

IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA E SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA DO FLUÍDO DE LAVAGEM TRAQUEOBRÔNQUICA DE CÃES SADIOS E DOENTES

BASSO, P.C.¹; RAISER, A.G.²; BRUN, M.V.³; BARCELLOS, H.H.A.³; RODRIGUES, L.B.³; SANTOS, L.R.³; BORTOLINI, C.E.⁴; SCALCO NETO, J.F.⁵; MÜLLER, D.C.M.¹; TRINDADE, A.B.⁴; SPRADA, A.G.^{6*}; RIVIERA, F.B.⁷

Resumo

Pesquisas nacionais sobre a utilização e a resistência dos antimicrobianos em animais são realizadas em diversos países, no entanto poucos estudos incluem bactérias de animais de companhia. O objetivo desse trabalho foi verificar a prevalência de resistência antimicrobiana no fluído do lavado traqueobrônquico de cães saudáveis e doentes. Foram utilizados 20 cães, divididos em dois grupos, 10 animais clinicamente saudáveis (grupo 1) e 10 animais (grupo 2) com distúrbio respiratório. A colheita do lavado traqueobrônquico foi realizada através de um tubo endotraqueal ou guiada com o auxílio de um endoscópio rígido. Foram realizadas culturas bacterianas das amostras obtidas de ambos os grupos, e posteriormente utilizou-se discos de difusão para a mensuração da sensibilidade antimicrobiana. As bactérias isoladas foram: *haemophilus aphrophilus*, *Staphylococcus aureus e epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosas* e *Proteus mirabilis*. Sessenta e três por cento das cepas bacterianas isoladas demonstraram resistência bacteriana. Dentre os antibióticos resistentes destacam-se a ampicilina, tetraciclina, sulfa e trimetropim, cefoxitina, cefalotina, ciprofloxacina entre outros. Conclui-se que a resistência a ação dos antibióticos está presente tanto em animais saudáveis quanto em animais doentes e que a ceftriaxona e a amoxicilina associada quando associadas com ácido clavulânico são efetivos contra as bactérias do trato respiratório de cães.

Introdução

Os antibióticos são usados em animais de companhia, exóticos e de produção para prevenir, controlar ou tratar infecções, incluindo entéricas, respiratórias, urogenitais e dermatológicas. Pesquisas enfocando a utilização e resistência antimicrobiana em humanos e animais de produção são realizadas em vários países europeus. Entretanto, os animais de companhia são raramente incluídos nesses experimentos ou realizados com animais doentes (DAMBORG et al., 2008).

DAMBORG et al (2008) descrevem um aumento do uso de antimicrobianos em cães e gatos, particularmente agentes de amplo espectro tais como

¹ Pós-graduanda do Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). Rua Henrique dias, 125/10, Centro, Santa Maria-RS. E-mail: paula.basso@bol.com.br.

² Professor titular do Curso de Medicina Veterinária da UFSM.

³ Professor da Universidade de Passo Fundo (UPF).

⁴ Pós-graduando do Curso de Medicina Veterinária da Universidade federal do Rio grande do Sul (UFRGS).

⁵ Graduando do Curso de Medicina Veterinária da UPF.

⁶ Graduanda do Curso de Medicina Veterinária da UFSM.

⁷ Médico Veterinário Autônomo

fluoroquinolonas, cefalosporinas e penicilinas com ácido clavulânico. A consequência desse aumento na utilização de antibióticos é a emergência de vários fenótipos resistentes de relevância clínica, o que poderá resultar em insucesso no tratamento das doenças. Alguns desses microorganismos resistentes incluem *Staphylococcus aureus* resistentes a metacilinas, enterococcus resistentes a vancomicina e *Escherichia coli* produtoras de beta-lactamases (DAMBORG et al., 2008).

