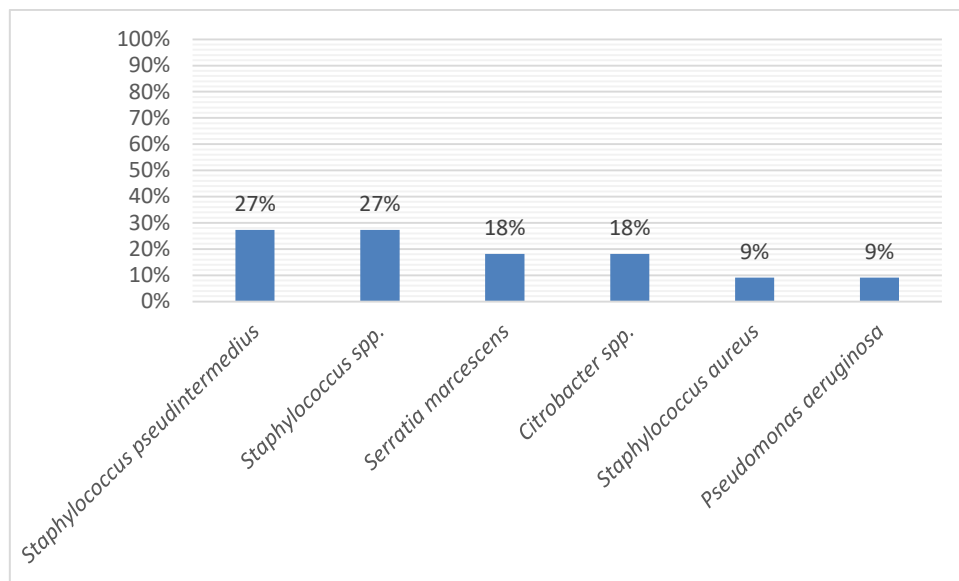


Figura 9 Distribuição percentual dos principais agentes causadores de infecções cutâneas (n=11).

2.5. Perfil de resistência nos isolados de *Staphylococcus pseudintermedius*

Ao longo dos três anos, embora a diferença não seja significativa, a bactéria *Staphylococcus pseudintermedius* apresentou tendência para o aumento dos isolados resistentes à tetraciclina ($p=0,09$) e trimetoprim/sulfametoxazol ($0,09$) (tabela 9).

Tabela 9 Número de isolados resistentes (R), intermédios (I) e sensíveis (S) de *Staphylococcus pseudintermedius* observados nos anos de 2016, 2017 e 2018.

		2016	2017	2018	valor p
Tetraciclina	S	0	9	3	0,09
	I	0	0	0	
	R	1	1	2	
Trimetoprim/Sulfametoxazol	S	1	1	2	0,09
	I	0	0	0	
	R	0	9	3	

S - sensível I – intermédio R - resistente valor p - valor de significância

DISCUSSÃO

As bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus pseudintermedius*, tanto na amostra inicial (n=206) (Figura 1), no estudo de caracterização, como na amostra analisada estatisticamente (n=136) (Figura 3) foram os microrganismos isolados em maior percentagem. Estes microrganismos foram isolados em vários produtos biológicos, sendo *E.coli* identificada maioritariamente na urina (70%) (Figura 4) e o *S.pseudintermedius* em amostras biológicas de zaragatoa cutânea (19%) e auricular (19%) (Figura 6).

De forma a caracterizar o tipo de infeções bacterianas nesta amostra de animais de companhia, estas foram divididas em infeções simples (n=136) e infeções mistas (n=148), de acordo com a presença de um ou de mais agentes bacterianos, respetivamente. Nas infeções simples *E.coli* correspondeu a um valor percentual de 35% (47/136)(Tabela 1), enquanto que *S.pseudintermedius* apareceu mais associada às infeções mistas, com um valor percentual de 14% (21/148) (Tabela 1).

Em infeções simples, *E.coli* (n=47) foi identificada com maior percentagem em urina, correspondendo a 70% (n=33) das amostras (Figura 4). Estes valores poderão estar relacionados com o facto de *E.coli* representar a gram-negativa isolada com mais frequência em urina, sendo o patotipo uropatogénico frequentemente responsável por causar infeção do trato urinário (ITU) em cães e gatos (Byron, 2018). Este patotipo possui vários fatores de virulência estruturais (e.g. fímbrias, pilli, curli e flagelos) e secretores (e.g. toxinas e sistemas de aquisição de ferro), que contribuem para a capacidade de aderir e colonizar o sistema urinário (Terlizzi, Gribaudo, & Maffei, 2017).

S.pseudintermedius (n=11) foi o agente mais frequentemente isolado em zaragatoas cutâneas (n=3) e auriculares (n=3), com um valor percentual de 19%, em ambos os casos (Figura 6). *Staphylococcus pseudintermedius* é uma bactéria gram-positiva, pertencente à família *Micrococcaceae* (Botoni et al., 2018), comensal e não patogénica da pele e mucosas de cães e gatos, contudo devido ao seu carácter oportunista é o agente bacteriano mais frequentemente associado a pioderma (Couto, 2016), infeção de feridas e otite externa (Grandolfo, 2018).

Adicionalmente, neste estudo estas bactérias foram também classificadas relativamente à resistência bacteriana a antibióticos através dos respetivos mecanismos de resistência. Esta caracterização incluiu dois grupos, tendo sido numa primeira fase analisada a totalidade de amostras, e posteriormente apenas as infeções simples, relativamente à produção de ESBL e resistência à meticilina (RM). No âmbito das infeções mistas, é de salientar que 41% das bactérias *Escherichia coli* (n=12/29) são produtoras de enzimas ESBL (Tabela 2) e 50% de *S.pseudintermedius* (n=11/22) apresentam resistência à meticilina (Tabela 3). No que respeita às infeções simples, 18% (n=7/33) de *E.coli* são produtoras de ESBL

(Figura 5), e *Staphylococcus pseudintermedius* apresenta 15% de resistência à meticilina (n=2/11) (Figura 7).

