

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

U LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



UTILIZAÇÃO DE GENTAMICINA POR NEBULIZAÇÃO ASSOCIADA A CINESIOTERAPIA
RESPIRATÓRIA NO TRATAMENTO DA DOENÇA DO TRATO RESPIRATÓRIO INFERIOR
EM CÃES

MARGARIDA FREIRE OLIVEIRA

ORIENTADOR:

Doutor Luís Pedro Rodrigues de Lima
Lobo

COORIENTADORA:

Doutora Maria Constança Matias Ferreira
Pomba

2021

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

U LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA



UTILIZAÇÃO DE GENTAMICINA POR NEBULIZAÇÃO ASSOCIADA A CINESIOTERAPIA
RESPIRATÓRIA NO TRATAMENTO DA DOENÇA DO TRATO RESPIRATÓRIO INFERIOR
EM CÃES

MARGARIDA FREIRE OLIVEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutora Berta Maria Fernandes Ferreira
São Braz

VOGAIS:

Doutor Rodolfo Assis Oliveira Leal
Doutor Luís Pedro Rodrigues de Lima
Lobo

ORIENTADOR:

Doutor Luís Pedro Rodrigues de Lima
Lobo

COORIENTADORA:

Doutora Maria Constança Matias Ferreira
Pomba

2021

Nome: Margarida Freire Oliveira

Título da Tese ou Dissertação: Utilização de Gentamicina por Nebulização Associada a
Crusioterapia Respiratória no Tratamento da Doença do Trato
Respiratório Inferior em Cães

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2021

Designação do curso de

Mestrado ou de

Doutoramento: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- Clínica Produção Animal e Segurança Alimentar
 Morfologia e Função Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

1. Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
2. Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de 6 meses, 12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial*;

* Indique o motivo do embargo (OBRIGATORIO)

A presente dissertação irá servir como base para a elaboração de um artigo científico a ser publicado.

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

1. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
2. É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
3. DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 22 de fevereiro de 2021

(indicar aqui a data da realização das provas públicas)

Assinatura: Margarida Freire Oliveira

Agradecimentos

Ao meu orientador, Doutor Luís Lobo, por me ter recebido e acompanhado no Hospital Veterinário do Porto (HVP), pela partilha de conhecimento e exigência promovida. À Doutora Constança Pomba pelo acompanhamento e ajuda no desenvolvimento desta dissertação e pelos conselhos oferecidos.

A toda a equipa do HVP, médicos, enfermeiros e auxiliares, um obrigado pela ajuda no desenvolvimento das minhas capacidades práticas e pela simpatia com que me receberam.

À professora Rita Fonseca, pelo apoio prestado na caracterização e descrição dos raio-X presentes neste estudo.

Aos meus colegas e amigos de estágio, pela amizade e companhia e pelas conversas e desabafos. Obrigada por terem tornado a distância a casa um pouco menos sofrida.

Um agradecimento especial à Catarina, que está comigo praticamente desde o início deste percurso, pelo ombro amigo e por nunca se ter fartado de ouvir os meus lamentos. Por, por vezes, ter mais fé em mim do que eu própria e que até hoje me ajuda a ultrapassar as minhas inseguranças. Obrigada também à Élia que me adotou como filha e me recebeu na sua casa de braços abertos.

À Inês Moniz, que me acolheu quando me mudei para Cascais e que está comigo desde então. Pelo companheirismo e pela amizade, pelos cafés e pelas conversas, um obrigada do fundo do coração.

Às minhas amigas do coração, Aida, Raquel e Liliana, por mesmo longe irem acompanhando aos poucos as minhas aventuras.

Ao Vasco, que é incansável, e que mesmo agora longe não deixa de estar presente na minha vida todos os dias, acompanhando de perto cada passo desta batalha. Obrigada por tudo.

Por último, à minha família. Um obrigado gigante aos meus pais, que sempre me deram todas as oportunidades e ferramentas para ter sucesso e ser feliz, por me terem permitido tirar este curso quando percebi que era este o meu sonho. Ao meu irmão, por me ter acolhido quando estive no Porto e ser um ombro amigo quando as horas pareciam mais negras. Às minhas avós por todo o orgulho que têm na “primeira médica da família”.

Utilização de Gentamicina por Nebulização Associada a Cinesioterapia Respiratória no Tratamento da Doença do Trato Respiratório Inferior em Cães

Resumo

Atualmente, não existe um protocolo terapêutico definido para o tratamento de infecções respiratórias causadas por *Bordetella bronchiseptica*, pertencentes ao Complexo de Doenças Respiratórias Infeciosas Caninas (CIRDC).

A infecção por *B. bronchiseptica* é um diagnóstico clínico comum em cães, especialmente naqueles provenientes de canis ou criadores, onde a densidade populacional é maior. A terapêutica atualmente aconselhada pelas diretrizes existentes consiste, principalmente, na administração empírica de doxiciclina por via sistêmica, tratamento que nem sempre se demonstra eficaz.

O presente estudo teve como objetivo contribuir para a elaboração de um possível protocolo terapêutico com recurso a administração de gentamicina por via aerógena na forma de nebulização. Para tal, foi estudado o caso clínico de uma cadela de 3 meses, Cavalier King Charles Spaniel (CKCS), com doença respiratória causada por *B. bronchiseptica*, apresentada ao Hospital Veterinário do Porto.

Foi observada uma incapacidade de alcançar a cura clínica apenas com a administração de antibióticos por via sistêmica, complicado ainda pelo fato de a bactéria em questão apresentar resistência a múltiplos antibióticos. Verificou-se que a cura clínica apenas foi possível quando se iniciou a administração de gentamicina por nebulização, associada a administração de outro antibiótico, neste caso azitromicina, por via sistêmica.

Os resultados obtidos vêm apoiar a importância que a administração de gentamicina por via aerógena, através de nebulização, parece ter, mostrando-se muito eficaz no tratamento de infecções respiratórias caninas causadas por *B. bronchiseptica*.

Palavras-chave: *Bordetella bronchiseptica*, cão, Complexo de Doenças Infeciosas Respiratórias Caninas (CIRDC), gentamicina, nebulização

Use of Nebulized Gentamicin Associated with Respiratory Kinesiotherapy in the Treatment of the Lower Respiratory Tract Disease in Dogs

Abstract

Currently, there is not a defined therapeutic protocol for the treatment of respiratory infections caused by *Bordetella bronchiseptica*, belonging to the Canine Infectious Respiratory Disease Complex (CIRDC).

B. bronchiseptica infection is a common clinical diagnosis in dogs, especially those from kennels or breeders, where population density is higher. The therapy presently recommended by the existing guidelines consists mainly of empirical systemic administration of doxycycline, a treatment that is not always effective.

The aim of this study was to contribute to the elaboration of a possible therapeutic protocol using gentamicin by nebulization. A clinical case of a 3-month-old Cavalier King Charles Spaniel (CKCS) with respiratory disease caused by *B. bronchiseptica*, presented to the *Hospital Veterinário do Porto*, was studied.

An inability to achieve medical cure with only the systemic administration of antibiotics was observed, which was further complicated by the fact that the bacterium presented resistance to multiple antibiotics. It was found that the clinical cure was only possible when the administration of nebulized gentamicin was initiated, in association with the administration of another antibiotic, in this case azithromycin, via the systemic route.

The results obtained support the importance that the administration of nebulized gentamicin seems have, proving to be very effective in the treatment of canine respiratory infections caused by *B. bronchiseptica*.

Keywords: *Bordetella bronchiseptica*, Canine Infectious Respiratory Disease Complex (CIRDC), dog, gentamicin, nebulization

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Lista de Figuras.....	ix
Lista de Tabelas.....	x
Lista de Abreviaturas.....	xi
Relatório de Estágio Curricular.....	1
Parte 1: Revisão Bibliográfica.....	2
1. Complexo de Doenças Respiratórias Infeciosas Caninas.....	2
1.1. Etiopatogenia	2
1.1.1. Agentes Virais.....	3
1.1.1.1. Vírus Parainfluenza Canino 2	3
1.1.1.2. Adenovírus Canino Tipo 2	3
1.1.1.3. Vírus da Esgana Canina.....	3
1.1.1.4. Herpesvírus Canino.....	4
1.1.1.5. Vírus Influenza Canino	4
1.1.1.6. Coronavírus Respiratório Canino.....	4
1.1.1.7. Pneumovírus Canino	5
1.1.2. Agentes Bacterianos	5
1.1.2.1. <i>Mycoplasma cynos</i>	5
1.1.2.2. <i>Streptococcus equi subsp. zooepidemicus</i>	6
1.1.2.3. <i>Bordetella bronchiseptica</i>	6
1.2. Epidemiologia.....	6
1.3. Diagnóstico	7
1.3.1. Sinais Clínicos.....	7
1.3.2. Características Laboratoriais.....	8
1.3.3. Imagiologia.....	8
1.3.4. Amostras Respiratórias e Diagnóstico Molecular	8

1.4.	Tratamento.....	10
1.4.1.	Monitorização do Tratamento	11
1.5.	Prevenção.....	12
1.6.	Prognóstico	12
2.	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	13
2.1.	Género <i>Bordetella</i>	13
2.2.	Caracterização.....	13
2.3.	Classificação Taxonómica de <i>Bordetella bronchiseptica</i>	14
2.4.	Patogénese.....	15
2.4.1.	Fatores de virulência.....	15
2.4.1.1.	Hemaglutinina Filamentosa	16
2.4.1.2.	Fímbrias	17
2.4.1.3.	Pertactina e Outros Autotransportadores.....	17
2.4.1.4.	Sistema de Secreção Tipo III.....	18
2.4.1.5.	Toxina Adenilato Ciclase	18
2.4.1.6.	Toxina Dermonecrótica.....	19
2.4.1.7.	Lipopolissacárido.....	19
2.4.1.8.	Citotoxina Traqueal.....	19
2.4.1.9.	Biofilmes.....	20
2.5.	Resistência Antimicrobiana	20
2.5.1.	Suscetibilidade Antimicrobiana.....	20
2.5.2.	Mecanismos de Resistência Antimicrobiana	21
2.5.2.1.	Tetraciclina	21
2.5.2.2.	Sulfonamidas e Potenciadores	21
2.5.2.3.	Aminoglicosídeos e Aminociclítóis	22
2.5.2.4.	Anfenicóis.....	22
2.5.2.5.	β -Lactâmicos	22
	Parte 2: Estudo de Caso	23
1.	Objetivo do Estudo.....	23

2. Material e Métodos.....	23
3. Apresentação do Caso Clínico	23
3.1. História Progressa.....	23
3.2. Exame Físico	24
3.3. Diagnósticos Diferenciais	25
3.3.1. Tosse	25
3.3.2. Dispneia	25
3.4. Diagnóstico	26
3.5. Tratamento.....	28
3.6. Reavaliações.....	29
3.7. Score Clínico.....	36
9. Discussão	42
10. Conclusão.....	49
11. Trabalho Futuro	49
Bibliografia	50
Anexos	62
Anexo 1: Hemograma de dia 12/1/2019.....	62
Anexo 2: Hemograma de dia 24/1/2019.....	63
Anexo 3: Hemograma de dia 28/1/2019.....	64
Anexo 4 Hemograma de dia 11/2/2019.....	65
Anexo 5: Hemograma de dia 6/3/2019.....	66
Anexo 6: Hemograma de dia 2/5/2019.....	67
Anexo 7: Cultura, TSA e Citologia do dia 15/1/2019	68
Anexo 8: Cultura, TSA e Citologia do dia 31/1/2019	69
Anexo 9: Cultura, TSA e Citologia do dia 7/3/2019	71
Anexo 10: Cultura, TSA e Citologia do dia 29/3/2019	72
Anexo 11: Cultura, TSA e Citologia do dia 18/4/2019	73

Lista de Figuras

Figura 1. Etapas sequenciais do sistema regulador BvgAS (adaptado de Mattoo and Cherry (2005)).	16
Figura 2. Raio-X torácico laterolateral realizado a 5/1/2019.....	24
Figura 3. Raio-X torácico laterolateral (à esquerda) e ventrodorsal (à direita) realizado a 12/1/2019.	27
Figura 4. Raio-X torácico laterolateral (à esquerda) e ventrodorsal (à direita) realizado a 25/1/2019.	29
Figura 5. Raio-X torácico laterolateral (à esquerda) e ventrodorsal (à direita) realizado a 5/2/2019.	30
Figura 6. Raio-X torácico laterolateral (à esquerda) e ventrodorsal (à direita) realizado a 11/2/2019.	31
Figura 7. Raio-X torácico laterolateral (à esquerda) e ventrodorsal (à direita) realizado a 18/2/2019.	32
Figura 8. Raio-X torácico laterolateral (à esquerda) e ventrodorsal (à direita) realizado a 6/3/2019.	33
Figura 9. Raio-X torácico laterolateral realizado a 2/5/2019.....	34
Figura 10. <i>Timeline</i> do Caso Clínico.....	35

Lista de Tabelas

Tabela 1. Caracterização das três principais espécies do género <i>Bordetella</i> (adaptado de Gerlach et al. (2001)).	14
Tabela 2. Classificação da evolução das características radiográficas	36
Tabela 3. Definição dos parâmetros de classificação das características radiográficas e pontuação correspondente	39
Tabela 4. Classificação da evolução dos sinais clínicos.....	40
Tabela 5. Definição dos parâmetros de classificação das características radiográficas e pontuação correspondente.....	40
Tabela 6. Estabelecimento do score clínico correspondente à classificação dos raio-X e sinais clínicos	41

Lista de Abreviaturas

ACT – Toxina Adenilato Ciclase
ADP – Adenosina Difosfato
ATP – Adenosina Trifosfato
BID – Duas vezes ao dia
CAMV – Centro de Atendimento Médico-Veterinário
CAV-1 – Adenovírus Canino tipo 1
CAV-2 – Adenovírus Canino tipo 2
CDV – Vírus da Esgana Canino
Cél/L – Células por litro
CHV – Herpesvírus Canino
CIRDC – *Canine Infectious Respiratory Disease Complex*
CIV – Vírus Influenza Canino
CKCS – Cavalier King Charles Spaniel
CnPnV – Pneumovírus Canino
CPIV-2 – Vírus Parainfluenza Canino 2
CRCoV – Coronavírus Canino
CT – Citotoxina Traqueal
DMVM – Doença Mixomatosa da Válvula Mitral
DNA – *Deoxyribonucleic Acid* ou Ácido Desoxirribonucleico
DNT – Toxina Dermonecrótica
FHA – Hemaglutinina Filamentosa
FIM – Fímbria
HVP – Hospital Veterinário do Porto
IL-10 – Interleucina 10
IL-1 α – Interleucina 1 α
ISCAID – *International Society for Companion Animal Infectious Disease*
IV – Endovenoso
LBA – Lavagem Broncoalveolar
LET – Lavagem Endotraqueal
LL - Laterolateral
LPS – Lipopolissacárido
LTT – Lavagem Transtraqueal
MIC – *Minimal Inhibitory Concentration* ou Concentração Mínima Inibitória
MDR – Multirresistência a fármacos
NaCl 0,9% – Cloreto de Sódio a 0,9%

PaO₂ – Pressão Parcial de Oxigênio
PCR – *Polymerase Chain Reaction*
PDR – Pan-resistência a fármacos
P_i – Fósforo inorgânico.
PO – Per os (via oral)
qPCR – PCR quantitativo
RNA – *Ribonucleic Acid* ou Ácido Ribonucleico
RT-PCR – *Real Time Polymerase Chain Reaction*
SID – Uma vez ao dia
SOS – Emergência
SST3 – Sistema de Secreção Tipo 3
TID – Três vezes ao dia
TNF – *Tumoral Necrotic Factor* ou Fator de Necrose Tumoral
TSA – Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos
UFC/mL – Unidades Formadoras de Colônias por mililitro
VD - Ventrodorsal
XDR – Resistência extensa a fármacos

Relatório de Estágio Curricular

A presente dissertação é baseada na atividade realizada durante o Estágio Curricular no Hospital Veterinário do Porto (HVP), entre os dias 2 de setembro de 2019 e 28 de fevereiro de 2020, tendo tido a duração total de 1040 horas.

O estágio foi realizado na área científica de Clínica e Cirurgia de Animais de Companhia, sob orientação do Doutor Luís Lobo e coorientação da Doutora Constança Pomba, tendo as atividades sido desenvolvidas segundo turnos rotativos, de 8 ou 12 horas diárias. Estes incluíam trabalho diurno, noturno, fins-de-semana e feriados, alocados em Internamento, Consultas e Cirurgia/Anestesia. Durante este período foi possível contactar com diversas áreas da Medicina Veterinária, como Anestesiologia, Cardiologia, Medicina Interna, Oncologia, Oftalmologia, Ortopedia.

No serviço de Internamento, foi feito o apoio ao Médico Veterinário, enfermeiros e auxiliares responsáveis na realização de exames clínicos aos pacientes internados, alimentação e passeio destes, além de auxílio na realização dos exames de diagnóstico complementares necessários para o acompanhamento da sua evolução. Foram realizadas recolhas de sangue para hemograma, análises bioquímicas, testes de coagulação e testes rápidos de diagnóstico de leishmaniose e dirofilariose, por exemplo, bem como recolha de urina e posterior urianálise com tira e refratómetro. Além disso, acompanhou-se a realização de exames imagiológicos variados como ecografias, raio-X e Tomografia Axial Computorizada (TAC), auxiliando no correto posicionamento e contenção dos pacientes. Foi também possível realizar altas de pacientes internados na qual eram preparadas as receitas médicas e os medicamentos prescritos.

No serviço das Consultas, foi feito o acompanhamento dos médicos em consultas de rotina, de acompanhamento, de referência, segundas opiniões e consultas de urgência. Durante este escalonamento foi possível discutir os casos clínicos com os médicos, após a realização das consultas, de modo a entender melhor o raciocínio médico desde a anamnese ao diagnóstico e posterior tratamento.

Durante o serviço de Cirurgia/Anestesia foi possível acompanhar todos os processos, desde preparação dos pacientes e do campo cirúrgico, incluindo entubação, colocação de cateter, tricotomia e assepsia, monitorização anestésica, atuar como ajudante de cirurgião e acompanhar os animais no período pós-operatório. As cirurgias assistidas incluíram castrações (ovariohisterectomia e orquiectomia), cirurgias ortopédicas (resolução de fraturas e hérnias discais), urgências (remoção de corpo estranho), cirurgias cardiotorácicas (valvuloplastia aórtica e pulmonar, colocação de pacemaker, resolução de persistência do ducto arterioso), cirurgias oncológicas (mastectomia e remoção de tumores hepáticos, intestinais e esplénicos), entre outras.

Parte 1: Revisão Bibliográfica

1. Complexo de Doenças Respiratórias Infeciosas Caninas

O Complexo de Doenças Respiratórias Infeciosas Caninas (*Canine Infectious Respiratory Disease Complex* ou CIRDC), também conhecido como Traqueobronquite Infeciosa Canina ou Tosse do Canil, é uma das doenças infecciosas caninas mais comuns a nível mundial (Buonavoglia and Martella 2007). Este complexo representa uma infecção do trato respiratório superior, caracterizada pelo aparecimento agudo de tosse seca, ligeira a grave, acompanhada de corrimento nasal e/ou ocular que, dependendo de determinados fatores de complicação, pode evoluir para uma infecção do trato respiratório inferior (Buonavoglia and Martella 2007; López and Martinson 2017; Reagan and Sykes 2020).