Os distúrbios do parênquima pulmonar são freqüentemente diagnosticados em cães e gatos. Dentre eles encontram-se as pneumonias infecciosas (bacterianas, fúngicas, parasitárias e protozoarianas), as neoplasias (primárias e metastáticas) e as doenças pulmonares intersticiais (pneumonia eosinofílica, fibrose pulmonar intersticial, pneumonia intersticial linfocítica, pneumonia lipídica endógena, entre outras) (REINEIRO e COHN, 2007). A avaliação antimicrobiana do fluido da lavagem broncoalveolar é de grande acurácia para identificar os agentes envolvidos nas infecções das vias aéreas e determinar a terapia antibiótica adequada. Amostras de lavado broncoalveolar podem ser obtidas por meio de tubo endotraqueal, broncoscopia flexível, e com utilização de sonda gástrica associada com o uso de endoscópio rígido (BASSO et al., 2008).

O método de disco difusão para avaliação da susceptibilidade antimicrobiana é um dos métodos mais utilizados nos laboratórios de microbiologia. Esse método é qualitativo, ou seja, permite classificar a amostra bacteriana em suscetível, intermediária ou resistente ao antimicrobiano. É um método prático, de fácil execução e idealizado para bactérias de crescimento rápido. Os reagentes são relativamente econômicos, não há necessidade de equipamentos especiais, além de apresentar grande flexibilidade na escolha do número e tipo de antimicrobianos a serem testados (SEJAS et al., 2003).

Assim, o presente trabalho teve por objetivo investigar os níveis de resistência antimicrobiana de bactérias isoladas de fluido de lavado broncoalveolar de cães saudáveis e com sinais clínicos de doença respiratória.

Material e métodos

Foram utilizados 20 cães, 13 fêmeas e sete machos, de raças e idades variadas, provenientes da região de Passo Fundo (RS). Dentre estes, 10 cães apresentavam-se clinicamente saudáveis, denominados Grupo 1 (G1), e os outros 10 apresentavam doença respiratória, compondo o Grupo 2 (G2). Dentro de cada grupo, seis cães foram submetidos à técnica tradicional de colheita de lavado traqueobrônquico por meio de tubo endotraqueal e quatro, à técnica de colheita de lavado traqueobrônquico guiada por endoscópio rígido,

Para a lavagem traqueobrônquica, os animais foram pré-medicados com maleato de acetilpromazina 0,2% (0,05mg kg⁻¹, IM) e sulfato de morfina (0,5mg kg⁻¹, IM). Após 15 minutos, foram induzidos com tiopental sódico (12mg kg⁻¹, IV). Para a manutenção anestésica foram administradas sucessivas doses do anestésico injetável conforme a necessidade. Os cães foram posicionados em decúbito esternal, e com o auxílio de um laringoscópio foi introduzida uma sonda gástrica número 12 ou 20 no interior da traquéia, sendo o tamanho da sonda associado ao peso corporal do animal. Tal sonda foi posicionada até a região anterior à bifurcação da traquéia, estimada externamente pelo quarto espaço intercostal. Foi infundido, com seringas de 20ml, de 5 a 13ml kg⁻¹ de solução de

NaCl 0,9% estéril. Após a infusão foram realizadas sucessivas aspirações do líquido com seringa de 60ml.

Para a técnica guiada por endoscópio rígido, os cães foram submetidos à mesma tranquilização e anestesia citada acima. O procedimento de acesso à luz traqueal foi similar ao descrito anteriormente, no qual foi empregada uma sonda gástrica estéril número 12, introduzida através do traqueotubo, mantendo-se o animal em decúbito ventral. Em seguida, foi retirado o traqueotubo e introduzido no interior da traquéia um endoscópio rígido de 10mm e zero graus, acoplado a um sistema de vídeo. Foi infundido de 1 a 2ml/kg de NaCl 0,9%. Posteriormente, foram realizadas sucessivas aspirações do líquido. Terminado o procedimento, todos os animais receberam suplementação de oxigênio por quinze minutos e foram medicados com furosemida 2mg kg^{-1} , via intravenosa.