As beta-lactamases são enzimas com capacidade de inativar uma variedade de antibióticos beta-lactâmicos, mas que são inibidas por moléculas como o ácido clavulânico (Jessen et al., 2018). A produção destas enzimas é um mecanismo de resistência importante nas bactérias gram-negativas (Rendle & Page, 2018), nomeadamente em *Escherichia coli* (Jessen et al., 2018), sendo codificadas por genes *bla* e transmitidas por elementos genéticos móveis (EGM), os plasmídeos (Andrade & Darini, 2017). A ocorrência da enzima de resistência CTX-M tem vindo a aumentar (Sheppard et al., 2018), sendo atualmente a mais disseminada a nível mundial alcançando níveis de pandemia (Alós, 2015). A enzima CTX-M-15 foi já isolada em estudos realizados na Dinamarca, conferindo resistência a fluoroquinolonas e trimetoprim-sulfonamidas (Jessen et al., 2018). De referir também que a enzima *Veb-1* confere resistência a antibióticos não beta-lactâmicos (Paterson & Bonomo, 2005).

O mecanismo de resistência do *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à *meticilina*, ocorre por modificação estrutural do alvo do antibiótico, conferindo resistência a todos os fármacos beta-lactâmicos. Assim, o antibiótico tem menos afinidade na ligação à bactéria, não sendo esta efetiva (Da Costa & Silva Junior, 2017). Esta resistência é mediada pelo gene *mecA*, localizado no cromossoma bacteriano no EGM, designado por cassete cromossômica estafilocócica (EMA, CVMP, & SAGAM, 2010), que codifica a produção de uma proteína ligadora à penicilina (*PBP*) (Loncaric et al., 2019).

Foi ainda avaliado o perfil de resistência para isolados em amostras de urina (n=54) em infeções simples, constatando-se que houve uma alteração no perfil de resistência à amicacina no ano de 2018, relativamente aos anos anteriores (p=0,01) (Tabela 6). O mecanismo de resistência de microrganismos a aminoglicosídeos ocorre através da modificação enzimática do antibiótico, com a produção de enzimas como *acetiltransferases* (*aac*), *fosfotransferases* (*aph*) e *nucleotidiltransferases* (*ant*). Estas enzimas modificam os aminoglicosídeos nos grupos amina ou hidroxilo impedindo a ligação cromossômica. Os principais genes responsáveis pela resistência à amicacina são *aac*(6'), *aph*(2"), *aph*(3") subclasse III e *ant* (4') (EMA/CVMP/AWP, 2013). Os aminoglicosídeos segundo a categorização da Organização Mundial da Saúde Animal (OIE) pertencem aos "Veterinary Critically Important Antimicrobials", os quais devem ser apenas utilizados quando não existem substâncias antimicrobianas alternativas eficazes (WHO, 2016). Contudo o uso *off-label* destas substâncias tem levado ao aparecimento de bactérias multirresistentes, como *MRSP* e bactérias gram-negativas produtoras de *ESBL* (EMA et al., 2010). Segundo as *guidelines* relativas ao uso de antibióticos, a amicacina é a molécula usada para tratamento de infeções do trato urinário causadas por bactérias produtoras de *ESBL* quando não existem outras alternativas terapêuticas eficazes (Jessen et al., 2018).

Neste trabalho, *Escherichia coli* foi o agente identificado em maior percentagem (61%), nas amostras biológicas de urina (n=54), tal como observado em estudos prévios de cães e

gatos (Marques et al., 2016). Com valores também relevantes foram identificadas as bactérias *Proteus* spp (15%) e *Klebsiella pneumoniae* (9%) (Figura 8). Estes são agentes nosocomiais, com facilidade de propagação, causadoras de infecções comunitárias em humanos e animais, sendo a seguir à *E.coli* as principais Enterobacteriáceas causadoras de ITU (Marques et al., 2019). Com valores percentuais inferiores surgiram bactérias gram-positivas como *Staphylococcus pseudintermedius* (4%), *Enterococcus faecalis* (4%), *Staphylococcus* spp. (2%), *Staphylococcus aureus* (2%), *Enterococcus faecium* (2%). Embora com menor frequência as bactérias gram-positivas também podem causar infecção (Terlizzi, Gribaudo, & Maffei, 2017), sendo os agentes etiológicos mais isolados *Enterococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. (Belas & Aboim, 2018), correspondendo apenas a 15% dos casos de ITU (Carvalho et al., 2014).

Na sequência dos resultados obtidos anteriormente, procedeu-se ao estudo do perfil de resistência da bactéria *E.coli*, tendo sido possível encontrar diferença significativa no perfil de resistência à tetraciclina ao longo dos três anos ($p=0,002$). Verificou-se ainda uma tendência ($p=0,06$) para o aumento no perfil de resistência aos antibióticos cloranfenicol e amicacina (Tabela 7). A bomba de efluxo, é um mecanismo de resistência utilizado pela bactéria *E.coli* frente às tetraciclinas (Al-Bahry, Al-Sharji, Yaish, Al-Musharafi, & Mahmoud, 2016), sendo o gene envolvido o *tet* (Li et al., 2013), que codifica proteínas de efluxo ativo, designadas por *tet(K)* e *tet(L)* (Peterson & Kaur, 2018). As proteínas *tet* associadas à membrana promovem o efluxo do antibiótico para o meio extracelular, provocando alterações nas concentrações intracelulares. Para além das tetraciclinas, as principais classes de antibióticos afetadas são os macrólidos e fluoroquinolonas (Da Costa & Silva Junior, 2017). A resistência ao cloranfenicol ocorre através da inativação do antibiótico por uma reação de acetilação mediada pela enzima *cat* (acetiltransferase do cloranfenicol), o qual deixa de ter a capacidade de ligação aos ribossomas (Sultan et al., 2018).