1.1. Etiopatogenia

A etiologia do CIRDC é complexa e multifatorial, incluindo diversos agentes patogénicos, virais e bacterianos, e no qual fatores ambientais e fatores intrínsecos ao hospedeiro contribuem para a gravidade, suscetibilidade e persistência da doença (Priestnall et al. 2014; Mitchell et al. 2017; Day et al. 2020).

Os agentes patogénicos que tradicionalmente estão associados ao CIRDC são a bactéria *Bordetella bronchiseptica* e os vírus Vírus Parainfluenza Canino 2, Adenovírus Canino tipo 2, Vírus da Esgana e Herpesvírus Canino (Day et al. 2020; Dear 2020). No entanto, com o avançar das tecnologias de deteção molecular, têm vindo a ser identificados novos e emergentes agentes patogénicos (Pesavento et al. 2008; Priestnall et al. 2014). Além da melhoria dos métodos de diagnóstico, também o uso rotineiro de vacinas e antibióticos parece ter influenciado a prevalência dos agentes envolvidos no CIRDC, ao exercer uma pressão seletiva sobre os mesmos (Priestnall et al. 2014).

Os agentes emergentes incluem o Vírus Influenza Canino (Priestnall et al. 2014), o Coronavírus Respiratório Canino (Mitchell, Brooks, et al. 2013; Priestnall et al. 2014; Mitchell et al. 2017), o Pneumovírus Canino (Mitchell, Cardwell, et al. 2013; Priestnall et al. 2014) e as bactérias *Mycoplasma cynos* (Priestnall et al. 2014) e *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus* (Pesavento et al. 2008; Quinn et al. 2011; Priestnall et al. 2014).

As co-infecções, com dois ou mais destes agentes patogénicos, são comuns (Viitanen et al. 2015; Day et al. 2020), podendo estes atuar sinérgica ou sequencialmente, aumentando a gravidade da doença (Lappin et al. 2017).

A transmissão dos agentes associados ao CIRDC ocorre, principalmente, através de aerossóis (Joffe et al. 2016; Reagan and Sykes 2020), podendo também ocorrer através do contato direto com animais infetados (Joffe et al. 2016).

1.1.1. Agentes Virais

1.1.1.1. Vírus Parainfluenza Canino 2

O Vírus Parainfluenza Canino 2 (CPIV-2), pertencente à família Paramyxoviridae, sub-família Rubulavirinae, é um vírus RNA de cadeia simples de polaridade negativa e com envelope (Carter and Wise 2005; Reagan and Sykes 2020). O CPIV-2 é um conhecido agente patogénico do aparelho respiratório (Day et al. 2020) e também um importante contribuidor do CIRDC (Joffe et al. 2016).

As infeções pelo CPIV-2 têm elevada morbidade em locais onde a densidade populacional é também alta, isto porque o vírus não sobrevive muito tempo no ambiente (Day et al. 2020).

A infeção ocorre ao nível do epitélio respiratório superior (Sykes 2014a; Reagan and Sykes 2020), levando ao aparecimento de sinais clínicos (tosse seca e grave, com ou sem pirexia e corrimento nasal) que podem durar até uma semana, a não ser que ocorram infeções secundárias por outros agentes patogénicos (Viitanen et al. 2015; Day et al. 2020; Reagan and Sykes 2020).

1.1.1.2. Adenovírus Canino Tipo 2

O Adenovírus Canino tipo 2 (CAV-2) foi identificado, pela primeira vez, em 1962 por Ditchfield et al., após a ocorrência de um surto de laringotraqueíte numa população de cães.

O CAV-2, vírus sem envelope, pertencente à família Adenoviridae, género *Mastadenovirus*, está intimamente relacionado, em termos estruturais, com o vírus da hepatite infecciosa canina (Adenovírus Canino tipo 1 ou CAV-1), existindo imunidade cruzada entre ambos (Day et al. 2020; Reagan and Sykes 2020).

No entanto, enquanto o CAV-1 causa doença sistémica, a infeção pelo CAV-2 está limitada ao aparelho respiratório, onde infeta as células epiteliais não ciliadas dos brônquios, as células epiteliais da mucosa nasal, faringe e criptas tonsilares, as células mucosas da traqueia e brônquios e ainda as células epiteliais alveolares tipo 2 (Sykes 2014a; Day et al. 2020). As infeções pelo CAV-2 são, por norma, ligeiras e autolimitantes a não ser que ocorram infeções secundárias (Day et al. 2020).

1.1.1.3. Vírus da Esgana Canina

O Vírus da Esgana Canina (CDV) é um vírus com envelope de RNA de cadeia simples de polaridade negativa, pertencente à família Paramyxoviridae e ao género *Morbilivirus* (Reagan and Sykes 2020).

A infeção tem início nas células linfóides do aparelho respiratório, disseminando-se, posteriormente, para as células epiteliais de vários órgãos e para o sistema nervoso central, através da via linfática (Ford 2012).

Os sinais clínicos aparecem 10 dias após infecção e incluem tosse de origem aguda, corrimento nasal e ocular, dispneia, diarreia, vômitos e hiperqueratose das almofadas plantares e do nariz (Day et al. 2020). O CDV, ao contrário dos outros agentes patogênicos respiratórios, provoca linfopenia (Day et al. 2020).

1.1.1.4. Herpesvírus Canino

O Herpesvírus Canino (CHV) é um vírus com envelope e DNA de cadeia dupla, pertencente à família Herpesviridae (Day et al. 2020; Reagan and Sykes 2020).

Este vírus pode ser transmitido através do aparelho respiratório (contato direto com secreções oronasais) ou do aparelho genital (via transplacentária ou durante o parto) (Greene 2012), deslocando-se depois para os gânglios onde se torna latente (Day et al. 2020). Quando o animal sofre uma diminuição da imunidade, seja por stress ou tratamento imunomodulador, o vírus pode sofrer reativação e tornar-se novamente infeccioso (Kumar et al. 2015).

Os cachorros recém-nascidos são mais suscetíveis a infecções fatais do que cachorros com mais de duas semanas de idade, que podem desenvolver apenas traqueíte ou bronquite, com sinais clínicos ligeiros ou inaparentes (Greene 2012). Já em cães adultos, o CHV pode provocar doença respiratória superior, genital e/ou ocular (Kumar et al. 2015).

1.1.1.5. Vírus Influenza Canino

O Vírus Influenza Canino (CIV) pertence à família Orthomyxoviridae, gênero *Alphainfluenzavirus*, e é um vírus com envelope e RNA de cadeia simples, de polaridade negativa (Day et al. 2020; Reagan and Sykes 2020).

O CIV foi detetado, pela primeira vez, em 2004, num surto de doença respiratória numa população de galgos na Flórida (Crawford et al. 2005). Posteriormente, em 2007, foi detetado outro subtipo de CIV, H3N2, no sudeste da Ásia, também associado a doença respiratória em cães (Voorhees et al. 2017; Day et al. 2020).

A infecção pelo CIV pode ser subclínica ou, por outro lado, predispor ao desenvolvimento de infecções bacterianas secundárias e ao aparecimento de sinais clínicos, como tosse, febre e corrimento oculo-nasal, ao provocar inflamação e necrose do epitélio respiratório ciliado (Crawford et al. 2005; Castleman et al. 2010; Priestnall et al. 2014). Os cães podem desenvolver traqueíte e bronquite hiperplásica com envolvimento das glândulas submucosas, além de pneumonia (Crawford et al. 2005; Castleman et al. 2010).

1.1.1.6. Coronavírus Respiratório Canino

O Coronavírus Respiratório Canino (CRCoV) é um vírus com envelope, RNA de cadeia simples, pertencente à família Coronaviridae e ao gênero *Betacoronavirus* (Day et al. 2020). Apesar de pertencer à mesma família que o Coronavírus Entérico Canino, o CRCoV, difere deste genética e antigénicamente (Erles et al. 2003; Priestnall et al. 2014; Day et al. 2020).

O CRCoV é mais importante nas fases iniciais de CIRDC, levando ao aparecimento de sinais respiratórios ligeiros a moderados (corrimento nasal, tosse e espirros) (Erles et al. 2003; Erles and Brownlie 2008; Mitchell, Brooks, et al. 2013).

Este vírus tem tropismo para o epitélio respiratório, onde provoca alterações ao nível das narinas e perda e dano do epitélio respiratório ciliado da traqueia, acompanhado por marcada resposta inflamatória (Mitchell, Brooks, et al. 2013). Estas alterações podem predispor a doença mais grave ao facilitar o desenvolvimento de infeções secundárias (Sykes 2014a).

1.1.1.7. Pneumovírus Canino

Em 2010, Renshaw et al. isolaram um vírus desconhecido, até à altura, e, através de estudos moleculares, identificaram-no como pertencendo à família Pneumoviridae, subfamília Pneumovirinae, género *Orthopneumovirus*, nomeando-o, mais tarde, como Pneumovírus Canino (CnPnV) (MacLachlan and Dubovi 2017).

Este vírus foi identificado em cães com doença respiratória aguda e em alguns cães assintomáticos, no entanto, ainda não foi possível identificar o papel do mesmo na patogenia de CIRDC (Renshaw et al. 2011; Mitchell, Cardwell, et al. 2013; Day et al. 2020).

1.1.2. Agentes Bacterianos

1.1.2.1. *Mycoplasma cynos*

As bactérias pertencentes ao género *Mycoplasma* spp. são organismos fastidiosos, sem parede celular mas envolvidos por uma bicamada lipídica, que colonizam, entre outras, as membranas mucosas do trato respiratório e genital de vários animais (Chalker et al. 2004). Muitas bactérias pertencentes ao género *Mycoplasma* spp. são comensais do trato respiratório e, portanto, o seu papel em CIRDC ainda não é claro (Joffe et al. 2016; Jambhekar et al. 2019; Reagan and Sykes 2020).

A *M. cynos* tem sido o único micoplasma associado, de forma significativa, a doença respiratória em cães (Jambhekar et al. 2019) e sabe-se que coloniza o trato respiratório de cães saudáveis e doentes (Chandler and Lappin 2002; Ericsson et al. 2016), principalmente em animais com sinais moderados de doença (Chalker et al. 2004). A sua atividade patogénica leva à destruição do epitélio respiratório ciliado e à quimiotaxia de neutrófilos e macrófagos para o interior dos alvéolos (Rosendal and Vinther 1977).

Esta bactéria é mais frequentemente isolada a partir de animais mais novos do que de animais mais velhos (Chalker et al. 2004). No entanto, uma vez que é difícil reproduzir o seu crescimento em meio de cultura, o seu diagnóstico é difícil e pode resultar em falsos negativos (Day et al. 2020).

1.1.2.2. *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*

A *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* é uma bactéria β -hemolítica, conhecida por causar doença esporádica em cães (Day et al. 2020).

Apesar de poder causar doença respiratória superior com sinais semelhantes a CIRDC, como corrimento nasal e tosse húmida, a infecção por *S. equi* subsp. *zooepidemicus* está mais frequentemente associada a casos de broncopneumonia hemorrágica e fibrino-supurativa aguda (Priestnall et al. 2010; Greene and Prescott 2012). De fato, as lesões hemorrágicas são frequentes e sugerem a existência de ação de exotoxinas que, atuando como super-antigénios, provocam danos ao nível da vasculatura pulmonar e, conseqüentemente, levam à perda de fibrina, a edema e a hemorragia generalizada (Priestnall et al. 2014; Day et al. 2020).

Larson et al. (2011) sugeriram que a *S. equi* subsp. *zooepidemicus* se trata de um agente patogénico oportunista que contribui para a maior gravidade do CIRDC, ao observarem que, apesar deste organismo poder ser isolado a partir de animais clinicamente saudáveis, animais co-infetados com o CIV demonstravam sinais clínicos mais graves.

1.1.2.3. *Bordetella bronchiseptica*

A *B. bronchiseptica*, cocobacilo Gram negativo aeróbio, é um dos principais agentes do CIRDC, podendo aumentar a gravidade da doença em animais afetados simultaneamente com um agente viral (Ford 2012; Reagan and Sykes 2020). Apesar disso, a *B. bronchiseptica* pode estar presente tanto em cães com sinais clínicos, como tosse e corrimento nasal, como em cães saudáveis, graças à capacidade de autorregular a sua virulência (Ford 2012).

Esta é uma bactéria altamente contagiosa, cuja patogenia se deve a uma variedade de fatores de virulência que inicialmente lhe permitem aderir ao epitélio respiratório ciliado dos seus hospedeiros e, posteriormente, comprometem a função das defesas imunitárias do trato respiratório dos mesmos (Ford 2012). Este comprometimento provoca uma alteração ao nível do aparelho mucociliar, levando a uma acumulação excessiva de muco e predispondo o hospedeiro a infeções por agentes patogénicos secundários oportunistas (Reagan and Sykes 2020).

Dada a maior importância deste agente patogénico no caso clínico estudado, este será descrito com maior detalhe no capítulo seguinte.

1.2. Epidemiologia

O CIRDC é uma importante causa de morbidade a nível mundial e, dada a sua natureza altamente contagiosa, a ocorrência de surtos é mais comum em locais com maior densidade populacional, como abrigos e canis, sendo mais provável que os mesmos sejam

de maior gravidade nestes locais (Chalker et al. 2004; Buonavoglia and Martella 2007; Mitchell et al. 2017).

Apesar do CIRDC afetar animais de todas as idades, os animais mais jovens são, normalmente, mais sensíveis, já que possuem um sistema imunitário *naïve* e que, provavelmente, ainda não foram vacinados nem expostos a nenhum dos agentes envolvidos neste complexo (Ford 2012; Joffe et al. 2016).

A imunidade adquirida, após recuperação de uma infecção, é difícil de estabelecer uma vez que o CIRDC inclui um vasto espectro de agentes patogénicos que podem atuar em sinergia (Ford 2012; Lappin et al. 2017).

1.3. Diagnóstico

O diagnóstico do CIRDC deve ser iniciado com a recolha de uma história clínica completa e a realização de um exame físico minucioso (Lappin et al. 2017; Singleton et al. 2019; Reagan and Sykes 2020). Uma história pregressa associada a alojamento em locais com elevada densidade animal, como um canil ou um abrigo de cães, ou a contato próximo com outros animais, pode levar à suspeita de doença pertencente ao CIRDC, uma vez que a maioria dos agentes são transmitidos através de aerossóis (Day et al. 2020; Reagan and Sykes 2020).

A identificação de um agente do CIRDC, com sinais clínicos concordantes, pode indiciar o seu envolvimento (Reagan and Sykes 2020). No entanto, deve sempre considerar-se a possibilidade de co-infecções e ter em conta que resultados negativos não excluem a presença de outros agentes, como acontece com o CDV (Reagan and Sykes 2020).

1.3.1. Sinais Clínicos

Os agentes pertencentes ao CIRDC causam doença respiratória superior, subclínica a ligeira, podendo os sinais clínicos persistir, geralmente, até duas semanas (Reagan and Sykes 2020).

O sinal clínico característico do CIRDC é o aparecimento agudo de tosse paroxística, com ou sem a presença de espirros, nas fases iniciais da doença (Chalker, Brooks, et al. 2003; Lappin et al. 2017; Reagan and Sykes 2020). Além disso, e dependendo do agente infeccioso envolvido na patogénese, os cães afetados podem apresentar corrimento nasal e/ou ocular (Lappin et al. 2017).

Nos casos em que a progressão da doença é complicada por infeções bacterianas secundárias, os animais podem apresentar febre, letargia, diminuição do apetite e taquipneia, podendo haver progressão para pneumonia e morte (Chalker, Brooks, et al. 2003; Lappin et al. 2017). Outros sinais de pneumonia bacteriana são a presença de fervores ou aumento do murmúrio vesicular à auscultação torácica (Lee-Fowler and Reinero 2012).

1.3.2. Características Laboratoriais

Geralmente, o hemograma, os parâmetros bioquímicos e a urianálise, apresentam valores normais (Reagan and Sykes 2020). Por outro lado, o hemograma pode dar indicação de inflamação (leucocitose com neutrofilia com desvio à esquerda e linfopenia) (Reagan and Sykes 2020), principalmente se tiver havido evolução para pneumonia bacteriana (Ford 2012; Viitanen 2017).

Pode ainda haver um grau variável de hipoxemia, com valores de pressão parcial de oxigênio (PaO₂) baixos, uma vez que, devido à acumulação de secreções ao nível dos alvéolos, as trocas gasosas não são realizadas de forma eficiente (Wingfield et al. 1997; Viitanen 2017).

1.3.3. Imagiologia

A realização de raio-X torácicos tem uma importância vital para avaliar a extensão da doença a nível pulmonar e a existência de pneumonia.

Nos casos de doença do CIRDC não complicada, as imagens radiográficas não apresentam alterações significativas (Ford 2012). Por outro lado, quando existem complicações, podem ser observadas alterações ligeiras (padrão intersticial a broncointersticial) ou, no caso de existência de pneumonia, alterações mais graves (padrão pulmonar alveolar), dependendo do estadió da doença (Ford 2012; Viitanen 2017; Dear 2020; Reagan and Sykes 2020).

Embora a traqueoscopia possa permitir a visualização da inflamação do epitélio traqueal e a existência de muco intratraqueal, estes achados não são diagnósticos de doença pertencente ao CIRDC (Ford 2012).

1.3.4. Amostras Respiratórias e Diagnóstico Molecular

Apesar da informação obtida, através de uma anamnese e exame físico minuciosos, poder sugerir doença causada por um agente do CIRDC, é importante realizar um diagnóstico etiológico de modo a poder realizar-se o tratamento mais adequado e direcionado a esse mesmo agente (Reagan and Sykes 2020).

Assim, devem ser recolhidas amostras a partir de esfregaços nasais ou orofaríngeos, a partir das quais se podem realizar culturas e citologias bacterianas e testes de suscetibilidade a antimicrobianos (TSA), cultura ou PCR de *Mycoplasma spp.* e procedimentos de diagnóstico moleculares para os diferentes agentes virais e bacterianos (Lappin et al. 2017). No entanto, uma vez que muitos destes agentes patogénicos podem ser detetados tanto em animais saudáveis como em animais doentes, estes procedimentos podem ter pouca utilidade e devem ser interpretados com cuidado (Lappin et al. 2017; Reagan

and Sykes 2020), sendo importante ter em conta resultados obtidos a partir de outros testes de diagnóstico e o próprio quadro clínico do animal.

Além disso, os ensaios moleculares podem ter pouca sensibilidade devido à excreção viral transitória ou baixa, uma vez que o pico de virémia ocorre na fase inicial de infecção, podendo resultar em falsos negativos (Lappin et al. 2017; Reagan and Sykes 2020). Por outro lado, se a vacinação, com vacinas vivas atenuadas, tiver sido realizada algumas semanas antes, pode resultar em falsos positivos (Reagan and Sykes 2020).

Deste modo, Lappin et al. (2017), não recomendam a realização destes testes em situações isoladas de infecção com sinais clínicos típicos, quando não há suspeita de pneumonia e quando não estão envolvidos indivíduos pertencentes a populações de risco. Nestes casos, se houver suspeita de CIRDC, os ensaios moleculares podem estar indicados quando realizados em conjunto com culturas bacterianas e testes serológicos, especialmente se houver má resposta ao tratamento ou se houver doença clínica grave (Lappin et al. 2017). De modo a aumentar a sensibilidade e o valor preditivo positivo dos testes, devem ser recolhidas amostras de exsudados respiratórios de um vasto número de cães afetados e, posteriormente, analisadas individualmente (Lappin et al. 2017).