As amostras destinadas à cultura bacteriana foram acondicionadas em frascos estéreis e 10 μ l plaqueados em superfície em cada ágar (MacConkey, manitol e ágar sangue). As placas foram incubadas por 24hs a 37°C, realizando-se após leitura das placas e coloração de Gram e provas bioquímicas confirmatórias das colônias. As bactérias isoladas foram submetidas ao teste de sensibilidade a antimicrobianos, frente aos seguintes princípios ativos: ampicilina (A), cefalotina (CE), ciprofloxacina (CIP), gentamicina (GE), tetraciclina (TET), cloranfenicol (CLO), amoxicilina com ácido clavulânico, sulfa e trimetropim (SUL), amicacina (AIC), azetreonam (AZ), cefoxitina (CF), ceftriaxona, piperacilina (PIP) e clotrimazole (CLT). A realização dos testes, leitura e interpretação dos halos de inibição foram realizadas conforme os padrões do NCCLS (2003). Os valores da contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/ml) de fluido traqueobrônquico coletado foram analisados estatisticamente por teste-T, considerando as diferenças como significativas quando $P < 0,05$. Foi constatado, pelo teste de Hartley, que as variâncias eram heterogêneas e por isso, os dados foram transformados em logaritmo.

Resultados e discussões

Os resultados da cultura bacteriana quantitativa revelaram diferença significativa ($P < 0,05$) na quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro entre os animais sadios ($3,87 \pm 0,38$ log) e os doentes ($4,93 \pm 0,51$ log), com maior contagem bacteriana naqueles enfermos, fato que pode sugerir a diferença entre colonização e infecção do trato respiratório (BASSO et al., 2008).

As bactérias isoladas foram semelhantes em relação aos animais sadios e doentes, constatando-se alta porcentagem de *Haemophilus aphrophilus* (G1: 25% e G2: 21,5%); *Staphylococcus epidermidis* (G1: 18,8% e G2: 21,5%); *Staphylococcus aureus* (G1: 12,5% e G2: 35,7%); *Klebsiella pneumoniae* (G1: 25% e G2: 7,1%); *Escherichia coli* (G1: 12,5% e G2: 7,1%). No entanto há de se considerar que *Pseudomonas aeruginosa* (G1: 6,25%) foi isolada somente nos cães hígidos, ao passo que *Proteus mirabilis* foi isolado apenas naqueles com distúrbios respiratórios (G2: 7,1%). O isolamento destes microorganismos é semelhante aos isolados de aspirado transtraqueal realizados por Angus et al. (1997), no entanto diferem na ordem de maior expressão, pois para os mesmos autores as bactérias da família Enterobacteriaceae foram isoladas mais comumente, ao passo que *Staphylococcus* tiveram menor significância.

A resistência à ação dos antibióticos testados ocorreu tanto nos animais saudáveis quanto naqueles com doença respiratória. Foram isoladas 30 cepas bacterianas (G1: 16 e G2: 14) constatando-se considerável nível de resistência, haja vista que dessas, 19 cepas foram resistentes a um ou mais antibióticos testados (G1: 13 e G2: 6), ou seja, aproximadamente 63,33% de resistência aos antimicrobianos. Os princípios ativos resistentes de maior expressão estão mencionados na figura 1. No entanto destaca-se a ausência de resistência a amoxicilina com ácido clavulânico e a ceftriaxona.

Haemophilus aphrophilus demonstrou-se resistente e/ou intermediário a ação dos antibióticos em 25% dos casos do G1 e em 66,7% do G2. Cefalotina (33,3%), ampicilina (33,33%) e ceftiofina (33,3%) estavam dentro dos princípios ativos resistentes do G1, e sulfa trimetopim (33,3%), ciprofloxacina (33,33%) e piperacilina (33,3%), aqueles com ação intermediária. Já nos cães do G2 a tetraciclina (22,2%) e a sulfa trimetopim (22,22%) apresentaram maior resistência ao combate dessas bactérias, seguindo-se de ampicilina (11,1%), cefalotina (11,1%), amicacina (11,1%), azetreonam (11,1%) e ceftiofina (11,1%).

O *Staphylococcus epidermidis* apresentou-se resistente e/ou intermediária em 100% dos cães do G1 e em 25% do G2. No G1 a resistência foi alta em relação à sulfa e trimetopim (40%), seguindo-se a ampicilina (20%), ciprofloxacina (20%) e azetreonam (20%), ao passo que a ação intermediária incluiu a cefalotina (33,33%), tetraciclina (33,33%) e ampicilina (33,33%). No G2 a ampicilina (50%) e ciprofloxacina (50%) também demonstraram resistência, e somente a sulfa e trimetopim tiveram ação intermediária (100%).