De forma similar, o perfil de resistência para amostras de zangado cutânea ($n=16$) em infecções simples, durante os 3 anos foi igualmente avaliada, tendo-se verificado uma alteração no perfil de resistência ($p=0,04$) ao trimetoprim/sulfametoxazol no ano de 2018 comparativamente ao ano de 2016 e de 2017 (Tabela 8). A resistência às sulfonamidas acontece por modificação do alvo celular que ocorre através de mutação cromossômica, ocorrendo mutação nos genes que codificam as enzimas dihidropteroato sintetase e dihidrofolato redutase, reduzindo-se a afinidade da ligação (Brassard, Ainslie, & Secher, 2014).

Nas amostras biológicas de zangado cutânea e auricular, a bactéria *Staphylococcus pseudintermedius* (27%) foi a principal responsável em infecções cutâneas (Figura 9). Com o mesmo valor foi identificado *Staphylococcus* spp. (27%) e com valores mais baixos identificou-se *Serratia marcescens* (18%), *Citrobacter* spp. (18%), *Staphylococcus aureus* (9%) e *Pseudomonas aeruginosa* (9%). *Serratia marcescens* e *Citrobacter* spp. são agentes bacterianos oportunistas, causadores de infecções graves, podendo causar abscessos, lesões granulomatosas, úlceras, sendo agente secundários em infecções cutâneas (Santos et al., 2015).

Em relação a *Staphylococcus pseudintermedius* verificou-se uma tendência para o aumento da resistência à tetraciclina e trimetoprim-sulfametoxazole ($p=0,09$) ao longo dos três anos.

Em conclusão constatou-se que, ao longo dos anos de 2016, 2017 e 2018, ocorreu uma alteração no perfil de resistência em amostras de urina e de zaragatoas cutâneas, e em agentes bacterianos designadamente em *E.coli* e *S.pseudintermedius*.

Segundo a iniciativa *One Health* a saúde humana está relacionada com a saúde animal e com o ambiente. O uso de antibióticos na medicina veterinária leva a uma pressão seletiva para o aparecimento de bactérias resistentes a antimicrobianos, incluindo bactérias patogénicas e comensais de animais. Estas bactérias têm a capacidade de infetar o Homem, pois este mantém um contato próximo com animais de companhia, que são muitas vezes reservatórios de bactérias multirresistentes.

Os resultados deste estudo evidenciam a importância do uso racional de antibióticos, por parte do Médico Veterinário e tutor do animal. É importante ter em consideração as recomendações das entidades nacionais e europeias (EMA; ECDC, OIE) no que respeita à classificação e utilização adequada dos antibióticos (Anexo III).

Este estudo permitiu verificar uma alteração no perfil de resistências em animais de companhia, nomeadamente em infeções provocada por *E.coli*, tal como se tem verificado em estudos nacionais e internacionais publicados recentemente.

Numa perspetiva futura, seria importante tentar perceber se existe uma eventual relação entre a profissão do tutor (nomeadamente profissões relacionadas com a saúde) e a transmissão de bactérias resistentes, dado que esta vertente não está ainda muito estudada nos animais de companhia.

REFERÊNCIAS

- Al-Bahry, S., Al-Sharji, N., Yaish, M., Al-Musharafi, S., & Mahmoud, I. (2016). Diversity of Tetracycline Resistant Genes in *Escherichia coli* from Human and Environmental Sources. *The Open Biotechnology Journal*, 10(1), 289–300. <https://doi.org/10.2174/1874070701610010289>
- Alós, J. I. (2015). Antibiotic resistance: A global crisis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 33(10), 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>
- Andrade, L. N., & Darini, A. L. C. (2017). Bacilos gram-negativos produtores de beta-lactamases: que bla bla bla é esse? *Journal of Infection Control*, 6(1), 1–29.
- Argudín, M. A., Deplano, A., Meghraoui, A., Dodémont, M., Heinrichs, A., Denis, O., ... Roisin, S. (2017). Bacteria from animals as a pool of antimicrobial resistance genes. In *Antibiotics* (Vol. 6). <https://doi.org/10.3390/antibiotics6020012>
- Belas, A., & Aboim, C. (2018). *Emergence of Escherichia coli ST131 H 30 / H 30-Rx subclones in companion animals*. 4–6. <https://doi.org/10.1093/jac/dky381>
- Botoni, L. S., Nazilton de Paula Reis Filho, Scherer, C. B., Braga, L., Leme, F. de O. P., & Costa-Val, A. P. (2018). Piodermite superficial canina por *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à metilicina (MRSP). *Medvep Dermato - Revista de Educação Continuada Em Dermatologia e Alergologia Veterinária*, (January), 270–277.
- Brassard, P., Ainslie, P. N., & Secher, N. H. (2014). MECHANISMS OF ANTIBIOTIC RESISTANCE. *Frontiers in Microbiology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00458>
- Byron, J. K. (2018). Urinary Tract Infection. *Veterinary Clinics of NA: Small Animal Practice*. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2018.11.005>
- Choffnes, E. R., Relman, D. A., & Mack, A. (2010). *Antibiotic Resistance: Implications for Global Health and Novel Intervention Strategies: Workshop*. Retrieved from <https://www.nap.edu/>
- Clatworthy, A. E., Pierson, E., & Hung, D. T. (2007). Targeting virulence: A new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature Chemical Biology*, 3(9), 541–548. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2007.24>
- Couto, N. M. G. Do. (2016). *Insights Into The Dynamics Of Methicillin-Resistant Staphylococci In Animals - A Focus On Spaphylococcus Pseudintermedius In Dogs*. Universidade de Lisboa.
- Da Costa, A. L. P., & Silva Junior, A. C. S. (2017). Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. *Estação Científica (UNIFAP)*, 7(2), 45. <https://doi.org/10.18468/estcien.2017v7n2.p45-57>
- Doi, Y., Wachino, J. ichi, & Arakawa, Y. (2016). Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(2), 523–537. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.011>
- Dugassa, J., & Shukuri, N. (2017). Antibiotic Resistance and Its Mechanism of Development. *Journal of Health, Medecine and Nursing*, 1(3), 1–17.
- ECDC. (2018). Surveillance of antimicrobial resistance in Europe Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2017. In *European Centre for Disease Prevention and Control: Surveillance Report*. <https://doi.org/10.2900/230516>
- ECDC, & EMA. (2015). Orientações para utilização prudente de agentes antimicrobianos na medicina veterinária. *Jornal Oficial Da União Europeia*, 7–26. Retrieved from http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2009/11/WC500008770.pdf