Quando há sinais clínicos concordantes com uma possível progressão para pneumonia e quando se observa um padrão alveolar ao raio-X torácico, devem ser recolhidas amostras através de lavagem transtraqueal (LTT), endotraqueal (LET) ou broncoalveolar (LBA) (Lappin et al. 2017; Reagan and Sykes 2020). Estas amostras servirão para a realização de citologia, cultura bacteriana aeróbia e TSA, estando também recomendada a realização de cultura de *Mycoplasma spp.* (Lappin et al. 2017). Se a realização de cultura através do material recolhido produzir o crescimento de várias bactérias, esta pode ser representativa de uma infecção oportunista, e não primária (Ford 2012), podendo também indicar contaminação da amostra (Reagan and Sykes 2020). Podem ocorrer falsos negativos quando a carga bacteriana é baixa ou quando foram administrados antibióticos previamente à realização da cultura (Reagan and Sykes 2020).

Em 2016, Canonne et al. estudaram a utilidade da realização de PCR quantitativo (qPCR) no diagnóstico de infeções por *B. bronchiseptica*, quando comparado com a realização de cultura e citologia, a partir de LBA. No seu estudo, os autores concluíram que o qPCR parece ser uma ferramenta útil e mais sensível no diagnóstico das infeções por *B. bronchiseptica*, uma vez que detetou DNA em amostras cujo resultado da cultura e citologia foi negativo (Canonne et al. 2016).

No caso de morte do animal, deve ser realizada necrópsia com colheita de amostras que permitam o diagnóstico *post mortem*, fazendo-se a colheita de amostras pulmonares para posterior análise (Priestnall et al. 2014; Lappin et al. 2017). Taha-Abdelaziz et al. (2016)

recomendam a recolha de várias amostras de tecido dos brônquios maiores e posterior examinação cuidadosa dos mesmos quando há suspeita de broncopneumonia.

1.4. Tratamento

Segundo a *International Society for Companion Animal Infectious Diseases* (ISCAID), uma vez que a maioria dos casos de doença pertencente ao CIRDC têm etiologia viral e que a infecção é, muitas vezes, autolimitante, a antibioterapia nem sempre está aconselhada (Sykes 2014b; Sykes 2014a; Lappin et al. 2017), podendo realizar-se, apenas, terapêutica de suporte (Reagan and Sykes 2020).

Por outro lado, se existirem sinais de infecção bacteriana (corrimento oculo-nasal mucopurulento, febre, letargia e inapetência) durante, pelo menos, sete a dez dias, acompanhados por sinais radiográficos concordantes (infiltrados alveolares e consolidação no raio-X torácico), a realização de terapia antimicrobiana deve ser considerada (Sykes 2014b; Sykes 2014a; Lappin et al. 2017).

Antes de iniciar a terapêutica antimicrobiana, e apenas se o animal estiver estável o suficiente, é essencial proceder-se à recolha de amostras para posterior realização de cultura e TSA, de modo a dirigir o tratamento para o agente responsável, evitando a seleção de organismos resistentes (Sykes 2014b; Lappin et al. 2017; Kadlec and Schwarz 2018).

No entanto, é também da opinião do ISCAID que a terapêutica deve ser instituída o mais rapidamente possível (Lappin et al. 2017). Assim, se existir suspeita de CIRDC bacteriana, por *B. bronchiseptica* ou *Mycoplasma* spp., com ou sem sinais de pneumonia, deve ser iniciada, como opção de primeira linha, a administração empírica de doxiciclina, durante 7-10 dias, por via sistémica (Sykes 2014b; Lappin et al. 2017). Por outro lado, nos casos em que não há suspeita de pneumonia, nem risco de que esta se possa vir a desenvolver, como a classificação da suscetibilidade da *B. bronchiseptica* e da *M. cynos* à doxiciclina não pode ser realizada *in vitro*, visto não existirem critérios clínicos de interpretação (CLSI 2018), alguns dos autores são da opinião que este fármaco poderá não ser o mais indicado (Lappin et al. 2017).

Em casos de pneumonia mais grave, pode ser necessário complementar o tratamento com fluidoterapia endovenosa, suplementação de oxigénio, nebulização e cinesioterapia respiratória (Sykes 2014b; Sykes 2014a; Reagan and Sykes 2020). Em animais que demonstrem inapetência e perda de apetite, pode ser também necessária a suplementação nutricional administrada através de tubos de alimentação esofágicos ou nasoesofágicos (Sykes 2014b).

Em 2017, Lappin et al. relataram que era sugerido, de uma forma pouco formal, o tratamento com aminoglicosídeos, como a gentamicina, por via inalatória em cães com

doença pertencente ao CIRDC associado a *B. bronchiseptica* (Lappin et al. 2017). Mais tarde, em 2020, Canonne et al. publicaram um estudo retrospectivo no qual avaliaram a administração de gentamicina por via aerógena através de nebulização, concluindo que, apesar de ser um processo mais demorado, esta via parece ser uma alternativa viável para o tratamento de cães com infecções por *B. bronchiseptica* refratárias à terapêutica convencional, já que todos os cães presentes no seu estudo já tinham recebido antibioterapia sistémica prévia, sem sucesso no tratamento. Estes autores observaram ainda que a nebulização de uma solução não diluída de gentamicina 5%, duas vezes por dia e durante pelo menos 10 minutos, estava associada a uma maior proporção de animais curados, com uma menor duração do tratamento.

De modo a aumentar a quantidade de antibiótico que alcança o trato respiratório inferior, é aconselhada a realização de um pré-tratamento com broncodilatadores, como o albuterol (Cohn 2010). Estes podem ser administrados por via sistémica, cerca de 15 minutos antes da nebulização, ou por via inalatória, antes de se adicionar o antibiótico (Cohn 2010). É importante ressaltar que a administração de antibiótico por via inalatória não deve substituir a administração por via sistémica quando os animais apresentam pneumonia, devendo apenas ser considerada como terapia complementar (Cohn 2010).

De momento, não existem terapias antivíricas disponíveis para o tratamento do CIRDC de etiologia viral pelo que a mesma não está indicada (Reagan and Sykes 2020).

A administração de fármacos supressores da tosse, como a codeína, podem estar indicados no tratamento da tosse seca, de modo a proporcionar algum alívio, uma vez que esta se pode prolongar durante semanas e pode ocorrer durante longos períodos de tempo (Sykes 2014a; Reagan and Sykes 2020). No entanto, o seu uso está completamente contraindicado nos casos de tosse produtiva, uma vez que impedirá a excreção normal das secreções respiratórias e poderá predispor a infecções bacterianas secundárias (Sykes 2014a; Reagan and Sykes 2020).

De modo a facilitar a eliminação de secreções espessas aprisionadas nas vias aéreas, pode recorrer-se à nebulização de solução salina estéril durante 15 a 20 minutos, 2 a 4 vezes ao dia, associada à realização de cinesioterapia respiratória, e também ao uso de mucolíticos orais, como a N-acetilcisteína (Dear 2020). Este fármaco não deve ser administrado por via inalatória uma vez que pode provocar broncoconstrição e piorar o quadro clínico do animal (Cohn 2010; Dear 2020). Além disso, é aconselhado que os tutores usem peitorais em vez de coleiras de forma a diminuir a irritação da traqueia (Sykes 2014a).

1.4.1. Monitorização do Tratamento

Dado o caráter autolimitante das infecções pertencentes ao CIRDC, e uma vez que, geralmente, possuem uma resposta rápida à antibioterapia empírica, apenas se torna

necessária a realização de um diagnóstico mais aprofundado se os sinais clínicos persistirem após 7 dias de tratamento e se se mantiver a suspeita de infecção bacteriana. Nestes casos, pode ser necessário considerar a alteração do antibiótico usado para outro, como a azitromicina (Lappin et al. 2017).

1.5. Prevenção

Um dos principais métodos de prevenção de doença pertencente ao CIRDC é a vacinação. Até à data, foram desenvolvidas vacinas para vários agentes patogénicos respiratórios de cães (Erles and Brownlie 2008), existindo vacinas para os vírus CPIV-2, CAV-2, CDV, CIV H3N8 e H3N2 e para a *B. bronchiseptica* (Lappin et al. 2017; Reagan and Sykes 2020).

A vacina para a *B. bronchiseptica* e o CPIV-2 mais usada é de administração intranasal, de modo a providenciar uma resposta imunitária mais rápida, necessária em animais que habitam locais com elevada densidade animal (Erles and Brownlie 2008; Reagan and Sykes 2020).

É importante aplicar medidas de proteção nos locais de habitação de grupo, uma vez que não existem vacinas disponíveis para todos os agentes (Reagan and Sykes 2020). Assim, além de ser necessário prevenir situações de sobrepopulação e stress, é também importante a imposição de um período de quarentena a animais que entrem nas instalações, monitorização diária dos mesmos e aplicação de protocolos de quarentena para cães com sinais clínicos de CIRDC (Reagan and Sykes 2020).

No caso de ocorrência de surto, é importante proceder ao isolamento dos animais afetados, de modo a que a doença não se propague, e também a realização de protocolos de desinfeção das instalações (Reagan and Sykes 2020).

1.6. Prognóstico

O prognóstico está dependente de vários fatores, desde a gravidade da doença, o estado imunitário do animal, a virulência do agente infeccioso e a presença de co-infeções (Sykes 2014a; Dear 2020). Sabe-se que, em animais com infeções virais ou por *B. bronchiseptica* não complicadas por infeções secundárias, o prognóstico é, geralmente, excelente (Sykes 2014b; Sykes 2014a).

Tanto quanto se sabe, ainda não foram realizados, até ao momento, estudos que avaliem o prognóstico geral de animais com bactérias multirresistentes ou com pneumonia recorrente, sendo presumido por Dear (2020) que o prognóstico destes casos seja pior.

2. *Bordetella bronchiseptica*

2.1. Género *Bordetella*

As bactérias pertencentes ao género *Bordetella* são pequenos cocobacilos aeróbios, Gram negativos, considerados agentes patogénicos ocasionais, com afinidade pelo epitélio respiratório ciliado de vários animais, onde provocam ciliostase e morte de células ciliadas (Quinn et al. 2011).

Até à data foram identificadas nove espécies pertencentes ao género *Bordetella*, mas apenas quatro foram associadas a infeções respiratórias em humanos e outros mamíferos: *B. pertussis*, *B. parapertussis*_{hu} e *B. parapertussis*_{ov} (*B. parapertussis* adaptada a humanos e a ovinos, respetivamente), *B. bronchiseptica* (Porter et al. 1994; Parkhill et al. 2003; Park et al. 2012) e *B. holmesii* (Weyant et al. 1995; Yih et al. 1999). Os restantes membros deste género são *B. hinzii* (agente comensal do trato respiratório de galinhas e com algum potencial patogénico em humanos) (Cookson et al. 1994; Vandamme et al. 1995; Kattar et al. 2000), *B. avium* (responsável pela coriza e rinotraqueíte em aves de capoeira) (Spears et al. 2003), *B. trematum* (isolado a partir de infeções auriculares de feridas de humanos) (Vandamme et al. 1996) e *B. petrii* (a mais recente espécie de *Bordetella* descrita, que sobrevive no ambiente e é capaz de crescimento anaeróbio) (von Wintzingerode et al. 2001).

Foram realizados vários estudos para entender melhor a relação genética e evolutiva das bactérias infetantes de mamíferos, pertencentes ao género *Bordetella*. Através de vários estudos genéticos foi possível perceber que, ao contrário da maior parte dos agentes patogénicos, a diversidade genética destas bactérias é muito limitada (Parkhill et al. 2003). Com base nesta informação, tem sido especulado que *B. pertussis*, *B. parapertussis*_{hu}, *B. parapertussis*_{ov} e *B. bronchiseptica* são, na verdade, subespécies que evoluíram a partir de um ancestral comum, proveniente de uma linhagem de *B. bronchiseptica*, de modo a conseguirem adaptar-se a novos hospedeiros (Musser et al. 1986; Van Der Zee et al. 1997; Gerlach et al. 2001; Parkhill et al. 2003).

Diavatopoulos et al. (2005), usando uma combinação de vários métodos, realizaram um estudo onde identificaram duas linhagens ancestrais de *B. bronchiseptica*, encontrando dados que apoiam a hipótese de que a *B. pertussis*, a *B. parapertussis*_{hu}, a *B. parapertussis*_{ov} e a *B. bronchiseptica* são subespécies do género *Bordetella*.

2.2. Caracterização

As três principais bactérias pertencentes a este género, *B. pertussis*, *B. parapertussis* e *B. bronchiseptica*, provocam doença respiratória em mamíferos, podendo ter um grande impacto a nível económico assim como na saúde pública (Weiss 2006). Estas bactérias, que primeiro foram descritas segundo a variedade de hospedeiros e gravidade de sinais clínicos, foram classificadas no mesmo género da família *Alcaligenaceae* com base em vários critérios

(propriedades morfológicas, fisiológicas e antigénicas, estudos de hibridação de DNA e tipificação fágica) (Goodnow 1980; Gerlach et al. 2001; Weiss 2006).

As várias características que distinguem estas bactérias encontram-se resumidas na Tabela 1.

Tabela 1. Caracterização das três principais espécies do género *Bordetella* (adaptado de Gerlach et al. (2001)).

Característica	<i>B. bronchiseptica</i>	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>
Hospedeiro	Mamíferos	Humanos	Humanos, Ovelhas
Doença	Rinite atrófica em leitões, tosse do canil/CIRDC em cães	Tosse convulsa	Tosse convulsa ligeira
Local de Isolamento em Humanos	Trato respiratório, sangue	Trato respiratório	Trato respiratório
Conteúdo G+C (mol%)	66-68	66-68	66-68
Tamanho do Genoma (kbp)	> 4400	3880-4060	> 4400
Crescimento em Agar MacConkey	+	-	+
Catalase	+	+	+
Oxidase	+	+	-
Assimilação de Citrato	+	+	+

+ positivo; - negativo.

2.3. Classificação Taxonómica de *Bordetella bronchiseptica*

A *Bordetella bronchiseptica* foi isolada e identificada pela primeira vez como *Bacillus bronchicanis* por Newell S. Ferry em 1908, enquanto este realizava um estudo sobre a etiologia de esgana em cães (Ferry 1911). Posteriormente, ao se aperceber que esta bactéria também produzia doença noutros animais decidiu alterar o epíteto para *bronchisepticus* (Ferry 1912).

Ao longo dos anos esta bactéria foi sofrendo alterações na sua classificação taxonómica, desde *Bacterium bronchisepticus*, *Alcaligenes bronchisepticus*, *Brucella bronchiseptica*, *Alcaligenes bronchicanis*, *Haemophilus bronchisepticus*. A sua classificação sob os géneros *Alcaligenes*, *Brucella* e *Haemophilus* deveu-se às suas características morfológicas, bioquímicas e de crescimento serem semelhantes aos organismos pertencentes a estes géneros (Goodnow 1980).

Finalmente, em 1952, Moreno-López classificou a bactéria com o nome pelo qual hoje é identificada, *Bordetella bronchiseptica*, descrevendo o género *Bordetella* em homenagem a

Jules Bordet que isolou o organismo causador de pertussis pela primeira vez (Moreno-López 1952; Goodnow 1980).

2.4. Patogénese

A *B. bronchiseptica*, ao contrário da *B. pertussis* e da *B. parapertussis*, infeta um vasto leque de mamíferos, incluindo cães, gatos, porcos, coelhos, podendo causar, ocasionalmente, doença em humanos (Mattoo and Cherry 2005).

Esta bactéria é atualmente reconhecida como um dos principais agentes implicados na patogenia do CIRDC e é, normalmente, um fator de complicação de infeções virais primárias (Day et al., 2020). Apesar de poder provocar doença, a *B. bronchiseptica* tem sido isolada com frequência a partir de animais saudáveis, indicando que esta bactéria pode atuar como agente comensal (Chalker, Toomey, et al. 2003; Schulz et al. 2014).

A patogénese da *B. bronchiseptica* depende da síntese coordenada de diversos fatores de virulência que irão auxiliar este agente a ultrapassar os mecanismos de defesa do hospedeiro e a colonizar com sucesso o epitélio respiratório (Brockmeier et al. 2019).

2.4.1. Fatores de virulência

A expressão dos fatores de virulência das *Bordetella* é regulada pelo locus *bvgAS* que codifica um sistema, BvgAS (Figura 1), sensível às alterações do meio em que a bactéria se encontra e que, conseqüentemente, promove a expressão de genes que irão induzir ou reprimir a expressão dos diversos fatores de virulência (Beier and Gross 2008).

BvgAS é um sistema de dois componentes no qual BvgA é uma proteína reguladora de resposta e BvgS é uma quinase sensorial transmembranar (Uhl and Miller 1994; Uhl and Miller 1996a). Uhl and Miller (1996b) decifraram o mecanismo deste sistema e descobriram que este deteta certos sinais através de BvgS que, após sofrer ativação através de uma autofosforilação, ativa BvgA e, conseqüentemente, a expressão dos genes de virulência.

Sob condições não moduladoras (Bvg⁺), ou seja, quando as condições ambientais são propícias ao desenvolvimento bacteriano, observam-se diferenças na expressão dos diferentes fatores de virulência (Mattoo et al. 2001). Scarlato et al. (1991) propuseram que estas diferenças cinéticas podem ter uma grande importância *in vivo*, na adaptação da bactéria ao hospedeiro e às diferentes condições ambientais.

A fase Bvg⁻ é expressa quando as *Bordetella* crescem sob condições moduladoras ou quando ocorre uma mutação que inative *bvgAS* (Mattoo et al. 2001). Na *B. bronchiseptica* esta fase é caracterizada pela expressão de motilidade e vários processos metabólicos envolvidos em reações *redox* e transporte de aminoácidos, indicando que existe uma adaptação deste agente a condições adversas (Akerley et al. 1992).

Cotter and Miller (1994) demonstraram que a fase Bvg⁺ é necessária e suficiente para a colonização do trato respiratório, enquanto a fase Bvg⁻ é necessária e suficiente para a sobrevivência sob condições limitantes de nutrientes.

Existe ainda uma terceira fase fenotípica (Cotter and Miller 1997), caracterizada pela ausência de fenótipos reprimidos e pela presença de alguns fatores de virulência ativados por BvgAS e ainda um conjunto de fenótipos que apenas são observados nesta fase (Mattoo et al. 2001). Uma vez que possui características intermédias entre Bvg⁺ e Bvg⁻, foi decidido chamar a esta fase Bvgⁱ.