O *Staphylococcus aureus* demonstrou resistência e/ou ação intermediária em 100% dos casos isolados do G1. Em contrapartida no G2, essa bactéria foi 100% sensível a ação dos antibióticos testados. Dentre os antimicrobianos resistentes do G1 encontram-se a ampicilina (25%), seguido de ciprofloxacina (12,5%), cefalotina (12,5%), gentamicina (12,5%), amicacina (12,5%), ceftiofina (12,5%) e sulfa e trimetopim (12,5%). Já os princípios ativos que tiveram ação intermediária nessa bactéria foram tetraciclina (33,33%), piperacilina (33,33%) e cefalotina (33,33%). A resistência a sulfonamidas, como a encontrada nessas cepas, também foi mencionada em levantamentos realizados por Hoekstra e Paulton (2002), de isolados de *Staphylococcus* em cães. Já a baixa sensibilidade a ciprofloxacina identificada nessas cepas está de acordo com os achados de Authier et al. (2006), os quais verificaram crescente aumento nos últimos anos, da resistência dessas bactérias às quinolonas, quando compararam os isolados de cães de 1990-1992 com os de 2002-2003.

Klebsiella pneumoniae foi isolada nas amostragens de ambos os grupos, apresentando resistência à ação de certos antimicrobianos em 100% dos casos isolados. Nos animais do G1, os antibióticos que acusaram resistência foram ampicilina (50%), amicacina (16,7%), azetreonam (16,7%) e gentamicina (16,7%). Tetraciclina (40%), piperacilina (40%) e ampicilina (20%), manifestaram ação intermediária contra essas bactérias. No G2, ampicilina também causou resistência (20%), além da cefalotina (20%), tetraciclina (20%), piperacilina (20%) e ceftiofina (20%). Estes achados corroboram com os relatados por Brisse e Duijkeren (2005), os quais encontraram resistência desse microorganismo a ação da ampicilina e cefalosporinas de primeira geração em espécies variadas.

Escherichia coli esteve presente na cultura tanto dos animais sadios quanto dos doentes, acusando resistência a determinados antibióticos em 100% das amostras, de ambos os grupos, o que discorda dos achados de Damborg et al. (2008), que encontraram baixos níveis de resistência de *E. coli* em isolados de swabs fecais de cães saudáveis. Dentre os antimicrobianos resistentes nas amostras do G1, tivemos a ampicilina (33,3%), tetraciclina (33,33%), além da sulfa e trimetropim (33,3%). Da mesma forma, a resistência à tetraciclina (100%) também ficou evidente nas amostras do G2, e a cefalotina e amicacina tiveram ação intermediária nesse mesmo grupo.

Pseudomonas aeruginosas foi isolado de apenas uma amostra do lavado broncoalveolar de cães sadios, sendo resistente à ação antimicrobiana da cefalotina (25%), ampicilina (25%), cloranfenicol (25%) e cefoxitina (50%). Da mesma forma, *Proteus mirabilis* também foi isolado de apenas uma amostra do G2, no entanto demonstrou resistência à ação da tetraciclina (50%) e clotrimazole (50%), ao passo que a cefalotina (50%) e ciprofloxacina (50%) tiveram ação intermediária sob essa bactéria.

Conclusões

Sob as condições experimentais testadas podemos dizer que:

- A presença de bactérias resistentes aos antimicrobianos na flora do trato respiratório está presente em cães saudáveis e com distúrbio respiratório;
- Ampicilina, tetraciclina, sulfa associada com trimetropim, cefalotina são os antibióticos de maior resistência às cepas isoladas;
- Amoxicilina com ácido clavulânico e ceftriaxona tem alta eficácia sob as bactérias isoladas do trato respiratório de cães saudáveis e doentes.