- EMA/CVMP/AWP. (2013). *Use of colistin in food-producing animals in the European Union: development of resistance and impact on human and animal health* EMA/755938/2012. 44(July), 1–44. Retrieved from www.ema.europa.eu/ema/pages/includes/document/open_document.jsp?webContentId=WC500146813
- EMA. (2018). *Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2016- Trends from 2010 to 2016- Eight ESVAC report*. 176. <https://doi.org/10.1016/j.phpro.2011.05.019>
- EMA, CVMP, & SAGAM. (2010). "Reflection paper" - *Reflection paper on meticillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius of Committee for Medical Products for Veterinary Use (CVMP)*. 44(September), 1–25. Retrieved from http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2010/09/WC500097080.pdf
- Florez-Cuadrado, D., Moreno, M. A., Ugarte-Ruiz, M., & Domínguez, L. (2018). Antimicrobial Resistance in the Food Chain in the European Union. *Advances in Food and Nutrition Research*, 86, 115–136. <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.04.004>
- Gajdács, M. (2019). *The Concept of an Ideal Antibiotic: Implications for*. (Cdc). <https://doi.org/10.3390/molecules24050892>
- Grandolfo, E. (2018). Looking through Staphylococcus pseudintermedius infections: Could spa be considered a possible vaccine target? *Virulence*, 9(1), 703–706. <https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1426964>
- Guardabassi, L., Damborg, P., Stamm, I., Kopp, P. A., Broens, E. M., & Toutain, P. L. (2017). Diagnostic microbiology in veterinary dermatology: present and future. *Veterinary Dermatology*, 28(1), 146-e30. <https://doi.org/10.1111/vde.12414>
- Guimarães, D. O., Momesso, L. da S., & Pupo, M. T. (2010). Antibióticos: Importância Terapêutica e Perspectivas Para a Descoberta e Desenvolvimento de Novos Agentes. *Quim. Nova*, 33, 667–679.
- Hartantyo, S. H. P., Chau, M. L., Fillon, L., Ariff, A. Z. B. M., Kang, J. S. L., Aung, K. T., & Gutiérrez, R. A. (2018). Sick pets as potential reservoirs of antibiotic-resistant bacteria in Singapore. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 7(1), 9–11. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0399-9>
- Ishii, J. B., Freitas, J. C., & Arias, M. V. B. (2011). Resistência de bactérias isoladas de cães e gatos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (2008-2009). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 31(6), 533–537. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2011000600013>
- Jessen, L. R., Damborg, P., Spohr, A., Langhorn, S. G.-P. R., Houser, G., Willesen, J., ... Sørensen, T. M. (2018). *Antibiotic Use Guidelines for Companion Animal Practice* (2nd ed.). Companion Animal Group, Danish Veterinary Association.
- Kohl, T., Pontarolo, G. H., & Pedrassani, D. (2016). Resistência antimicrobiana de bactérias isoladas de amostras de animais atendidos em hospital veterinário. *Saúde e Meio Ambiente: Revista Interdisciplinar*, 5(2), 115–127. <https://doi.org/10.24302/sma.v5i2.1197>
- Kon, K., & Rai, M. (2016). Antibiotic Resistance: Mechanisms and New Antimicrobial Approaches. In *Antibiotic Resistance: Mechanisms and New Antimicrobial Approaches*. <https://doi.org/10.1016/C2015-0-00104-6>
- Li, W., Atkinson, G. C., Thakor, N. S., Allas, U., Lu, C. C., Yan Chan, K., ... Frank, J. (2013). Mechanism of tetracycline resistance by ribosomal protection protein Tet(O). *Nature Communications*, 4. <https://doi.org/10.1038/ncomms2470>
- Lima, C. C., Benjamim, S. C. C., & Santos, R. S. dos S. (2017). Bacterial Resistance Mechanism Drugs: A Review. *Cuidarte Enfermagem*, 11(1), 105–113.