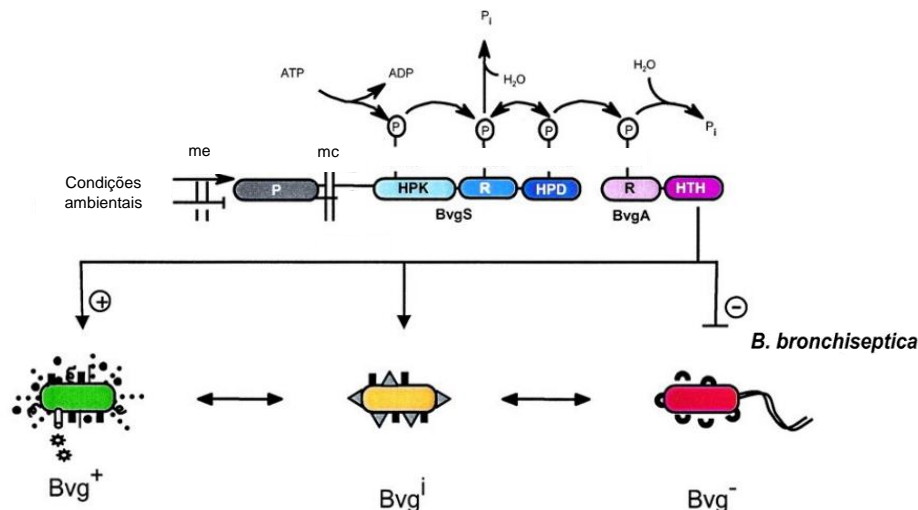


Figura 1. Etapas sequenciais do sistema regulador BvgAS (adaptado de Mattoo and Cherry (2005)). BvgS: proteína sensorial com um domínio periplasmático (P), uma região de ligação (L), uma quinase de histidina (HPK), um recetor (R) e um domínio de transferência de fósforo para histidina (HPD). BvgA: proteína reguladora de resposta, com um domínio recetor (R) e um de hélice-volta-hélice (HTH). Sob condições ambientais favoráveis, BvgS sofre autofosforilação, iniciando a transferência de fósforo (Ⓢ) que leva à fosforilação e ativação de BvgA. Bvg⁺: fenótipo de colonização do trato respiratório, associado à expressão de fatores de virulência. Bvgⁱ: fenótipo intermédio, importante para a transmissão respiratória. Bvg⁻: fenótipo para a sobrevivência sob condições limitantes, essencial para a sobrevivência fora do hospedeiro. ADP: Adenosina Difosfato; ATP: Adenosina Trifosfato; H₂O: água; me: membrana externa; mc: membrana celular; P_i: fósforo inorgânico.

2.4.1.1. Hemaglutinina Filamentosa

A síntese e processamento da Hemaglutinina Filamentosa (FHA) são regulados pelos genes *thaB* e *thaC* que, por sua vez, são regulados pelo sistema BvgAS (Cotter et al. 1998). A FhaB, forma imatura da FHA, irá sofrer processamento até originar a forma madura e a FhaC, dando origem a um canal específico para o transporte do primeiro para o espaço extracelular (Jacob-Dubuisson et al. 2000).

A FHA é uma adesina de grande importância na patogênese das *Bordetella* ao facilitar a aderência das bactérias ao epitélio respiratório, iniciando assim o ciclo patogénico (Cotter et al. 1998; Guetter and Eiteman 2013). Este fator auxilia as bactérias a ultrapassar a

clearance mucociliar, atuando em sinergia com as fímbrias, ao fortalecer a adesão ao epitélio respiratório ciliado (Cotter et al. 1998; Scheller et al. 2015).

Também em sinergia com as fímbrias, a FHA medeia a resposta inflamatória inata local e confere proteção contra a ação bactericida imunomediada, ligando-se a inúmeras células inflamatórias como macrófagos, neutrófilos e células CD4⁺, inibindo a sua liberação (Inatsuka et al. 2005; Henderson et al. 2012; Melvin et al. 2015; Scheller et al. 2015).

2.4.1.2. Fímbrias

As *Bordetella* expressam estruturas proteicas poliméricas filamentosas na sua superfície celular, a que se dá o nome de fímbrias (FIM). Fim2 e Fim3 são as principais proteínas estruturais das fímbrias (Scheller and Cotter, 2015), exportadas para o exterior através de um mecanismo composto por três proteínas, FimB, FimC e FimD.

Tal como os restantes fatores de virulência, os genes responsáveis pela expressão das FIM (*fimB*, *fimC*, *fimD*, *fimA*, *fimX*, *fim2* e *fim3*) são regulados pelo sistema BvgAS (Savelkoul et al. 1996).

Em 2015, o estudo de Scheller et al. providenciou os primeiros resultados que demonstravam que as FIM de *Bordetella* eram importantes adesinas e que a sua aderência ocorria principalmente ao nível do epitélio respiratório ciliado. Além disso, estes autores chegaram à conclusão de que as FIM são extremamente importantes na primeira adesão das bactérias ao epitélio ciliado e para a sua persistência neste local.

Além de possuir propriedades adesivas, as FIM são também importantes para a supressão da resposta inflamatória do hospedeiro, promovendo assim uma persistência mais longa do agente no trato respiratório do hospedeiro (Mattoo et al. 2000; Scheller et al. 2015).

2.4.1.3. Pertactina e Outros Autotransportadores

A. B. bronchiseptica possui vários mecanismos de secreção de proteínas, entre os quais se encontram os autotransportadores, ou via de secreção do tipo V (Henderson and Nataro 2001).

O sistema de secreção do tipo V é talvez dos mecanismos de secreção proteica mais simples que se conhece, já que as proteínas secretadas por esta via atravessam a membrana interna e externa das bactérias em apenas dois passos (Henderson et al. 1998; Henderson et al. 2004). Neste sistema, a porção da proteína que medeia a secreção está contida no precursor da própria proteína segregada, advindo daí a nomenclatura de autotransportadores (Henderson et al. 1998; Francis et al. 2004).

A. B. bronchiseptica possui 20 autotransportadores putativos funcionais, entre os quais se encontram a pertactina, a SphB1, a BrkA e a Vag8 (Henderson et al. 2004), conhecendo-se apenas a função das duas primeiras.

Em 2010, Inatsuka et al. descobriram que a pertactina está envolvida na resistência à fagocitose mediada por neutrófilos, possivelmente ao permitir interações entre as bactérias e as células fagocitárias de modo a que haja uma entrega eficiente da toxina adenilato ciclase ou ao afetar os eventos de sinalização nas células hospedeiras que os tornam suscetíveis à inibição mediada por essa toxina.

A SphB1 é uma protease necessária para a maturação proteolítica normal de FHA e está envolvida na sua libertação (Coutte et al. 2001; Mazar and Cotter 2006).

2.4.1.4. Sistema de Secreção Tipo III

O Sistema de Secreção do Tipo III (SST3) é um sistema único que injeta ou transloca proteínas bacterianas, através do envelope, diretamente no citosol das células eucarióticas do hospedeiro (Francis et al. 2004). Às proteínas secretadas por este sistema dá-se o nome de Proteínas Efetoras do Tipo III, sendo estas necessárias para a citotoxicidade das bactérias que as possuem (Kuwaie et al. 2003; Francis et al. 2004; Panina et al. 2005; Kuwaie et al. 2006; Kuwaie et al. 2016).

Buboltz et al. (2009) observaram que o SST3 está envolvido numa maior virulência de certas linhagens da *B. bronchiseptica* e que pode ter diferentes funções ou níveis de funções em diferentes estirpes ou espécies de *Bordetella*. Segundo estes autores, esta versatilidade pode contribuir para os diferentes graus de doença respiratória observados nas infeções pela *B. bronchiseptica* (Buboltz et al. 2009).

Além disso, foi observado que o SST3 induz o aumento da produção da IL-10 (interleucina 10) pelo hospedeiro, limitando a excessiva resposta imunitária e aumentando a persistência deste agente no trato respiratório do hospedeiro (Skinner et al. 2005; Nagamatsu et al. 2009).

2.4.1.5. Toxina Adenilato Ciclase

A Toxina Adenilato Ciclase (ACT) é uma proteína bifuncional com atividade de hemolisina e adenilato ciclase, secretada por todas as espécies pertencentes ao género *Bordetella* (Mattoo and Cherry 2005). Esta toxina tem expressão máxima em Bvg⁺ (Irie et al. 2004; Mattoo and Cherry 2005).

A ACT pode ser translocada para o interior das células hospedeiras infetadas resultando na supressão da quimiotaxia e da atividade fagocitária de células imunitárias e na intoxicação das células infetadas (Wolff et al. 1980; Confer and Eaton 1982; Coote 1992; Mock and Ullmann 1993), ou seja, a ACT atua simultaneamente como fator anti-inflamatório e antifagocitário, durante a infeção.

Além disso, a ACT inibe a formação de biofilme pela *B. bronchiseptica*, em parte, ao interagir com a FHA (Irie et al. 2004).

2.4.1.6. Toxina Dermonecrótica

A Toxina Dermonecrótica (DNT) é uma toxina termolábil que, quando injetada intradermicamente, provoca lesões dermonecróticas em vários mamíferos e pode ser letal, se injetada por via endovenosa (Evans and Maitland 1939; Iida and Okogoni 1971; Horiguchi et al. 1989).

Em 2015, Okada et al. realizaram um estudo no qual observaram que a produção da DNT é diferente nas várias estirpes de *B. bronchiseptica*, sendo maior nas estirpes infantantes de suínos. Uma vez que outra das funções da DNT é a alteração da morfologia das células osteoblásticas, esta toxina parece possuir maior importância na patogenia da rinite atrófica dos suínos (Horiguchi et al. 1991; Horiguchi et al. 1993; Horiguchi et al. 1994; Horiguchi et al. 1995; Okada et al. 2015).

2.4.1.7. Lipopolissacárido

As bactérias Gram negativas possuem, na sua membrana externa, um importante componente para a interação com o hospedeiro, o lipopolissacárido (LPS).

O LPS de *B. bronchiseptica* é constituído por duas bandas, A e B, associadas a uma estrutura antigénica O (Preston et al. 2006). Este fator fornece atividade pirogénica, mitogénica e tóxica e pode ainda ativar a produção do TNF (Fator de Necrose Tumoral) pelos macrófagos, sendo importante para a imunomodulação e fuga às defesas do hospedeiro (Watanabe et al. 1990; Sisti et al. 2002; Sisti et al. 2017).

Gallego et al. (2013) observaram que, para além de possuir funções citotóxicas, o LPS é importante na adesão ao epitélio respiratório ciliado do hospedeiro.

2.4.1.8. Citotoxina Traqueal

Todas as espécies pertencentes ao género *Bordetella* produzem a Citotoxina Traqueal (CT), um produto da degradação do peptidoglicano presente na parede celular destes organismos (Rosenthal et al. 1987; Cookson et al. 1989).

Este fator de virulência é importante na patogenia da doença respiratória uma vez que leva à destruição das células ciliadas. Esta destruição é mediada pela estimulação da produção de interleucina 1 α (IL-1 α) e consequente libertação de óxido nítrico pelas células não ciliadas do epitélio respiratório, vizinhas das células ciliadas (Heiss et al. 1993; Flak and Goldman 1996; Flak and Goldman 1999; Flak et al. 2000). Apesar deste composto não ser letal para as células não ciliadas do epitélio respiratório, o mesmo não é verdade para as células ciliadas que, sendo mais sensíveis, acabam por sofrer danos e, eventualmente, morte celular (Flak and Goldman 1996; Flak and Goldman 1999).

2.4.1.9. Biofilmes

Os biofilmes são comunidades microbianas complexas e sésseis que podem ser encontradas aderidas a superfícies ou como agregados enterrados numa matriz extracelular (Roy et al. 2018). Como muitos outros agentes patogénicos, as bactérias pertencentes ao género *Bordetella* produzem estas estruturas que, neste caso, são altamente diferenciadas e cuja formação ocorre de forma coordenada e seguindo estadios específicos (Mishra et al. 2005; Cattelan et al. 2016).

Tal como muitos dos fatores de virulência mencionados anteriormente, também os biofilmes sofrem regulação pelo sistema BvgAS, sendo o seu desenvolvimento máximo em Bvg⁺ e Bvgⁱ (Irie et al. 2004; Mishra et al. 2005).

Segundo Irie et al. (2004), a FHA, as FIM e a ACT são muito importantes na formação dos biofilmes, sendo os primeiros necessários para a formação máxima de biofilmes e a ACT para a sua inibição.

Um dos papéis mais importantes destas estruturas é a tolerância aos antibióticos que fornecem às bactérias. Mishra et al. (2005) sugerem que o modo de crescimento dos biofilmes promovem a tolerância a uma vasta variedade de antibióticos na *B. bronchiseptica*.

2.5. Resistência Antimicrobiana

2.5.1. Suscetibilidade Antimicrobiana

Como referido anteriormente, a realização de TSAs previamente à realização do tratamento clínico de infeções pela *B. bronchiseptica*, assim como no tratamento de outros agentes bacterianos, é de extrema importância (Kadlec and Schwarz 2018).

Para estudar a suscetibilidade antimicrobiana da *B. bronchiseptica*, podem ser realizados estudos de disco-difusão em agar ou pela determinação da concentração mínima inibitória (MIC) por diluição em agar ou por micro ou macrodiluição em caldo (Kadlec and Schwarz 2018).

Até à data, a informação relativa aos critérios clínicos que classificam a suscetibilidade ou resistência aos principais antibióticos usados no tratamento das infeções respiratórias nos animais de companhia é escassa ou inexistente (Lappin et al. 2017; Moyaert et al. 2019). Relativamente às infeções pela *B. bronchiseptica*, os critérios clínicos existentes são referentes a infeções em suínos (CLSI 2018), não existindo qualquer informação disponível para estirpes infetantes de animais de companhia, pelo que a classificação como suscetível ou resistente é realizada através de critérios clínicos utilizados para infeções por *Bordetella* em humanos (EUCAST).

2.5.2. Mecanismos de Resistência Antimicrobiana

De modo a evitar a morte por compostos antimicrobianos, as bactérias evoluíram no sentido de desenvolver certos mecanismos de resistência aos mesmos (Munita and Arias 2016). Assim, as bactérias possuem mecanismos de inativação enzimática da molécula antimicrobiana, de diminuição da acumulação intracelular de antibiótico no local alvo (através da diminuição da permeabilidade ou através da extrusão do composto antimicrobiano com recurso a bombas de efluxo), de promover alterações ou evitar o local alvo e de mecanismos de resistência por processos adaptativos (Munita and Arias 2016; Kadlec and Schwarz 2018).

A *B. bronchiseptica* possui todos estes mecanismos de resistência (Kadlec and Schwarz 2018).

2.5.2.1. Tetraciclinas

As tetraciclinas, como a tetraciclina, oxitetraciclina e doxiciclina, são compostos bacteriostáticos que inibem a síntese proteica bacteriana na fase de tradução (Maddison et al. 2008).

De um modo geral, a maioria dos isolados de *B. bronchiseptica* são suscetíveis às tetraciclinas, observando-se valores de MIC baixos (EUCAST; Kadlec and Schwarz 2018)

Em 1997, Speakman et al. demonstraram, pela primeira vez, a presença de resistência às tetraciclinas pela *B. bronchiseptica*, isolada a partir de gatos, e que esta se devia à existência de um gene que codifica uma proteína de efluxo específica para este agente.

2.5.2.2. Sulfonamidas e Potenciadores

As sulfonamidas são compostos antibacterianos, de ação bacteriostática, que inibem, de forma competitiva, a enzima di-hidropteroato sintetase, necessária para a síntese de folatos e consequente síntese de ácidos nucleicos bacterianos (Maddison et al. 2008). Alguns dos compostos pertencentes a este grupo são a sulfadiazina e o sulfametoxazole.

Na *B. bronchiseptica*, a resistência às sulfonamidas é realizada através de dois genes que codificam uma di-hidropteroato sintetase insensível à ação das sulfonamidas (Kadlec and Schwarz 2018).

Assim como as sulfonamidas, o modo de ação do trimetoprim consiste na inibição da síntese de ácido fólico pelas bactérias, mas pela ligação e inibição da enzima di-hidrofolato redutase. No entanto, este possui uma ação mais bactericida quando comparado com as sulfonamidas (Maddison et al. 2008).

O mecanismo de resistência da *B. bronchiseptica* ao trimetoprim consiste na codificação de uma di-hidrofolato redutase alternativa, não sensível a este composto (Kadlec and Schwarz 2018). No entanto, uma vez que, usualmente, o trimetoprim é usado em

associação com uma sulfonamida, o risco de ocorrência de resistência é menor (Kadlec and Schwarz 2018).

2.5.2.3. Aminoglicosídeos e Aminociclítóis

Os aminoglicosídeos e aminociclítóis, gentamicina e amicacina, por exemplo, têm atividade bactericida ao interferirem na codificação das proteínas e, conseqüentemente, levando ao aparecimento de canais anormais ao nível das membranas celulares bacterianas (Maddison et al. 2008).

Relativamente aos aminoglicosídeos, sabe-se que a *B. bronchiseptica* possui valores de MIC elevados para a estreptomicina, existindo, no seu genoma, genes que codificam enzimas que inativam este composto (Kadlec and Schwarz 2018). Por outro lado, os valores de MIC conhecidos para a neomicina e gentamicina são mais baixos não tendo ainda sido detetados genes de resistência (Kadlec and Schwarz 2018).

No caso do aminociclitol espectinomina, um estudo revelou valores de MIC elevados em infeções em cães (Schwarz et al. 2007).

2.5.2.4. Anfenicóis

Os anfenicóis são compostos com ação bacteriostática que inibem a síntese proteica bacteriana ao se ligarem de forma reversível aos ribossomas e impedindo a adição de aminoácidos à cadeia peptídica (Maddison et al. 2008). Fazem parte deste grupo de antibióticos o cloranfenicol e o florfenicol.

A *B. bronchiseptica* possui resistência ao cloranfenicol através de acetiltransferases de cloranfenicol que inativam fenicóis não fluorados, e ainda resistência ao florfenicol através de uma bomba de efluxo (Kadlec and Schwarz 2018).

2.5.2.5. β -Lactâmicos

Os β -lactâmicos, como as penicilinas e as cefalosporinas, são compostos bactericidas que inibem a síntese da parede bacteriana tornando-a mais frágil e promovendo a lise celular (Maddison et al. 2008).

Em 2005, Lartigue et al. identificaram o gene responsável pela resistência aos β -lactâmicos no genoma da *B. bronchiseptica*. Este codifica uma β -lactamase que, ao hidrolisar estes antibióticos, impede a sua ação (Lartigue et al. 2005).

Além disso, assim como muitas outras bactérias Gram negativas, a *B. bronchiseptica* possui uma baixa permeabilidade aos antibióticos β -lactâmicos (Maddison et al. 2008).

Parte 2: Estudo de Caso

1. Objetivo do Estudo

O CIRDC é uma doença comum em cães que habitam em ambientes de elevada densidade e possui uma elevada morbidade nestes locais. A *B. bronchiseptica* é um agente clássico deste complexo que afeta principalmente o aparelho respiratório superior podendo, quando existe imunossupressão ou co-infecção com outros agentes de CIRDC, provocar doença respiratória inferior grave, como pneumonia ou broncopneumonia.

Apesar de ser uma doença comum, existe ainda pouco consenso no tratamento a realizar, dada a inexistência de critérios clínicos de classificação para a sensibilidade da *B. bronchiseptica*, tornando-se difícil saber qual o protocolo a seguir.

Este estudo foi realizado com o âmbito de avaliar um possível protocolo diagnóstico e um protocolo terapêutico para animais que apresentem resistência a antibióticos, comparando-o com a bibliografia disponível existente, de modo a tornar o tratamento mais eficiente e tentar evitar casos de antibiorresistência, no futuro.

2. Material e Métodos

Para este estudo foi analisado o caso de uma cadela, Cavalier King Charles Spaniel (CKCS), de 3 meses, que se apresentou à consulta com sinais clínicos respiratórios compatíveis com CIRDC e na qual, posteriormente, se diagnosticou uma infeção por *B. bronchiseptica* multirresistente.