Referências Bibliográficas

- ANGUS, J.C. et al. Microbiological study of transtracheal aspirates from dogs with suspected lower respiratory tract disease: 264 cases (1989-1995). **Journal American Veterinary Medical Association**, v.210, n.1, p.55-58. 1997.
- AUTHIER, S.; PAQUETTE, D.; LABRECQUE, O. et al. Comparison of susceptibility to antimicrobials of bacterial isolates from companion animals in a veterinary diagnostic laboratory in Canada between 2 time points 10 years apart. **The Canadian Veterinary Journal**, v.47, n.8, p.774-778. 2006.
- BASSO, P.C.; BARCELLOS, H.H.A.; BRUN, M.V. et al. Lavado traqueobrônquico auxiliado por endoscópio rígido ou tubo endotraqueal em cães. **Ciência Rural**, v.38, n.3, p.723-728. 2008.
- BRISSE, S.; DUIJKEREN, E.V. Identification and antimicrobial susceptibility of 100 klebsiella animal clinical isolates. **Veterinary Microbiology**, v.105, p.307-312. 2005.
- DAMBORG, P.; SORENSEN, A.H.; GUARDABASSI, L. Monitoring of antimicrobial resistance in healthy dogs: First report of canine ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* clonal complex 17. **Veterinary Microbiology**, v.24, p.1-7. 2008.
- HOEKSTRA, K.A.; PAULTON, R.J. Clinical prevalence and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staph. Intermedius* in dogs. **Journal of Applied Microbiology**, v.93, n.3, p.406-413. 2002.

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. **11th Information Supplement**. Approved Standard M2-A7 and M7-A5. Wayne, PA, U.S.A., 2003.

REINEIRO, C.R.; COHN, L.A. Interstitial lung diseases. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v.37, p.937-947. 2007.

SEJAS, L.M.; SILBERT, S.; REIS, A.O. et al. Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.39, n.1, p.29-35. 2003.

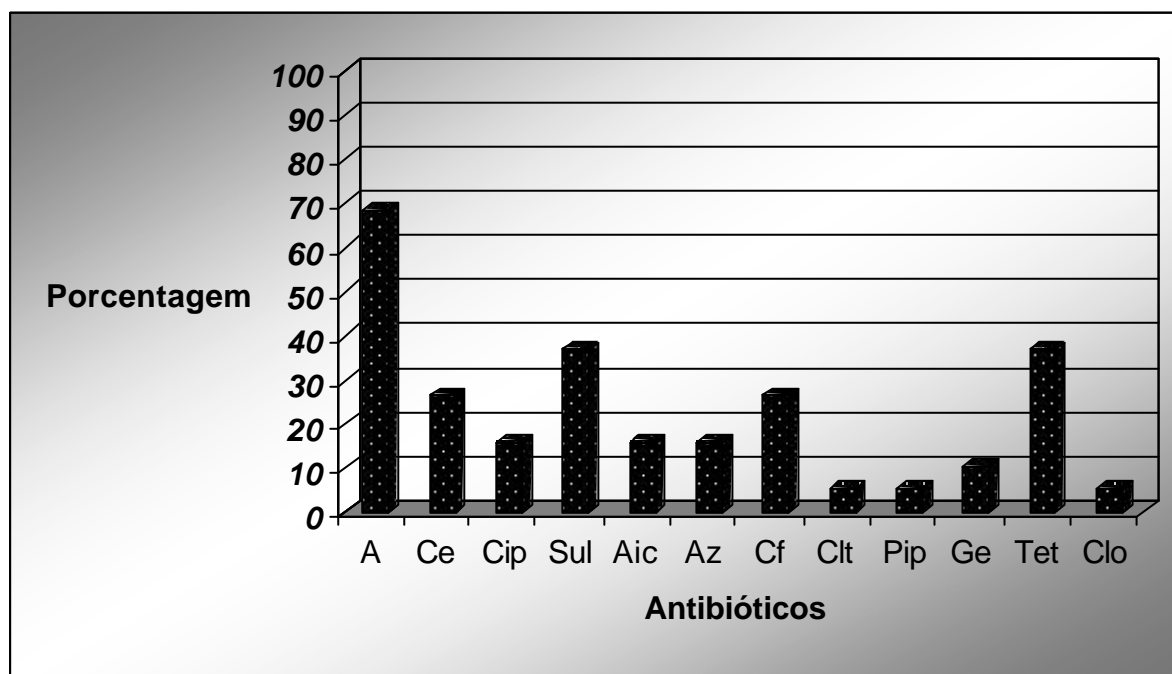


Figura 1: gráfico demonstrando a porcentagem de resistência das cepas bacterianas isoladas frente aos antimicrobianos testados.