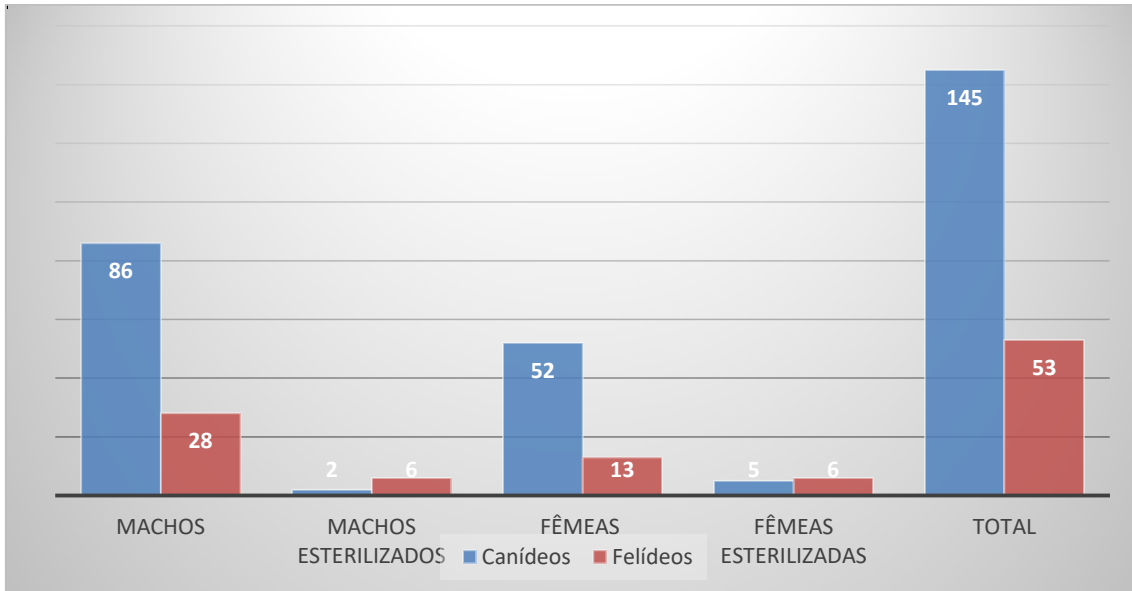
- Loncaric, I., Tichy, A., Handler, S., Szostak, M., Tickert, M., Diab-Elschahawi, M., ... Künzel, F. (2019). Prevalence of Methicillin-Resistant Staphylococcus sp. (MRS) in Different Companion Animals and Determination of Risk Factors for Colonization with MRS. *Antibiotics*, 8(2), 36. <https://doi.org/10.3390/antibiotics8020036>
- Loureiro, R. J., Roque, F., Rodrigues, A. T., Herdeiro, M. T., & Ramalheira, E. (2016). O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. *Revista Portuguesa de Saúde Pública*, 4(1), 36–43. <https://doi.org/10.1016/j.rpsp.2015.11.003>
- Marques, C., Belas, A., Aboim, C., Cavaco-Silva, P., Trigueiro, G., Gama, L. T., & Pomba, C. (2019). Evidence of Sharing of *Klebsiella pneumoniae* Strains between Healthy Companion Animals and Cohabiting Humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(6). <https://doi.org/10.1128/JCM.01537-18>
- Marques, C., Belas, A., Franco, A., Aboim, C., Gama, L. T., & Pomba, C. (2017). Increase in antimicrobial resistance and emergence of major international high-risk clonal lineages in dogs and cats with urinary tract infection: 16 year retrospective study. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(2), 377–384. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx401>
- Marques, C., Gama, L. T., Belas, A., Bergström, K., Beurlet, S., Briend-marchal, A., ... Loncaric, I. (2016). European multicenter study on antimicrobial resistance in bacteria isolated from companion animal urinary tract infections. *BMC Veterinary Research*, 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0840-3>
- Munita, JM. and Arias, C. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance Mechanisms of Antibiotic Resistance. *The University of Oklahoma Health Sciences Center*, 23(5), 1–45. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- OIE. (2019). *Glossary*. 1–12.
- Paterson, D. L., & Bonomo, R. A. (2005). Clinical Update Extended-Spectrum Beta-Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 657–686. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657>
- Peterson, E., & Kaur, P. (2018). Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Relationships between resistance determinants of antibiotic producers, environmental bacteria, and clinical pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02928>
- Pomba, C., Rantala, M., Christina, G., Baptiste, K. E., Catry, B., Duijkeren, E. Van, ... Torneke, K. (2016). Public health risk of antimicrobial resistance transfer from companion animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1–12. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw481>
- Quinn, P. J., Markey, B. K., Leonard, F. C., E.S.Fitzpatrick, & S, F. (2016). Resistência bacteriana aos fármacos. In ARTMED (Ed.), *Microbiologia Veterinária* (2ª edição).
- Regulamento (CE) n.º 1831/2003. Regulamento (CE) n.º 1831/2003 - Relativo aos aditivos destinados à alimentação animal. , 268 Jornal Oficial da União Europeia § (2003).
- Regulamento (CE) N.º 2160/2003. (2003). Regulamento (CE) N.º 2160/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho de 17 de novembro de 2003 relativo ao controlo de salmonelas e outros agentes zoonóticos específicos de origem alimentar. *Jornal Oficial Da União Europeia*, L 325/1, 1–15. Retrieved from <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003R2160&from=PT>
- Rendle, D. I., & Page, S. W. (2018). Antimicrobial resistance in companion animals. *Equine Veterinary Journal*, 50(2), 147–152. <https://doi.org/10.1111/evj.12785>
- Runcie, H. (2015). Infection in a Pre-Antibiotic Era. *Journal of Infectious Diseases & Preventive Medicine*, 03(02). <https://doi.org/10.4172/2329-8731.1000125>
- Santos, G. S., Solidônio, E. G., Costa, M. C. V. V, Melo, R. O. A., Souza, I. F. A. C. De, & Silva,