A informação sobre o caso foi recolhida a partir do software Wintouch VET®, no Hospital Veterinário do Porto, tendo sido posteriormente analisada. Foram recolhidos todos os dados clínicos sobre a cadela, desde a primeira consulta, no Centro de Atendimento Médico Veterinário (CAMV) referenciador, a 5 de janeiro de 2019, até ao dia da cura clínica, no Hospital Veterinário do Porto, a 2 de maio de 2019.

3. Apresentação do Caso Clínico

3.1. História Progressiva

Uma cadela de 3 meses, com 2.2 kg, CKCS, apresentou-se à consulta, no Hospital Veterinário do Porto, com história de tosse crónica, apatia e anorexia parcial, tendo sido referenciada de outro CAMV da região.

A cadela tinha sido comprada a um criador, duas semanas antes de ter sido apresentada no CAMV referenciador, tendo este realizado a vacinação contra a parvovirose, a desparasitação interna e a administração da associação amoxicilina com ácido clavulânico (8.75 mg/kg SC, SID), uma vez que a cadela já apresentava episódios de tosse no local de criação.

Após realização e avaliação de um raio-X torácico (Figura 2), os médicos veterinários decidiram prescrever a administração da associação amoxicilina com ácido clavulânico (25 mg/kg PO BID) e Cloridrato de Bromexina (2.5 mg/kg PO BID), durante uma semana, e uma administração por via oral, em toma única, da associação de Emodepside com Toltrazuril (0.5 ml/kg PO), reavaliando-a findo o período de terapêutica.



Figura 2. Raio-X torácico laterolateral realizado a 5/1/2019. Nota-se diminuição da expansão pulmonar, com o aumento da opacidade do parênquima pulmonar em toda a região ventral, a qual limita a delimitação da silhueta cardíaca e estruturas vasculares. Observa-se um padrão pulmonar alveolar a intersticial, sendo visíveis alguns broncogramas de ar. Achados compatíveis com pneumonia.

No entanto, passada uma semana, a cadela não mostrou melhorias clínicas com o tratamento domiciliário administrado, apresentando então perda de peso e apetite caprichoso, dispneia expiratória, corrimento nasal bilateral, piréxia (40°C) e fervores à auscultação torácica.

Tendo em conta este agravamento do estado clínico, os médicos veterinários do CAMV decidiram hospitalizar a cadela de forma a poder realizar fluidoterapia, oxigenoterapia, administração de ampicilina (15 mg/kg IV TID), de enrofloxacina (5 mg/kg IV SID) e de acetilcisteína (nebulização).

3.2. Exame Físico

Ao exame físico, a cadela apresentava tosse, corrimento nasal bilateral, dispneia marcada e sendo possível ouvir fervores em ambos os hemitórax, à auscultação. A cadela apresentava pirexia (40 °C).

O restante exame físico não demonstrou alterações significativas.

3.3. Diagnósticos Diferenciais

3.3.1. Tosse

1. Infecioso: bacteriano (ex.: bordetelose), parasitário (ex.: *Angiostrongylus vasorum*, *Dirofilaria immitis*, *Oslerus osleri*), viral (ex.: esgana canina) ou fúngico (ex.: coccidiomicose);
2. Imunomediado/Inflamatório/Alérgico (ex.: bronquite crônica ou bronquite alérgica);
3. Neoplasia primária (ex.: adenocarcinoma, carcinoma alveolar, carcinoma das glândulas bronquiais) ou metastática;
4. Obstrutivo (ex.: colapso traqueal, broncomalácia, paralisia da laringe, colapso laríngeo, neoplasia obstrutiva, corpo estranho);
5. Hemorragia pulmonar: por coagulopatia, induzida por exercício, neoplasia ou traumática;
6. Edema pulmonar: obstrução aérea, cardiogénico, electrocução, hipoglicémia, hipoproteinémia, iatrogénico, neurológico (trauma craniano ou convulsões), obstrução da drenagem linfática, lesão primária da membrana alvéolo-capilar;
7. Tóxicos e Substâncias Irritantes: inalação de fumo ou de fumos químicos;
8. Outro: dilatação atrial esquerda, pneumonia por aspiração, fibrose pulmonar idiopática, disquinésia ciliar primária, disfagia, refluxo gastrointestinal, fístula traqueo-esofágica ou bronco-esofágica.

3.3.2. Dispneia

1. Fisiológica: exercício, medo, temperatura elevada ou dor;
2. Doença das vias aéreas superiores
 - a. Traqueia cervical: compressão extraluminal, corpo estranho, hipoplasia ou estenose, neoplasia extra- ou intraluminal, colapso traqueal ou trauma;
3. Doença das vias aéreas inferiores
 - a. Traqueia torácica: compressão extraluminal, corpo estranho, hipoplasia ou estenose, neoplasia extra ou intraluminal, colapso traqueal ou trauma;
 - b. Brônquios: bronquiectasia, fístula bronco-esofágica, bronquite crônica, bronquite alérgica, compressão extraluminal, corpo estranho, neoplasia, disquinésia ciliar primária;
 - c. Parênquima pulmonar: corpo estranho, fibrose pulmonar idiopática, doença inflamatória, gases irritantes ou inalação de fumo, neoplasia, toxicidade por paraquat, pneumonia/doença infecciosa (ex.: bacteriana – *B. bronchiseptica*, *Mycoplasma pneumoniae*, pasteurelose; fúngica – coccidiomicose; parasitária – *Angiostrongylus vasorum*, *Oslerus osleri*; viral – esgana canina), edema pulmonar, tromboembolismo pulmonar, trauma;

4. Doença restritiva: hérnia diafragmática (ex.: peritoneo-pericárdica ou traumática), neoplasia mediastínica ou da parede torácica, derrame pleural, pneumotórax, alterações da parede torácica (ex.: neoplasia, *pectus excavatum* ou trauma);
5. Doença sistêmica ou outra: anemia, trauma craniano, hipertermia, hipóxia, acidose metabólica, fraqueza neuromuscular (ex.: poliradiculoneurite) ou choque/hipovolémia;
6. Tóxicos e Fármacos (ex.: diclorofenac, ibuprofeno, metaldeído, paracetamol, paraquat, salbutamol, estricnina).

Baseado na história clínica, exame físico e ainda nos resultados dos exames de diagnóstico complementares já realizados, foi possível descartar os diagnósticos menos prováveis: um quadro obstrutivo, a presença de corpo estranho radiopaco, pneumotórax ou de hérnia diafragmática foram postos de parte após observação do raio-X realizado pela clínica que referenciou o caso; neoplasia seria improvável dada a idade jovem da cadela; uma possível intoxicação por tóxicos ou fármacos parecia pouco provável uma vez que a cadela não tinha acesso aos mesmos.

Uma vez que a cadela era proveniente de um criador, local onde a densidade animal é grande e onde as condições de habitação podem ser propensas ao desenvolvimento de infecção respiratória, o diagnóstico mais provável seria infecção respiratória bacteriana.

3.4. Diagnóstico

De modo a poder descartar outras possíveis causas do quadro apresentado, foram realizados exames clínicos de rotina que incluíram hemograma e análises bioquímicas.

O hemograma revelou uma leucocitose de 63.57×10^9 cél/L (intervalo de referência $6.00-17.00 \times 10^9$ cél/L), com neutrofilia de 55.83×10^9 cél/L (intervalo de referência $3.62-12.30 \times 10^9$ cél/L) e monocitose de 3.90×10^9 cél/L (intervalo de referência $0.14-1.97 \times 10^9$ cél/L) (Anexo 1). Realizou-se a medição da ureia e creatinina que apresentaram valores dentro da normalidade. A observação de um esfregaço sanguíneo mostrou leucócitos sem alterações morfológicas assinaláveis, eritrócitos com policromasia ocasional, presença de macroplaquetas (plaquetas jovens), não revelando a presença de hemoparasitas.

Além destes exames clínicos, o plano de diagnóstico incluiu também a realização de exames imagiológicos, mais propriamente, um novo raio-X torácico e broncoscopia e ainda ecocardiografia, de modo a poder descartar alterações da traqueia e causas cardiogênicas, respetivamente.

Ao raio-X torácico, foi possível observar a existência de um padrão pulmonar misto, intersticial a alveolar, difuso e não estruturado, vários broncogramas aéreos, principalmente ao nível dos lobos pulmonares ventrais e do lado esquerdo (Figura 3), achados compatíveis com possível pneumonia.

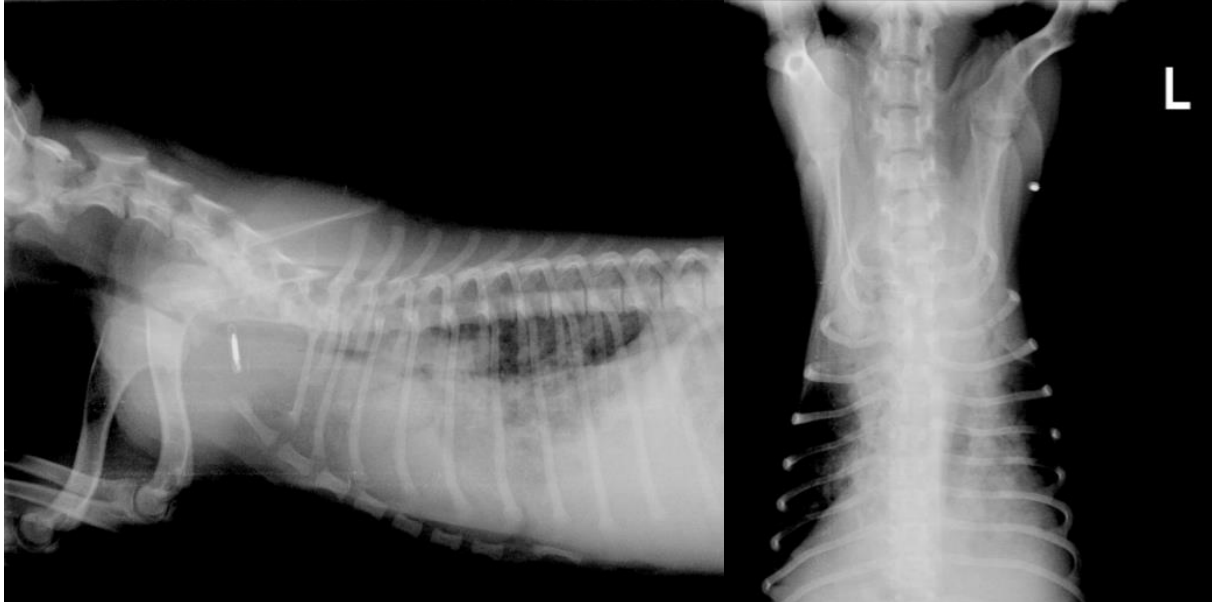


Figura 3. Raio-X torácico laterolateral (à esquerda) e ventrodorsal (à direita) realizado a 12/1/2019. Nota-se uma diminuição moderada da expansão pulmonar, com um aumento da opacidade do parênquima pulmonar de forma grave e difusa, bilateral, sobretudo na região ventral e do lado esquerdo, fazendo com que não sejam perceptíveis as margens da silhueta cardíaca, aorta e veia cava caudal. Opacificação dos lobos pulmonares do lado esquerdo. Padrão pulmonar misto, intersticial a alveolar, difuso e não estruturado, com vários broncogramas aéreos, estando os lobos pulmonares dorsais e do lado direito menos afetados.

A broncoscopia revelou uma estrutura traqueal normal, sem alterações patológicas visíveis, pondo de parte a hipótese de colapso, estenose ou hipoplasia traqueal. Observou-se ainda acumulação ligeira de muco nos brônquios.

Foi realizada uma LBA, com a instilação e recolha de soro fisiológico através de uma algália, acompanhada de *coupage*, cujo material foi usado para a realização de citologia e cultura.

A citologia apresentava uma exuberante população de células inflamatórias constituída predominantemente por neutrófilos não degenerados, raros macrófagos alveolares e eosinófilos associados a escassas bactérias bacilares livres e fagocitadas (Anexo 7). Além disso, observaram-se também raras células epiteliais colunares ciliadas, não atípicas. Estas alterações sugeriam a presença de um processo inflamatório supurativo séptico, compatível com pneumonia.

A cultura do fluido da LBA revelou a presença de *B. bronchiseptica*, sensível a imipenem, gentamicina, tetraciclina, doxiciclina e amicacina e resistente a trimetoprim-sulfametoxazol (Anexo 7).

A realização de ecocardiografia serviu para descartar a possibilidade de doença cardíaca, uma vez que os CKCS são propensos a patologia cardíaca, mais especificamente, persistência do ducto arterioso e Doença Mixomatosa da Válvula Mitral (DMVM). Neste exame, foi diagnosticada a presença de hipertensão pulmonar moderada que se presumiu dever-se a uma provável sobrecarga de fluidoterapia.

Foi também recolhido material conjuntival através de zaragatoa para pesquisa de esgana, por RT-PCR, e ainda colheita de fezes, em três dias sucessivos, para pesquisa de parasitas pulmonares. Apesar de ambos terem apresentado resultados negativos, não se pode afirmar com certeza a ausência de esgana uma vez que a infecção poderia já não estar na fase de pico de virémia.

Com base nos exames complementares realizados, concluiu-se que se tratava de uma infecção respiratória, tendo-se identificado o agente causador, através de cultura, como sendo a *B. bronchiseptica*. No entanto, não se pode excluir a hipótese de ter existido uma doença subjacente e predisponente como, por exemplo, uma infecção viral.

3.5. Tratamento

O tratamento inicial, antes de se ter realizado o diagnóstico do agente e as suas resistências, incluiu a administração de cefazolina (22 mg/kg IV TID) e enrofloxacin (5 mg/kg IV SID), além de furosemida (dose inicial de 4 mg/kg IV BID, com redução gradual até 1 mg/kg IV TID), dada a hipertensão pulmonar ligeira que a cadela apresentava, robenacoxib (primeira dose 1 mg/kg, com redução para 0.5 mg/kg nas doses seguintes IV SID), butorfanol (0.2 mg/kg IV em SOS) e nebulizações de solução salina (4 ml NaCl 0,9% + 0.5 ml acetilcisteína) associadas a *coupage*.

Uma vez que, após 5 dias de tratamento com os antibióticos supramencionados, não houve melhorias clínicas visíveis, a sua administração foi interrompida e substituída por monoterapia com trimetoprim-sulfadoxina (24 mg/kg IV BID), enquanto se aguardava pelos resultados da cultura e TSA.

Após conhecimento do agente responsável e respetivo TSA (Anexo 7), foi decidido interromper a administração de trimetoprim-sulfadoxina e iniciar gentamicina (4.4 mg/kg IV SID) e doxiciclina (10 mg/kg PO SID), já que o agente era resistente ao primeiro e sensível aos últimos.

3.6. Reavaliações

Durante o período de administração de gentamicina e doxiciclina, a cadela apresentou ligeiras melhorias a nível radiográfico (Figura 4), com diminuição da radiopacidade do parênquima pulmonar, principalmente nos lobos pulmonares esquerdos. Esta melhoria foi acompanhada pela diminuição da leucocitose (30.21×10^9 cé/L – intervalo de referência 6.00-17.00 $\times 10^9$ cé/L), da neutrofilia (22.54×10^9 cé/L – intervalo de referência 3.62-12.30 $\times 10^9$ cé/L) e da monocitose 3.17×10^9 cé/L – intervalo de referência 0.14-1.97 $\times 10^9$ cé/L) (Anexo 2) e ainda pela diminuição da frequência dos episódios de tosse.

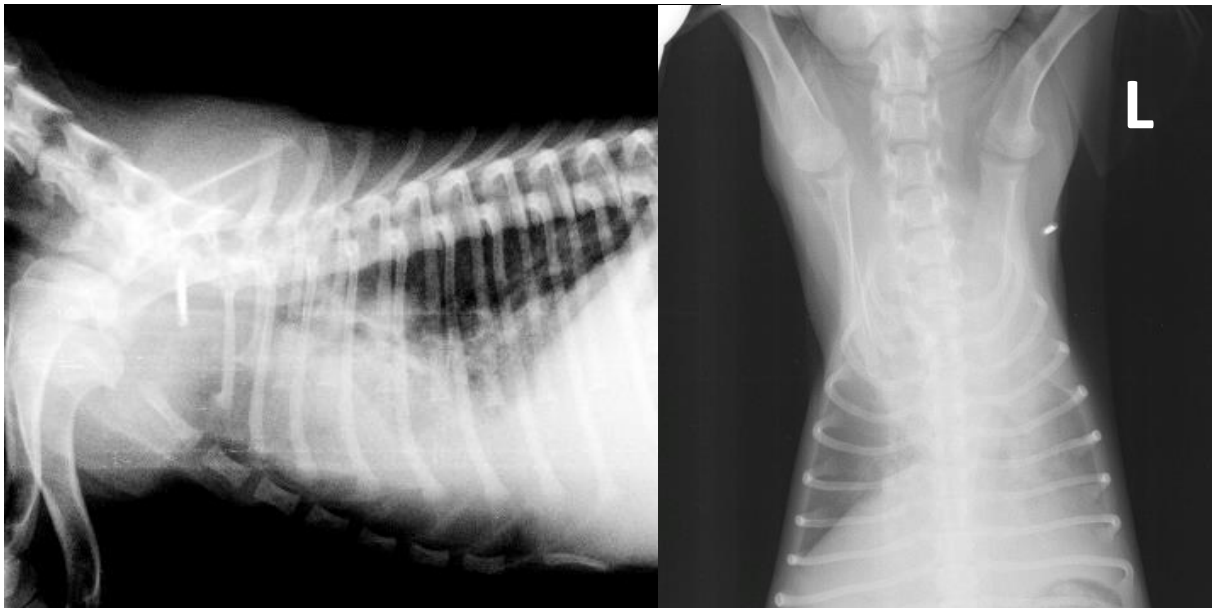


Figura 4. Raio-X torácico laterolateral (à esquerda) e ventrodorsal (à direita) realizado a 25/1/2019. Comparativamente às radiografias do dia 12/1, nota-se uma ligeira melhoria da ventilação pulmonar com diminuição da radiopacidade do parênquima pulmonar, sobretudo nos lobos pulmonares à esquerda, embora se note uma retração grave dos lobos pulmonares craniais (esquerdo >> direito). Mantém-se a não visualização da silhueta cardíaca e principais estruturas vasculares centrais.

No entanto, uma semana depois de ter sido iniciada a terapêutica com estes dois antibióticos, a cadela voltou a apresentar episódios de tosse frequentes, observando-se também um agravamento da leucocitose (40.39×10^9 cé/L – intervalo de referência 6.00-17.00 $\times 10^9$ cé/L), com neutrofilia de 33.02×10^9 cé/L (intervalo de referência 3.62-12.30 $\times 10^9$ cé/L) e monocitose de 3.80×10^9 cé/L (intervalo de referência 0.14-1.97 $\times 10^9$ cé/L) (Anexo 3). Como tal, foi decidido alterar a via de administração de gentamicina de IV para aerógena, através de nebulização. Para a realização da nebulização eram colocados 0.22 mL de gentamicina (4.4 mg/kg) no nebulizador ao qual eram adicionados 0.5 mL de NaCl 0,9%. Esta administração era realizada três vezes ao dia, durante 10 minutos. Além das nebulizações foi adicionada a administração de ceftriaxona (22 mg/kg IV TID), além de continuar o tratamento com doxiciclina.

Este tratamento foi acompanhado pela realização de um novo raio-X torácico e de uma nova LBA, para posterior cultura, TSA e citologia.

A nível radiográfico, a cadela apresentava francas melhorias, com redução da radiopacidade do parênquima pulmonar do lado esquerdo, embora ainda se pudessem observar broncogramas aéreos (Figura 5).

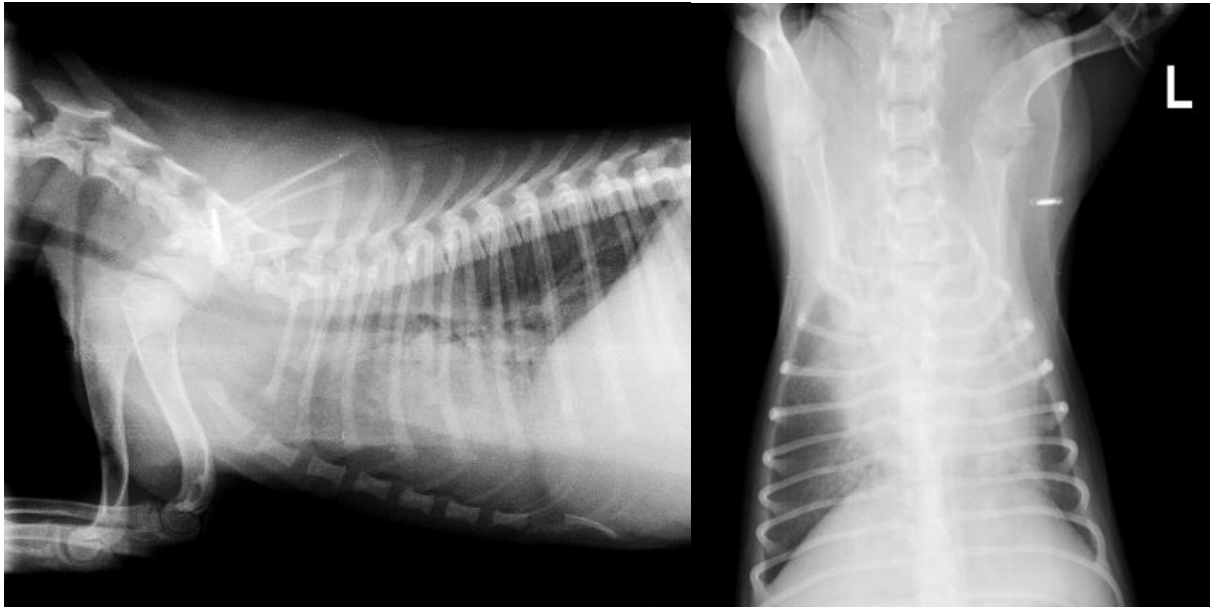


Figura 5. Raio-X torácico laterolateral (à esquerda) e ventrodorsal (à direita) realizado a 5/2/2019.

Comparativamente às radiografias do dia 25/1, há uma franca melhoria na redução da radiopacidade do parênquima pulmonar do lado esquerdo, embora ainda sejam visíveis broncogramas aéreos. A retração dos lobos pulmonares craniais é mínima. Nota-se um padrão pulmonar misto, com zonas a mostrar broncogramas aéreos (região cranioventral) e intersticial a brônquico (região caudodorsal), onde o parênquima pulmonar mostra ténues espessamentos brônquicos (*bronchial cuffing*). As margens da silhueta cardíaca podem-se adivinhar, embora seja difícil delimitá-las.

O resultado da cultura e do TSA realizados a partir do material recolhido por LBA (Anexo 8) mostrou crescimento de *B. bronchiseptica*, com elevada resistência a cefalosporinas de 3^a geração, como é o caso da ceftriaxona. Por outro lado, continuava a ser observada sensibilidade em relação à gentamicina.

Foi requerido ao laboratório que testasse especificamente a sensibilidade a macrólidos e à doxiciclina onde se observou que a bactéria era sensível a azitromicina e que, ao contrário do resultado observado no primeiro TSA realizado, existia resistência à doxiciclina, podendo explicar a fraca evolução obtida com a administração deste antibiótico. A sensibilidade aos macrólidos foi estudada uma vez que se sabe que a azitromicina é usada no tratamento da tosse convulsa das crianças, em medicina humana, causado pela *B. pertussis*.

Com base nestes resultados foi decidido parar a administração de ceftriaxona e doxiciclina e iniciar a administração de azitromicina (preferida sobre a eritromicina uma vez

que possui menos efeitos secundários e uma melhor tolerância) numa dose de 7.2 mg/kg PO, uma vez por dia, mantendo-se a nebulização de gentamicina.

Passado uma semana, foi realizado um hemograma, que demonstrou uma normalização da contagem de leucócitos (7.61×10^9 cél/L – intervalo de referência 6.00-17.00 $\times 10^9$ cél/L), já sem neutrofilia (5.7×10^9 cél/L – intervalo de referência 3.62-12.30 $\times 10^9$ cél/L) e sem monocitose (0.64×10^9 cél/L – intervalo de referência 0.14-1.97 $\times 10^9$ cél/L) (Anexo 4). Além disso, foi ainda realizado um raio-X torácico de controlo (Figura 6), onde foi possível observar uma redução generalizada da opacificação do parênquima pulmonar, sendo possível ainda observar alguns broncogramas de ar, ao nível dos lobos pulmonares caudais.

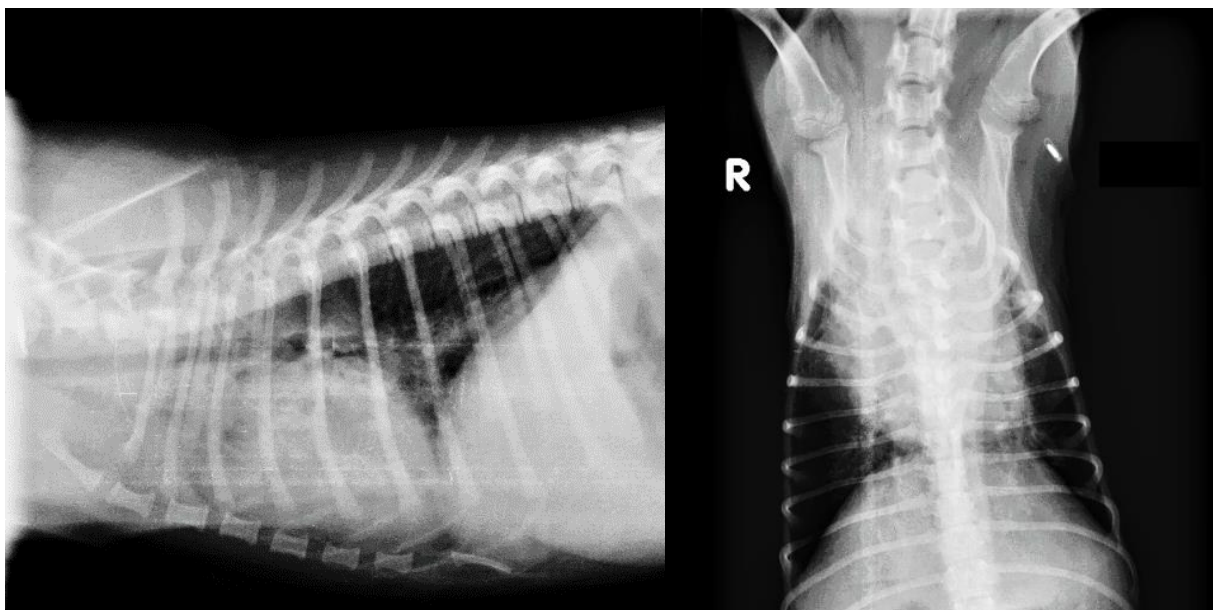


Figura 6. Raio-X torácico laterolateral (à esquerda) e ventrodorsal (à direita) realizado a 11/2/2019. Comparativamente às radiografias do dia 5/2, continua a haver uma redução da opacificação do parênquima pulmonar de forma generalizada. Os broncogramas aéreos ainda são visíveis nos lobos pulmonares caudais, bilateral, embora aparente haver uma tendência para o padrão pulmonar evoluir para um padrão broncointersticial na região caudodorsal. As paredes brônquicas aparecem espessas e mal definidas e sem mostrar uma redução progressiva para a periferia, com suspeita de bronquiectasia (embora a subexposição da imagem não o permita afirmar). É possível identificar as margens da silhueta cardíaca e da veia cava caudal embora estas estejam mal definidas.

Assim, uma vez que, para além das melhorias a nível radiográfico e a normalização do hemograma, a cadela apresentava melhorias clínicas, com aumento do apetite e frequência respiratória normal, foi-lhe dada alta com administração de azitromicina e nebulização de gentamicina, segundo o mesmo protocolo realizado no hospital, seguida de *coupage*, durante uma semana. O plano seria reavaliar o estado clínico da cadela na semana seguinte.

Nas semanas seguintes, a cadela foi mostrando melhorias ligeiras a nível clínico, não apresentando episódios de tosse e comendo com apetite, e também a nível imagiológico (Figura 7) pelo que se decidiu, primeiro, diminuir a frequência da administração da gentamicina para BID e depois parou-se a administração deste antibiótico por completo.

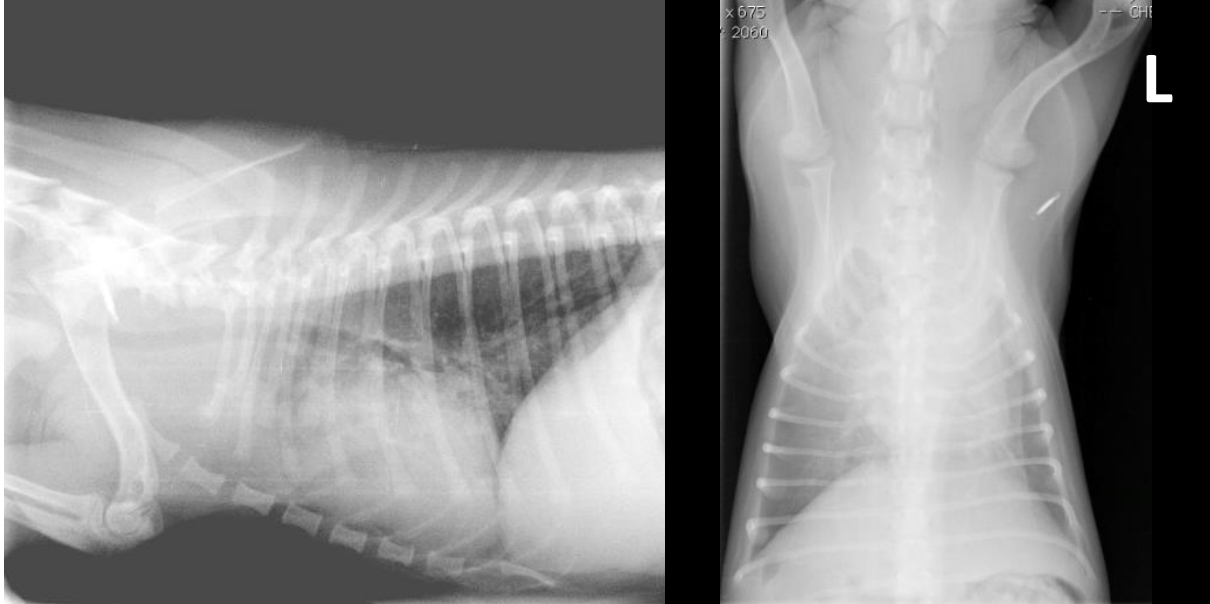


Figura 7. Raio-X torácico laterolateral (à esquerda) e ventrodorsal (à direita) realizado a 18/2/2019. Comparativamente às radiografias do dia 11/2, embora as imagens estejam sub-expostas, é possível observar uma melhoria progressiva na diminuição da opacificação do parênquima pulmonar de forma generalizada, agravando-se nos segmentos brônquicos e lobares, com diminuição da gravidade na periferia. Ainda se notam broncogramas aéreos no lobo caudal esquerdo e não são visíveis os vasos pulmonares (padrão pulmonar maioritariamente intersticial). Retração lobar mínima do lobo cranial esquerdo (ventrodorsal ou VD).

Apesar da cadela continuar a demonstrar melhorias clínicas, não apresentando tosse nem corrimento nasal e tendo já um hemograma com valores dentro dos valores de referência (leucócitos 10.80×10^9 cél/L – intervalo de referência $6.00-17.00 \times 10^9$ cél/L; neutrófilos 5.61×10^9 cél/L – intervalo de referência $3.62-12.30 \times 10^9$ cél/L; monócitos 0.8×10^9 cél/L – intervalo de referência $0.14-1.97 \times 10^9$ cél/L) (Anexo 5), ainda apresentava alguma opacificação do parênquima pulmonar ao nível da região crânio-ventral esquerda (Figura 8), não obstante da melhoria relativamente ao raio-X realizado anteriormente. Deste modo, continuou-se a administração de azitromicina e realizou-se nova LBA com cultura, TSA e citologia, de modo a decidir a possível interrupção da antibioterapia.

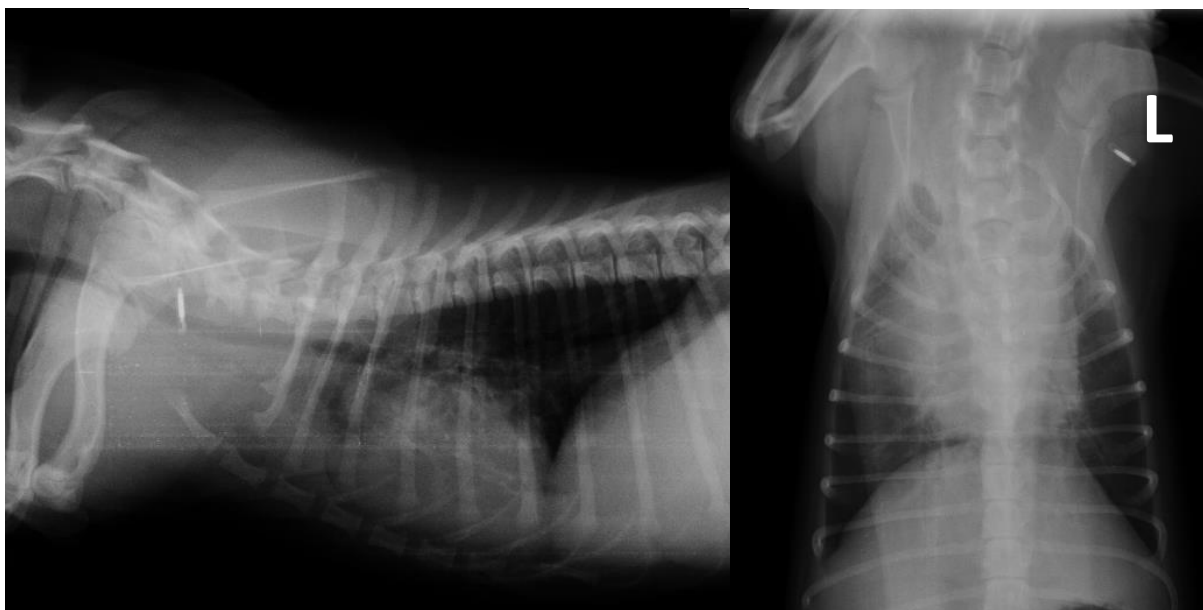


Figura 8. Raio-X torácico laterolateral (à esquerda) e ventrodorsal (à direita) realizado a 6/3/2019.

Comparativamente às radiografias do dia 18/2, observa-se uma boa ventilação da caixa torácica, com uma redução marcada na opacificação do parênquima pulmonar bilateralmente e delimitação das estruturas cardiovasculares (apesar da qualidade da imagem), sendo possível delimitar os contornos da silhueta cardíaca, a qual ocupa mais de 2/3 da cavidade torácica e de 3 EIC. Mantém-se um ligeiro aumento da opacidade do parênquima pulmonar na região cranioventral esquerda. É visível um espessamento brônquico, com “donuts” e “tram-lines”, de margens irregulares, sobretudo no lobo caudal esquerdo, mas também no lobo caudal direito (VD), assim como sobrepostos à silhueta cardíaca (laterolateral ou LL).

A citologia desta última LBA apresentava raras células degeneradas não identificáveis e escassos macrófagos em fundo proteináceo ligeiro e a cultura, ainda revelou crescimento de *Bordetella*, mas apenas em meio de enriquecimento (Anexo 9). Nesta altura foi ponderado não realizar qualquer terapêutica e esperar que o sistema imunitário controlasse a infeção. No entanto, uma vez que a bactéria mantinha o espectro de sensibilidade foi decidido realizar mais 15 dias de tratamento com azitromicina, repetindo LBA antes de o terminar.

A nova cultura demonstrava agora o crescimento de *B. bronchiseptica* (Anexo 10), sem necessidade de meio de crescimento o que indicou que a infeção estava a agravar novamente. Assim, decidiu-se parar a administração de azitromicina e recomeçar a administração de gentamicina por nebulização, durante 15 dias, altura em que se faria uma nova LBA.

Após esta última sessão de administração de gentamicina por nebulização, foi possível observar, na citologia desta nova amostra recolhida por LBA (Anexo 11), uma concentração discreta de neutrófilos, macrófagos e células colunares ciliadas, não tendo havido crescimento de *B. bronchiseptica*, na cultura realizada com a mesma amostra (Anexo 11). Apesar de não ter havido crescimento de *B. bronchiseptica*, houve crescimento de *Staphylococcus* spp. e de

Pseudomonas spp. em meio de enriquecimento. Uma vez que ambos os agentes eram sensíveis a marbofloxacina, foi realizado o tratamento com este fármaco.

Além da cultura e TSA de LBA, foi também realizado um hemograma, cujos valores se encontravam dentro da normalidade (leucócitos 8.11×10^9 cél/L – intervalo de referência 6.00-17.00 $\times 10^9$ cél/L; neutrófilos 4.20×10^9 cél/L – intervalo de referência 3.62-12.30 $\times 10^9$ cél/L; monócitos 0.25×10^9 cél/L – intervalo de referência 0.14-1.97 $\times 10^9$ cél/L) (Anexo 6), e um raio-X de controlo (Figura 9) onde foi possível observar uma imagem torácica quase normal, apresentando apenas uma pequena área de opacificação do parênquima pulmonar, a nível ventral.



Figura 9. Raio-X torácico laterolateral realizado a 2/5/2019. Comparativamente com as radiografias do dia 6/3, observa-se uma boa ventilação pulmonar assim como melhoria significativa da opacidade do parênquima pulmonar mantendo-se, no entanto, um aumento da opacidade nos lobos craniais ventralmente, adjacente aos limites da silhueta cardíaca. Existe um aumento ligeiro da opacidade na região dos lobos craniais, muito provavelmente, artefactual dado o mau posicionamento dos membros anteriores. É possível observar as margens da silhueta cardíaca em toda a sua extensão, assim como os grandes vasos centrais, aorta e veia cava caudal. A silhueta cardíaca encontra-se nos limites superiores da norma em tamanho e uma doença cardíaca não poderá ser totalmente excluída. Estes achados devem ser interpretados juntamente com a clínica do animal.