- G. R. (2015). Study of the Enterobacteriaceae Group CESP (Citrobacter , Enterobacter , Serratia , Providencia , Morganella and Hafnia): A Review. In *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs* (pp. 794–805).
- Schmidt, V. M., Pinchbeck, G., McIntyre, K. M., Nuttall, T., McEwan, N., Dawson, S., & Williams, N. J. (2018). Routine antibiotic therapy in dogs increases the detection of antimicrobial-resistant faecal Escherichia coli. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 1–12. <https://doi.org/10.1093/jac/dky352>
- Sheppard, S. K., Hitchings, M. D., Pinchbeck, G., Royden, A., Ormandy, E., Pascoe, B., & Williams, N. J. (2018). Prevalence of faecal carriage of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing Escherichia coli in veterinary hospital staff and students. *Veterinary Record Open*, 6(1). <https://doi.org/10.1136/vetreco-2018-000307>
- Sultan, I., Rahman, S., Jan, A. T., Siddiqui, M. T., Mondal, A. H., & Haq, Q. M. R. (2018). Antibiotics, resistance and resistance mechanisms: A bacterial perspective. *Frontiers in Microbiology*, 9(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02066>
- Terlizzi, M. E., Gribaudo, G., & Maffei, M. E. (2017). *UroPathogenic Escherichia coli (UPEC) Infections: Virulence Factors , Bladder Responses , Antibiotic , and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies*. 8(August). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01566>
- WHO. (2014). *Antimicrobial Resistance - Global Report on Surveillance, World Health Organization*. <https://doi.org/10.1007/s13312-014-0374-3>
- WHO. (2016). The OIE Strategy on Antimicrobial Resistance and the Prudent Use of Antimicrobials. *World Organization for Animal Health*, (November), 1–61. Retrieved from http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/PortailAMR/EN_OIE-AMRstrategy.pdfhttp://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/PortailAMR/EN_OIE-AMRstrategy.pdfwww.oie.int/antimicrobial-resistance
- WHO. (2017). Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS) Report. In *Who*. [https://doi.org/ISBN 978-92-4-151344-9](https://doi.org/ISBN%20978-92-4-151344-9)