Com base nos dados destes últimos exames de diagnóstico, e também no estado clínico da cadela, foi decidido terminar a terapêutica uma vez que a infeção por *Bordetella bronchiseptica* tinha sido controlada.

Na consulta de controlo, duas semanas após o fim do tratamento, a cadela já não apresentava sinais clínicos de doença respiratória tendo, por isso, sido realizada a vacinação e desparasitação.

É possível observar, na Figura 10, a *timeline* do caso clínico apresentado de uma forma mais sucinta.

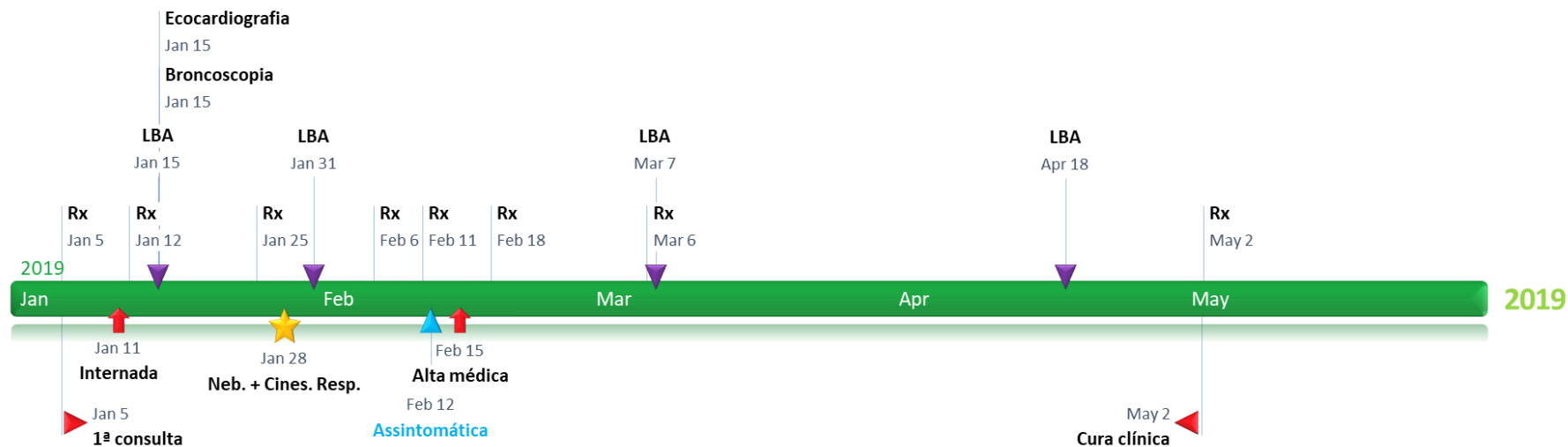
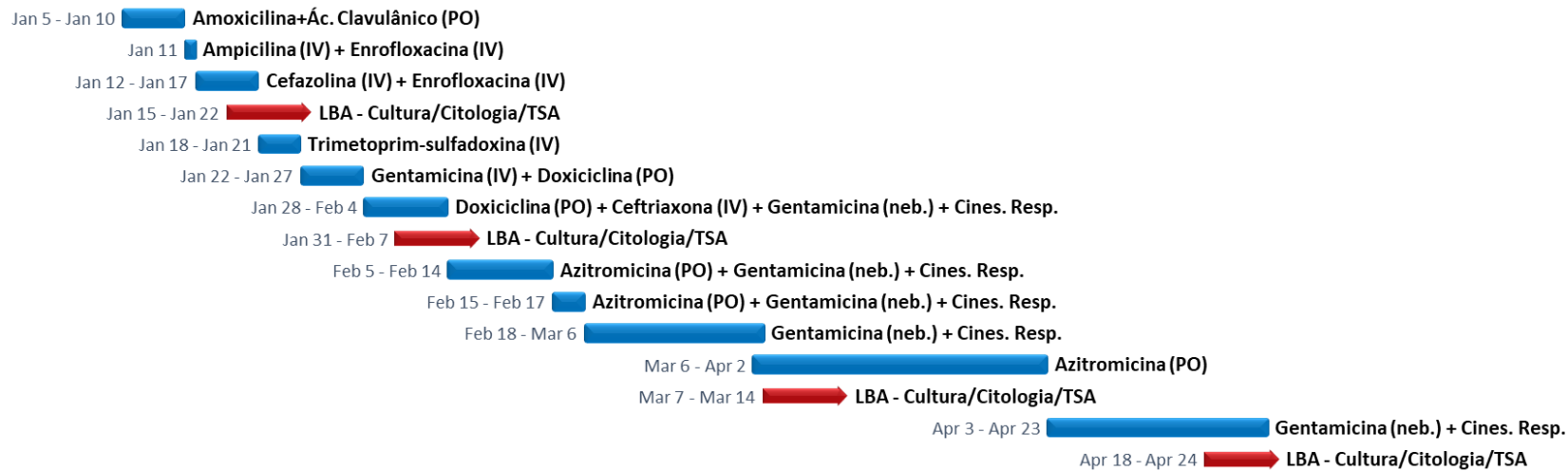


Figura 10. Timeline do Caso Clínico. Esquema representativo da evolução do caso clínico estudado ao longo do tempo, incluindo os antibióticos administrados, os exames de diagnóstico realizados e alguns eventos-chave. Ác. Clavulânico: Ácido Clavulânico; Cines. Resp.: Cinesioterapia Respiratória; IV: Endovenoso; LBA: Lavagem Broncoalveolar; neb.: nebulização; PO: *per os*; Rx: Raio-X; TSA: Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos.

3.7. Score Clínico

De forma a compreender melhor a importância da administração de gentamicina por nebulização na recuperação do animal estudado neste caso clínico, foram criadas tabelas de classificação dos raio-X realizados (Tabelas 2 e 3) e dos sinais clínicos observados (Tabelas 4 e 5). A partir destes dados, foi estabelecido um score clínico (Tabela 6).

Tabela 2. Classificação da evolução das características radiográficas.



Data	Raio-X	Descrição	Classificação
5/1/2019		Diminuição da expansão pulmonar, com o aumento da opacidade do parênquima pulmonar em toda a região ventral. Limitada delimitação da silhueta cardíaca e estruturas vasculares. Padrão pulmonar alveolar a intersticial.	2
12/1/2019		Agravamento da diminuição da expansão pulmonar, com o aumento da opacidade do parênquima pulmonar de forma grave e difusa, bilateral, sobretudo na região ventral e do lado esquerdo. Muito fraca visualização das margens da silhueta cardíaca. Opacificação dos lobos pulmonares do lado esquerdo. Padrão pulmonar misto, intersticial a alveolar, difuso e não estruturado.	1

Tabela 2 (continuação). Classificação da evolução das características radiográficas.

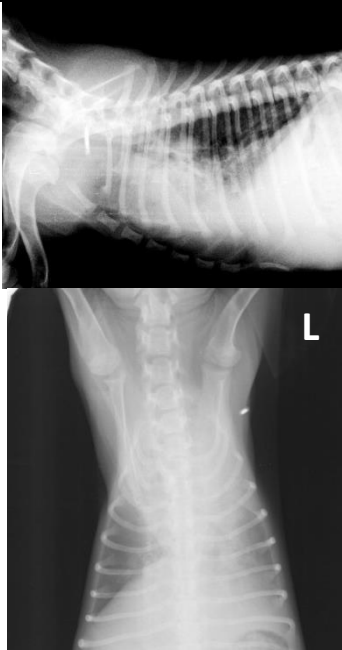

<p>25/1/2019</p>		<p>Ligeira melhoria da ventilação pulmonar, diminuição da radiopacidade do parênquima pulmonar. Mantém-se a não visualização da silhueta cardíaca e principais estruturas vasculares centrais.</p>	<p>2</p>
<p>5/2/2019</p>		<p>Franca melhoria na redução da radiopacidade do parênquima pulmonar do lado esquerdo. Retração dos lobos pulmonares craniais mínima. Padrão pulmonar misto, alveolar e intersticial a brônquico. Difícil delimitação das margens da silhueta cardíaca.</p>	<p>2</p>

Tabela 2 (continuação). Classificação da evolução das características radiográficas.

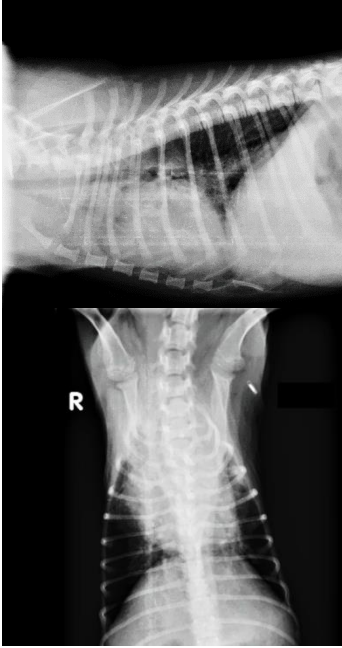

<p>11/2/2019</p>		<p>Redução da opacificação do parênquima pulmonar de forma generalizada. Tendência para o padrão pulmonar evoluir para um padrão broncointersticial na região caudodorsal. Suspeita de bronquiectasia. É possível identificar as margens da silhueta cardíaca e da veia cava caudal embora estas estejam mal definidas.</p>	<p>3</p>
<p>18/2/2019</p>		<p>Melhoria progressiva na diminuição da opacificação do parênquima pulmonar de forma generalizada, agravando-se nos segmentos brônquicos e lobares, com diminuição da gravidade na periferia. Não visualização dos vasos pulmonares. Retração lobar mínima.</p>	<p>4</p>

Tabela 2 (continuação). Classificação da evolução das características radiográficas.



6/3/2019		<p>Boa ventilação da caixa torácica, com uma redução marcada na opacificação do parênquima pulmonar. Boa delimitação das estruturas cardiovasculares. Mantém-se ligeiro aumento da opacidade do parênquima pulmonar. É visível um espessamento brônquico.</p>	4
2/5/2019		<p>Boa ventilação pulmonar assim como melhoria significativa da opacidade do parênquima pulmonar mantendo-se, no entanto, um aumento da opacidade. É possível observar as margens da silhueta cardíaca em toda a sua extensão, assim como os grandes vasos centrais, aorta e veia cava caudal.</p>	5

Tabela 3. Definição dos parâmetros de classificação das características radiográficas e pontuação correspondente.

Pontuação	Características Radiográficas
5	Boa ventilação pulmonar, muito boa visualização e delimitação das margens da silhueta cardíaca e estruturas vasculares, parênquima pulmonar radiotransparente
4	Boa ventilação pulmonar, boa visualização das margens da silhueta cardíaca e estruturas vasculares, padrão pulmonar broncointersticial
3	Diminuição ligeira da expansão pulmonar, difícil delimitação das margens da silhueta cardíaca e estruturas vasculares, aumento generalizado da radiopacidade do parênquima pulmonar, padrão pulmonar alveolar a intersticial
2	Diminuição moderada da expansão pulmonar, fraca visualização das margens da silhueta cardíaca e estruturas vasculares, aumento generalizado da radiopacidade do parênquima pulmonar, padrão pulmonar alveolar a intersticial
1	Diminuição grave da expansão pulmonar, muito fraca visualização das margens da silhueta cardíaca e estruturas vasculares, aumento grave e difuso da radiopacidade do parênquima pulmonar, padrão pulmonar alveolar
Classificação	Pontos
Grave	1
Moderado	2
Leve	3
Bom	4
Excelente	5

Na Tabela 2 encontra-se a informação relativa à evolução da classificação dos raio-X realizados ao longo do caso clínico. Nesta, é possível observar um declínio entre os dias 5/1/2019 e 12/1/2019. No entanto, a partir deste dia (12/1/2019) observa-se uma melhoria gradual até ser alcançada a classificação máxima, no dia 2/5/2019.

A Tabela 3 apresenta os critérios de avaliação e pontuação correspondente na qual foi baseada a classificação radiográfica da cadela em estudo.

Tabela 4. Classificação da evolução dos sinais clínicos.

Data	Sinais Clínicos	Classificação
05/1/2019	Taquipneia, dispneia, tosse frequente, estertores, 38.5°C	1
11/1/2019	Dispneia marcada, tosse frequente, corrimento nasal, estertores em ambos os hemitórax, 40.0°C, perda de peso, anorexia	1
12/1/2019	Dispneia grave, tosse marcada e frequente	1
16/1/2019	Tosse, apetite caprichoso	3
21/1/2019	Tosse marcada	2
22/1/2019	Tosse ligeira, come com apetite	4
25/1/2019	Tosse moderada	2
30/1/2019	Tosse ligeira	4
05/2/2019	Tosse ligeira, come com apetite	4
11/2/2019	Frequência respiratória normal, come com apetite, temperatura normal	5
18/2/2019	Frequência respiratória normal, come com apetite, temperatura normal	5
6/3/2019	Frequência respiratória normal, come com apetite, temperatura normal	5
2/5/2019	Frequência respiratória normal, come com apetite, temperatura normal	5

Tabela 5. Definição dos parâmetros de classificação das características radiográficas e pontuação correspondente.

Pontuação	Sinais Clínicos
5	Sem sinais de doença respiratória
4	Tosse ligeira
3	Tosse ligeira e secreção nasal e/ou ocular, dispneia ligeira, estertores ligeiros
2	Tosse moderada e secreção nasal e/ou ocular com depressão e/ou inapetência, dispneia moderada, estertores
1	Tosse grave e secreção nasal e/ou ocular com depressão e/ou inapetência e sinais clínicos de broncopneumonia, dispneia grave
Classificação	Pontos
Grave	1
Moderado	2
Leve	3
Bom	4
Excelente	5

Os dados relativos à classificação dos sinais clínicos ao longo do caso estudado encontram-se descritos na Tabela 4. Entre os dias 16/1/2019 e 21/1/2019 e, posteriormente, entre os dias 22/1/2019 e 25/1/2019 observa-se um declínio da classificação dos sinais clínicos. A classificação máxima é atingida a partir do dia 11/2/2019.

Na Tabela 5 encontra-se a pontuação e descrição dos critérios de avaliação na qual se baseou a classificação dos sinais clínicos.

Tabela 6. Estabelecimento do score clínico correspondente à classificação dos raio-X e sinais clínicos.

Data	Classificação Raio-X	Classificação Sinais Clínicos	Score Clínico
5/1/2019	2	1	3
12/1/2019	1	1	2
25/1/2019	2	2	4
5/2/2019	2	4	6
11/2/2019	3	5	8
18/2/2019	4	5	9
6/3/2019	4	5	9
2/5/2019	5	5	10
Classificação Score Clínico	Pontos		
Grave	1-2		
Moderado	3-4		
Leve	5-6		
Bom	7-8		
Excelente	9-10		

Ao analisar a Tabela 6, observa-se uma diminuição do score clínico entre o dia 5/1/2019 e 12/1/2019. A partir deste dia a melhoria foi gradual, sendo alcançada a classificação máxima no dia 2/5/2019.

9. Discussão

O presente estudo documenta o caso clínico de uma cadela diagnosticada com infecção respiratória causada por uma *Bordetella bronchiseptica* cujo tratamento antimicrobiano por via sistêmica não foi bem-sucedido, tendo apenas sido possível alcançar a cura clínica quando se associou a antibioterapia sistêmica com antibioterapia por nebulização. Os dados sugerem que a utilização de gentamicina por nebulização diminui o tempo de recuperação, possivelmente por permitir uma ação do antibiótico mais localizada e direta. Além disso, foi também observado que a bactéria isolada se tratava de um organismo multirresistente.

As infecções respiratórias pela *B. bronchiseptica* fazem parte de um complexo de doenças respiratórias infecciosas, atualmente conhecido como CIRDC. Este complexo possui uma etiologia que, sendo multifatorial, inclui diversos vírus e bactérias e ainda fatores inerentes ao hospedeiro. Apesar de, classicamente, o CIRDC ser caracterizado pelo aparecimento agudo de tosse e por um quadro clínico autolimitante (< 2 semanas) (Ford 2012; Reagan and Sykes 2020) a literatura atual descreve casos semelhantes com o apresentado neste estudo, onde os episódios acabam por tomar um carácter crónico (> 2 meses), muitas vezes grave ou até fatal (Canonne et al. 2016).

Tal como aconselhado por vários autores (Lappin et al. 2017; Singleton et al. 2019; Reagan and Sykes 2020), o diagnóstico foi iniciado com a recolha da história clínica completa e com um exame físico minucioso. A cadela em estudo apresentava história de um quadro crónico de tosse, dispneia, corrimento nasal, anorexia parcial e perda de peso, tendo sido possível auscultar ferveores em ambos os hemitórax. Como se tratava de tosse crónica, ponderou-se se esta teria origem cardiogénica ou não cardiogénica. Uma vez que os CKCS possuem predisposição para doença cardíaca congénita, mais especificamente persistência do ducto arterioso e DMVM (Gough et al. 2018), foi realizada uma ecocardiografia para excluir este diagnóstico diferencial.

Ao analisar os raio-X torácicos realizados, foi possível observar uma diminuição moderada da expansão pulmonar, com um aumento da opacidade do parênquima pulmonar de forma grave e difusa, bilateral, sobretudo na região ventral e do lado esquerdo. Estes dados, quando analisados em conjunto com o quadro clínico, eram compatíveis com a presença de uma infecção respiratória (Chalker, Brooks, et al. 2003; Lee-Fowler and Reiner 2012; Lappin et al. 2017).

Uma vez que na presença de infecções respiratórias bacterianas está aconselhada a realização de cultura, de modo a identificar o agente causador (Lappin et al. 2017), foi também recolhido fluido através de lavagem broncoalveolar (LBA), com recurso a broncoscopia. Durante este exame, foi possível observar material mucopurulento presente nas vias aéreas superiores, assim como alguma inflamação da mucosa. Estes achados são concordantes com presença de pneumonia bacteriana (Dear 2020).

Após realização de cultura, a partir do fluido recolhido por LBA, foi obtido o diagnóstico do agente em causa, concluindo-se que a cadela apresentava uma infecção respiratória por *B. bronchiseptica*, agente pertencente a CIRDC. A *B. bronchiseptica* tem sido isolada com alguma frequência a partir do trato respiratório de animais clinicamente saudáveis (Chalker, Toomey, et al. 2003; Ford 2012), sabendo-se que esta bactéria pode atuar como agente comensal ou patogénico (Chalker, Toomey, et al. 2003; Schulz et al. 2014), dependendo de alguns fatores como co-infecção com outro agente de CIRDC (Reagan and Sykes 2020) ou imunodeficiência por parte do hospedeiro (Chapman et al. 2004; Watson et al. 2006; Canonne et al. 2016). De fato, foi observado por Chapman et al. (2004), Watson et al. (2006) e também por Canonne et al. (2016) que a raça CKCS parece possuir um certo grau de imunodeficiência pulmonar, sistémica ou local, apesar de nenhum dos autores ter confirmado esta alteração. Deste modo, uma vez que a cadela em estudo pertence à raça CKCS e ainda que a cadela era jovem, a imunodeficiência pode ter sido um dos fatores que a predispôs a um quadro clínico mais grave que, de outra maneira, teria tido uma resolução mais rápida.