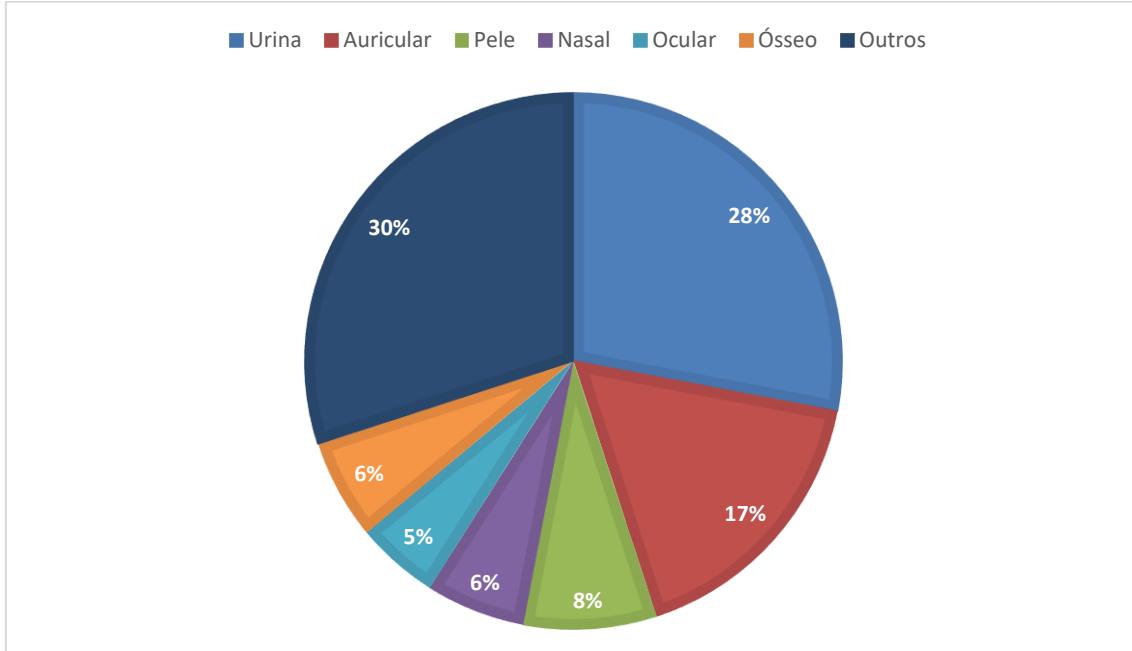
ANEXOS

Anexo I

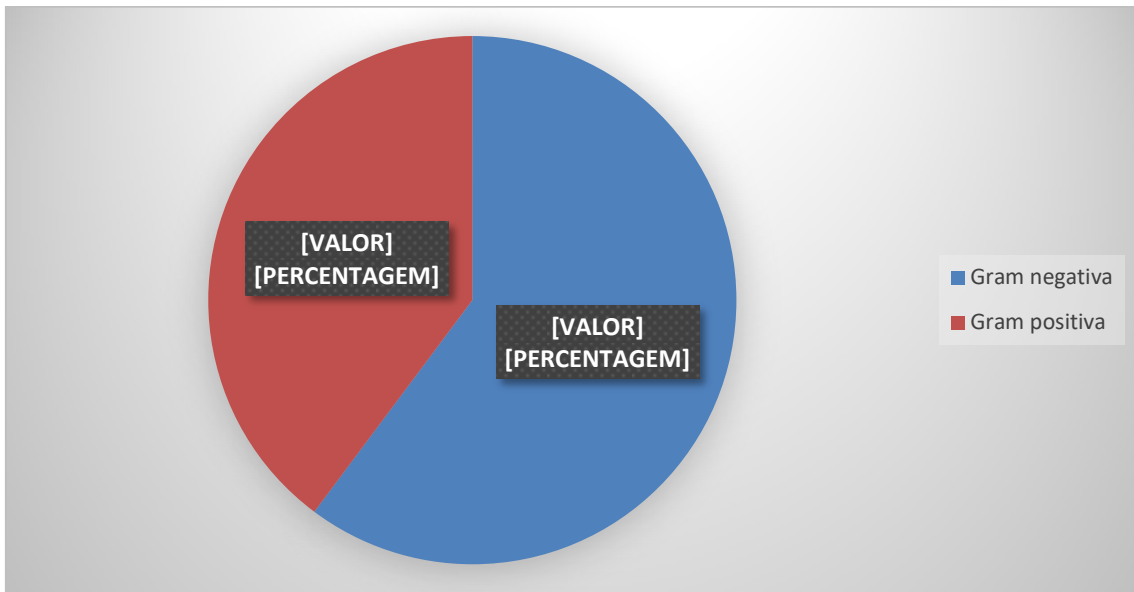
A1. Caracterização de animais por sexo (n=206)



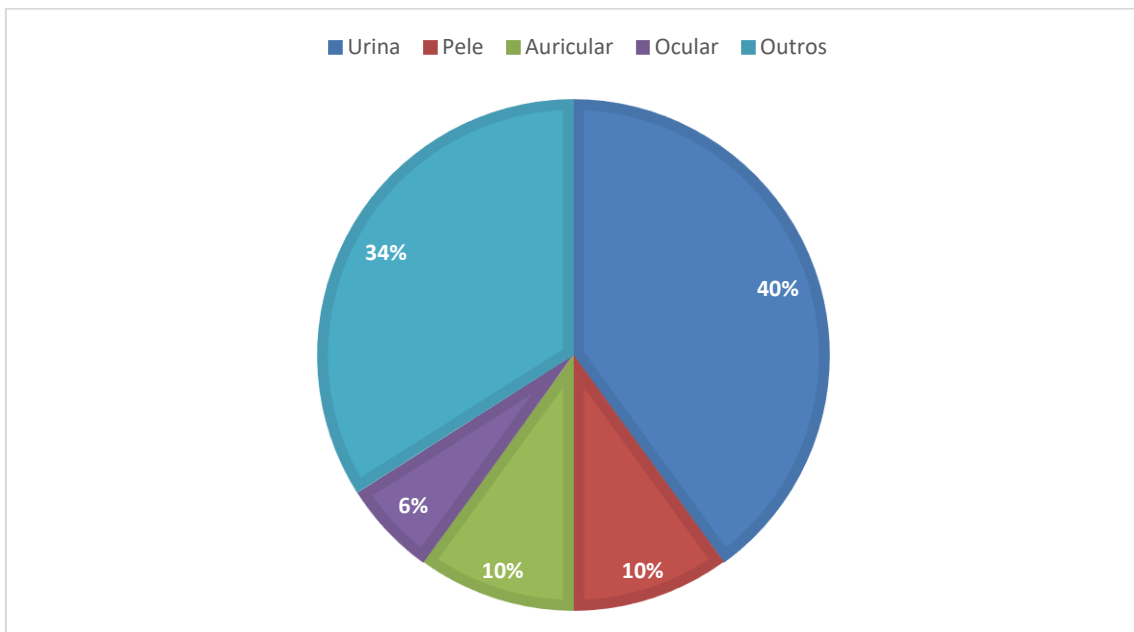
A2. Percentagem de produtos biológicos (n=206)



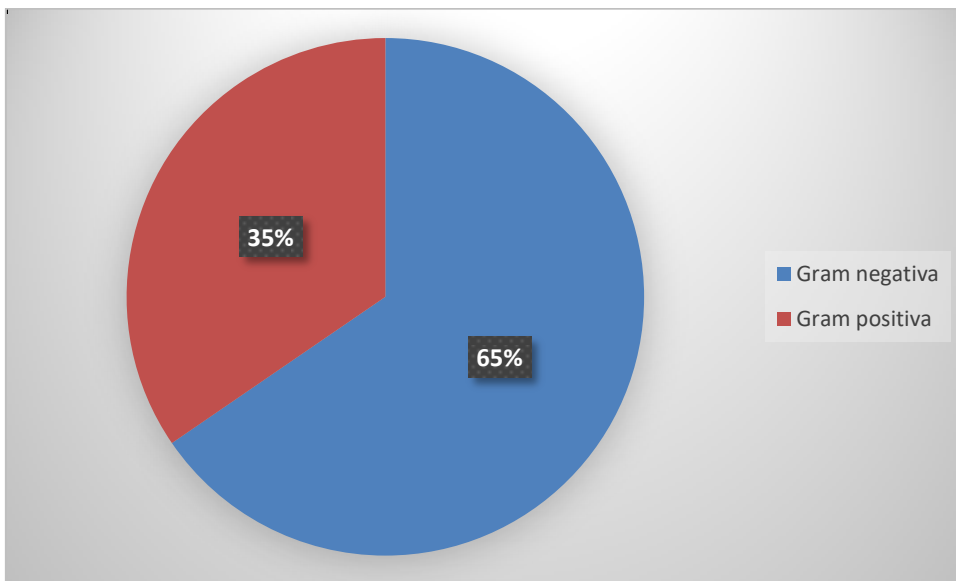
A3. Percentagem de bactérias gram-negativas e gram-positivas (n=284).



A4. Percentagem de produtos biológicos (n=136)



A5. Percentagem de gram-negativas e gram-positivas (n=136)



Anexo II

B1. Mecanismos de resistência e genes associados.

Mecanismo de resistência	Resistência intrínseca	Resistência adquirida	Referências bibliográficas
Modificação/degradação de antibiótico	<i>aac</i> (2 ['])-Ia	<i>aac</i> (6 ['])Ib-cr	(EMA/CVMP/AWP, 2013)
	<i>bla</i> (AmpC)	<i>aac</i> (3 ['])IV, <i>aph</i> (2 [']), <i>aph</i> (3 ['])-III, <i>ant</i> (4 ['])	(Peterson & Kaur, 2018)
		<i>TEM</i> -3	(Da Costa & Silva Junior, 2017)
		<i>bla</i> CTX-M; <i>bla</i> VEB-1	(Argudín et al., 2017)
		<i>cat</i> pC221	
Bomba de efluxo	<i>AcrAB/TolC</i>	<i>tet</i> _K ; <i>tet</i> _L	(Peterson & Kaur, 2018)
	<i>NorA</i>	<i>QacC</i>	
Modificação do alvo de ligação do antibiótico	<i>PBP</i> ; <i>PBP1</i>	<i>PBP</i> ; <i>PBP2a</i> (<i>MecA</i>)	(Peterson & Kaur, 2018)
	<i>VanC</i> , <i>VanXYC</i> , <i>VanTC</i> , <i>VanRC</i> , <i>VanSC</i>	<i>ErmC</i>	(Doi, Wachino, & Arakawa, 2016)
	<i>ErmMT</i>	<i>ArmA</i>	
	<i>EfmM</i>	<i>Low affinity DHPS</i> (sulfonamide)	
Proteção do alvo	<i>LsaA</i>	<i>Tet</i> _O ; <i>Tet</i> _M	(Peterson & Kaur, 2018)
			(Munita, JM. and Arias, 2016)
			(Argudín et al., 2017)

Anexo III

A European Medicines Agency e Antimicrobial Expert Group em 2017 a pedido da OMS atualizaram a categorização de classe de antimicrobianos, tendo incluído critérios adicionais como a disponibilidade de antimicrobianos alternativos na medicina veterinária. A classificação atualizada compreende **quatro** categorias:

Categoria A ("Evitar") - inclui classes antimicrobianas atualmente não autorizadas em medicina veterinária na UE. Para estes medicamentos, é proibida a sua utilização em animais destinados à produção de alimentos e só podem ser administrados a animais de companhia em circunstâncias excepcionais. Exemplos: amidinopenicilinas, carbapenémicos e outros penemes, cefalosporinas (ATC code J01D1), glicopeptídeos, gliciclina, lipopeptídeos, monobactams, oxazolidinonas, carboxipenicilinas, e ureidopenicilinas combinadas com inibidores de beta-lactamases, derivados de ácido fosfónico, ácido pseudomónico, riminofenazinas, estreptograminas, sulfonas, fármacos usados para tratamento de tuberculose ou outras micobactérias.

Categoria B ("Restringir") - o uso desses antimicrobianos em animais deve ser restrito para mitigar o risco à saúde pública. Estes antimicrobianos restritos devem ser apenas usados para o tratamento de condições clínicas quando não existem antimicrobianos numa categoria abaixo que consigam ser efetivos. Especialmente para esta categoria, o uso de antimicrobianos deve ser baseado nos resultados de TSA sempre que possível. Exemplos: *Very critically important antibiotics (VCIA)*: cefalosporinas de 3ª e 4ª geração, quinolonas (fluoroquinolonas e outras quinolonas); *Veterinary Highly Important Antimicrobials (VHIA)*: Polimixinas (colistina)

Categoria C ("Cuidado") - abrange os antimicrobianos para os quais, em geral, existem alternativas na medicina humana na UE, mas na medicina veterinária existem poucas alternativas em determinadas indicações. Esses antimicrobianos devem ser utilizados apenas quando não houver substâncias antimicrobianas na categoria D que sejam eficazes. Exemplos: *VCIA*: aminoglicosídeos e aminociclitol, aminopenicilinas em combinação com inibidores de beta-lactamases (amoxicilina+ácido clavulânico), anfenicóis (florfenicol e tiamfenicol), cefalosporinas de 1ª e 2ª geração e cefamicinas, macrólidos; *VHIA*: lincosamidas, pleuromutilinas e rifamicinas.

A categoria D ("Prudência") - é a categoria de menor risco. Podem ser usados em animais de maneira prudente, o uso desnecessário e por longos períodos de tratamento devem ser evitados e o tratamento em grupo deve ser restrito a situações em que o tratamento individual não é viável. Exemplos: *VCIA*: aminopenicilinas sem inibidores de beta-lactamases, penicilinas (antiestafilocócicas e naturais de curto espectro), sulfonamidas, inibidores da dihidrofolato redutase e combinações e tetracilinas; *VHIA*: polipeptídeos cíclicos (bacitracina); não definido:

Derivados de nitrofurano (nitrofurantoína), nitroimidazóis. *VIA*: Antimicrobianos esteróides (ácido fusídico).