Além deste fator inerente ao indivíduo, o fato de a cadela ter provindo de um local de criação, onde a densidade animal é, por norma, elevada e onde as fracas condições de ventilação podem contribuir para a maior facilidade de transmissão de agentes infecciosos através de gotículas respiratórias (Chalker et al. 2004; Buonavoglia and Martella 2007; Mitchell et al. 2017), pode ter contribuído para uma diminuição da *clearance* mucociliar, aumentando o tempo de contato da bactéria com o epitélio respiratório ciliado e, deste modo, aumentando a sua capacidade de virulência.

A possibilidade de co-infecção por outros agentes do CIRDC não foi extensamente ponderada, tendo sido apenas pesquisada a presença de esgana (CDV), cujo resultado foi negativo, pelo que não se pode afirmar se a possibilidade de uma co-infecção poderia ter também contribuído para a gravidade do quadro clínico observado. No entanto, uma vez que a *B. bronchiseptica* é muitas vezes isolada em conjunto com a *Mycoplasma cynos* (Canonne et al. 2016; Day et al. 2020; Fastrès et al. 2020), poderia ter-se pesquisado a sua presença, já que esta co-infecção pode predispor a quadros clínicos mais graves. Além da pesquisa de esgana, foi também pesquisada a presença de parasitas pulmonares já que também pode dar origem a quadros clínicos como o apresentado pela cadela em estudo, cujo resultado foi negativo.

Apesar de se ter realizado um raciocínio clínico concordante com o discutido na literatura (recolha de história pregressa, exame clínico minucioso, raio-X, cultura e TSA) (Lappin et al. 2017; Singleton et al. 2019; Reagan and Sykes 2020), existem métodos mais específicos e que poderiam ter auxiliado no entendimento da necessidade de tratamento e que poderiam ter permitido um diagnóstico mais precoce e uma resolução clínica mais rápida.

Nos últimos anos, tem sido discutida a utilidade do qPCR no diagnóstico de infecções respiratórias por *B. bronchiseptica* (Canonne et al. 2016; Fastrès et al. 2020). Canonne et al. (2016) concluíram que a detecção da *B. bronchiseptica* por qPCR em fluido recolhido por LBA parece ser o método mais sensível para confirmar a sua presença, sendo mais sensível que a cultura em animais que receberam antibioterapia prévia, uma vez que, na população estudada por estes autores, a detecção por qPCR foi positiva em todos os animais suspeitos analisados, incluindo aqueles cujos resultados de cultura e citologia foram negativos, dados apoiados, posteriormente, pelo estudo de Fastrès et al. (2020). O qPCR também foi considerado uma ferramenta útil na interpretação dos dados de cargas de DNA de *B. bronchiseptica*, conseguindo distinguir estados portadores ou provenientes de infecções ambientais de infecções patológicas (Canonne et al. 2016). No caso clínico estudado, este teria sido um teste de diagnóstico que poderia ter sido considerado nos exames de controlo de modo a perceber se os resultados obtidos nas culturas se tratavam ainda de infeção ativa ou se apenas se tratava de colonização comensal de *Bordetella*, especialmente porque a cadela já tinha recebido antibioterapia previamente à realização do diagnóstico.

Além da utilização de qPCR, poderiam ter sido realizadas culturas quantitativas para se perceber se o crescimento bacteriano de *Bordetella* se tratava de um estado infeccioso ou de colonização inócua. Foi observado por Peeters et al. (2000) que a presença de $> 1.7 \times 10^3$ UFC/mL de *B. bronchiseptica* na cultura de fluido recolhido por LBA era diagnóstico de doença do trato respiratório inferior em cães, com uma sensibilidade de 86% e uma especificidade de 100%.

Em medicina humana, já se recorre à utilização da quantificação de bactérias intracelulares em citologias de LBA, coradas através de coloração Gram, de maneira a obter um diagnóstico precoce de infeção respiratória (Chastre et al. 1989), já que os resultados finais das culturas podem demorar 24-48h e, portanto, não podem ajudar a orientar a terapêutica inicial (Peeters et al. 2000). No ano 2000, Peeters et al. observaram que uma contagem superior a duas bactérias intracelulares, por cada 50 campos analisados, em citologias coradas através de coloração Gram, eram diagnósticas de infeção do trato respiratório inferior com uma sensibilidade de 71% e uma especificidade de 97%. Estes autores observaram também uma alta correlação entre a morfologia bacteriana observada nas citologias com os resultados das culturas bacterianas, determinando que, quando combinado com avaliação morfológica, a observação e quantificação de bactérias intracelulares na citologia de LBA é útil no desenvolvimento de uma estratégia terapêutica inicial, permitindo um tratamento específico para o agente em causa.

Após estabelecimento do diagnóstico, foi iniciada a terapêutica. A antibioterapia deve, sempre que possível, ser guiada pela realização de cultura e TSA (Lappin et al. 2017). Neste caso, o estado clínico da cadela não estava estável o suficiente para se aguardar pelos

resultados da cultura e TSA pelo que se decidiu continuar a antibioterapia iniciada pelos médicos veterinários que a observaram pela primeira vez (enrofloxacina) de modo a prevenir o aparecimento de resistências. Apesar de não ser indicado, como não se obteve melhoria clínica com esta terapêutica, iniciou-se uma monoterapia com trimetoprim-sulfadoxina. Quando se obteve o resultado da cultura e se teve conhecimento de que a infeção era causada por uma *B. bronchiseptica*, foram seguidas as recomendações de Lappin et al. (2017), tendo sido iniciada a terapia com doxiciclina, associada a gentamicina, escolha apoiada nos resultados do TSA.

Apesar da antibioterapia realizada inicialmente, previamente a ser conhecido o agente bacteriano em causa, não ter sido a aconselhada pelas diretrizes existentes, a maioria dos antibióticos utilizados está indicada no tratamento de infeções respiratórias (Lappin et al. 2017).

Uma vez que, mesmo com terapia apoiada nos resultados dos TSAs, o quadro clínico da cadela não apresentava melhorias significativas começou a ponderar-se a administração por uma via que permitisse uma ação mais local do antibiótico e, por isso, iniciou-se a administração de gentamicina por via aerógena através de nebulização.

Nas últimas décadas, tem vindo a ser estudada a utilidade terapêutica da administração de antibióticos por via inalatória como alternativa a considerar no tratamento de doenças do trato respiratório inferior de várias espécies, incluindo o Homem, equinos e canídeos (McKenzie III and Murray 2000; McKenzie III and Murray 2004; Boisson et al. 2018; Canonne et al. 2020). Esta via de administração tem a vantagem de permitir a obtenção de concentrações de antibiótico mais elevadas no local da infeção, facilitando a ação local dos mesmos e evitando efeitos secundários adversos (Labiris and Dolovich 2003; Conway et al. 2013; Boisson et al. 2018).

Particularmente em relação à gentamicina, antibiótico pertencente ao grupo dos aminoglicosídeos, esta demonstra vantagem pois não atravessa membranas celulares facilmente, uma vez que se trata de uma molécula altamente hidrofílica e policationica, a pH fisiológico (Rottbøll and Friis 2016; Boisson et al. 2018), permitindo que a sua ação a nível pulmonar seja mais longa e que a sua absorção e consequente biodisponibilidade sistémica sejam mínimas (Boisson et al. 2018).

Boisson et al. (2018) observaram que a concentração de gentamicina no fluido de revestimento do epitélio pulmonar (reveste o epitélio respiratório, protegendo a mucosa aérea de substâncias irritantes e agentes patogénicos, melhorando a *clearance* mucociliar) era cerca de 300 vezes superior quando este antibiótico era administrado por via aerógena através de nebulização do que quando era administrado por via endovenosa. Esta observação pode explicar a resposta obtida quando, neste caso clínico, se mudou a via de administração da

gentamicina de sistémica (via endovenosa) para local (nebulização), quando com administração sistémica não se estava a obter uma evolução positiva.

Apesar da utilização desta via de administração ser bastante usada na prática clínica, não existe um protocolo terapêutico definido sobre a dosagem e o tempo de nebulização a realizar. Em 2020, Canonne et al. publicaram um artigo no qual comparavam dois protocolos de administração de gentamicina por via aerógena, através de nebulização. O primeiro protocolo consistia na administração de 4 mg/kg de gentamicina, duas vezes ao dia, diluída em NaCl de modo a obter 5 mL de solução a ser nebulizada, até a cúpula estar vazia enquanto que o segundo protocolo consistia na administração de 2-4 mL de gentamicina a 5%, não diluída, nebulizada pelo menos durante dez minutos, duas vezes ao dia, independentemente do tamanho do cão. Canonne et al. (2020) concluíram que o segundo protocolo apresentava melhores resultados, ao observarem que os cães eram mais frequentemente tratados em três a quatro semanas e com uma menor duração média de tratamento. O protocolo utilizado no caso clínico estudado nesta dissertação utilizou uma dose de gentamicina ligeiramente superior (4.4 mg/kg) à utilizada no protocolo 1 de Canonne et al. (2020), diluída numa menor quantidade de NaCl (0.5 mL), sendo administrada durante pelo menos 10 minutos, três vezes ao dia. Embora se tenha administrado uma dose ligeiramente superior (4.4 mg/kg) e uma maior frequência de administração (TID), a cura clínica da cadela em estudo nesta dissertação só foi alcançada três meses depois do início deste protocolo, ultrapassando qualquer intervalo de tempo obtido por Canonne et al. (2020), com qualquer um dos seus protocolos (obtiveram um máximo de 2 meses). Deste modo, o protocolo estudado nesta dissertação parece ser menos eficaz do que ambos os protocolos utilizados por Canonne et al. (2020).

O caso estudado nesta dissertação partilha muitas características com os casos estudados por Canonne et al. (2020), permitindo uma comparação entre ambos. Primeiro, a raça CKCS foi uma das predominantes no estudo destes autores; segundo, a maior parte dos cães apresentava história de tosse crónica (mais de duas semanas); terceiro, todos os cães incluídos tinham recebido antibioterapia sistémica prévia, sem se ter obtido sucesso no tratamento. Assim, ao analisar o presente estudo em associação com o estudo de Canonne et al. (2020), pode concluir-se que a administração de gentamicina por via aerógena no tratamento da doença do trato respiratório inferior em cães, refratária a antibioterapia sistémica, parece ser uma alternativa viável e que possui uma boa eficácia.

Tal como descrito e recomendado na literatura (McKenzie III and Murray 2004; Cohn 2010), o tratamento local com nebulização foi coadjuvado com terapia sistémica concomitante. Recorreu-se à administração de doxiciclina uma vez que, segundo o primeiro TSA realizado (Anexo 7), esta bactéria era sensível a tetraciclina e também porque este é o antibiótico aconselhado pelas diretrizes (Lappin et al. 2017). No entanto, apesar do quadro clínico ter apresentado algumas melhorias, ainda se observava crescimento de *Bordetella* na

cultura de controlo. Como não havia nada que explicasse a fraca melhoria clínica, foi realizado um TSA que incluísse especificamente doxiciclina e macrólidos (Anexo 8) onde se observou que esta bactéria era resistente à doxiciclina, explicando esta fraca evolução, e tinha sensibilidade intermédia a eritromicina. A realização de TSA para macrólidos deveu-se a se saber que, em medicina humana, a tosse convulsa em crianças, causada por *B. pertussis*, é tratada com recurso a azitromicina (Altunaiji et al. 2007) e, portanto, poderia ser uma opção terapêutica a ponderar utilizar neste caso, apesar de se tratar de um antibiótico de uso humano. Além disso, a decisão de recorrer à administração de azitromicina em vez de eritromicina teve como base o fato de o primeiro antibiótico apresentar menos efeitos secundários e permitir uma melhor tolerância e, conseqüentemente, melhor *compliance* do que o segundo (Hopkins 1991; Rubinstein 2001; Larson et al. 2010) e também pela idade da cadela e carácter refratário da terapêutica em curso. Tratou-se de uma decisão terapêutica tendo em conta a relação afetiva estreita dos tutores com a sua cadela, e assim, sob decisão e responsabilidade do médico veterinário assistente, permissível ainda pela legislação do medicamento (cascata do medicamento) em vigor na União Europeia.

O *score* clínico é uma ferramenta interessante para utilizar na comparação da evolução do quadro clínico do animal e das características radiográficas observadas com o tratamento realizado. Neste caso, ao analisar a Tabela 6, não é perceptível que a alteração da via de administração da gentamicina para nebulização (a 28/1/2019) tenha provocado uma melhoria significativa no quadro geral do animal. No entanto, ao analisar a Tabela 2 e 4 individualmente, observa-se que existiram melhorias ligeiras na imagem radiográfica e no quadro clínico entre os dias 25/1/2019 e 5/2/2019. Assim, apesar de interessante, o *score* clínico é uma metodologia algo subjetiva e que deve ser utilizada com cuidado.

A utilização de cinesioterapia respiratória através de *coupage*, batidas suaves e firmes no tórax com as mãos em concha, associada à administração de antibiótico por nebulização, tem o benefício de ajudar na libertação e eliminação das secreções retidas nas vias aéreas inferiores pela tosse (McCool and Rosen 2006), permitindo, deste modo, uma melhor absorção local do antibiótico. Uma vez que a *B. bronchiseptica* possui fatores de virulência que promovem a perda do movimento do aparelho mucociliar (Reagan and Sykes 2020), esta técnica deve ser realizada em conjunto com a antibioterapia.

No desenvolvimento deste trabalho existiram algumas limitações, tendo uma das principais sido a inexistência de critérios clínicos de suscetibilidade da *B. bronchiseptica* aos antibióticos no tratamento de infeções em cães (CLSI 2018). Em 2012, Magiorakos et al. propuseram definições para multirresistência (MDR), resistência extensa (XDR) ou pan-resistência (PDR), relativamente às diferentes categorias de compostos antimicrobianos (por exemplo, aminoglicosídeos, carbapenemos, cefalosporinas, fluoroquinolonas, penicilinas e inibidores da β -lactamase). Assim, MDR define bactérias não suscetíveis a pelo menos um

composto em três ou mais categorias antimicrobianas, XDR define bactérias não suscetíveis a pelo menos um composto em todas, exceto duas ou menos categorias antimicrobianas e PDR define bactérias não suscetíveis a nenhum composto de nenhuma categoria antimicrobiana (Magiorakos et al. 2012).

Com base nesta classificação, e tendo em conta os resultados dos TSA realizados neste caso clínico, poderia propor-se a classificação da *B. bronchiseptica* isolada como MDR, uma vez que este micro-organismo não era suscetível a pelo menos um fármaco de seis categorias de fármacos testados. Esta observação vai de encontro ao que é descrito na literatura, uma vez que, segundo Reagan et al. (2020), tem sido reconhecido um aumento da resistência aos antibióticos nos isolados de *Bordetella*. Neste caso, no entanto, esta será apenas uma classificação putativa, devido à utilização de critérios clínicos de suscetibilidade de origem humana, como referido anteriormente (EUCAST). No caso particular da azitromicina, após leitura dos TSA executados, a classificação como suscetível ou resistente foi realizada por extrapolação, ou seja, para os discos de antibiótico nos quais o halo apresentava um diâmetro maior que 26 mm, a bactéria foi considerada como sendo suscetível.

Apesar das diretrizes indicarem a administração empírica de doxiciclina para o tratamento de infeções do trato respiratório inferior, causadas pela *B. bronchiseptica* (Lappin et al. 2017), o seu uso ainda é alvo de alguma discordância devido à inexistência de critérios clínicos de classificação para este antibiótico. O crescente interesse na administração de gentamicina por via aerógena, através de nebulizações, deve-se a esta via permitir uma menor biodisponibilidade sistémica e conseqüente minimização dos efeitos secundários deste composto. O fato da antibioterapia por via aerógena ter sido essencial na recuperação da cadela em estudo reforça a utilidade desta via de administração no tratamento da infeção do trato respiratório inferior em cães, em situações semelhantes ao caso aqui apresentado, apoiando também os resultados obtidos por Canonne et al. (2020).

10. Conclusão

O estudo do caso clínico aqui apresentado reforça a importância da determinação de um possível protocolo terapêutico mais eficaz para o tratamento de infecções respiratórias em cães causadas pela *B. bronchiseptica*, particularmente em casos de multirresistência, usando a administração de gentamicina por via aerógena, através de nebulização, associada a cinesioterapia respiratória.

Foi possível observar que esta via de administração foi essencial para o sucesso do tratamento já que, quando iniciada, a cadela demonstrou melhorias significativas que não estavam a ser obtidas apenas com a terapêutica sistêmica. Apesar da maior duração de tratamento necessária para alcançar a cura clínica, este trabalho vem reforçar as conclusões de Canonne et al. (2020), apoiando a hipótese de que a administração de gentamicina por nebulização, associada a terapia sistêmica, traz benefício clínico a cães infectados por *B. bronchiseptica* que não respondem com monoterapia sistêmica.

A realização sistemática de cultura e TSA aquando de uma suspeita de infecção bacteriana pode ser crucial na diminuição do aparecimento de bactérias multirresistentes uma vez que o tratamento será sempre realizado de forma mais direcionada à sensibilidade do agente em questão.

Desta forma, o trabalho aqui apresentado é também importante para a consciencialização de que o uso discriminado e consciente de antibióticos é essencial para que se obtenha uma resolução clínica mais eficaz e rápida, com menos sofrimento dos pacientes.

11. Trabalho Futuro

O trabalho aqui apresentado é preliminar e necessita de estudos futuros. Seria interessante realizar um estudo mais alargado, que incluía mais casos de cães com infecções respiratórias por *B. bronchiseptica* e observar se o início precoce de gentamicina por nebulização resulta numa evolução do quadro clínico mais rápida. Além disso, uma vez que a problemática da resistência aos antibióticos tem vindo a preocupar cada vez mais, e visto que *B. bronchiseptica* é uma bactéria zoonótica, seria também interessante estudar se esta bactéria tem vindo a ganhar resistências.

O estudo deste trabalho levanta ainda a necessidade de executar estudos microbiológicos que vão de encontro ao estabelecimento de critérios clínicos de suscetibilidade para antibióticos usados no tratamento de infecções por *B. bronchiseptica* no cão e gato, principalmente para a doxiciclina, já que este é o antibiótico, de uso veterinário, de primeira escolha nestas infecções. A classificação correta é muito importante de modo a prevenir o aparecimento de mais resistências.

Bibliografia

- Akerley BJ, Monack DM, Falkow S, Miller JF. 1992. The *bvgAS* Locus Negatively Controls Motility and Synthesis of Flagella in *Bordetella bronchiseptica*. *J Bacteriol.* 174(3):980–990. doi:10.1128/JB.174.3.980-990.1992.
- Altunajji SM, Kukuruzovic RH, Curtis NC, Massie J. 2007. Antibiotics for whooping cough (pertussis). *Cochrane Database Syst Rev.*(3). doi:10.1002/14651858.CD004404.pub3.
- Beier D, Gross R. 2008. The BvgS/BvgA Phosphorelay System of Pathogenic *Bordetellae*. In: Utsumi R, editor. *Bacterial Signal Transduction: Networks and Drug Targets*. Vol. 631. New York, NY: Springer New York. p. 149–160.
- Boisson M, Mimoz O, Hadzic M, Marchand S, Adier C, Couet W, Grégoire N. 2018. Pharmacokinetics of intravenous and nebulized gentamicin in critically ill patients. *J Antimicrob Chemother.* 73(10):2830–2837. doi:10.1093/jac/dky239.
- Brockmeier SL, Register KB, Nicholson TL, Loving CL. 2019. Bordetellosis. In: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, editors. *Diseases of Swine*. 10th ed. Wiley. p. 767–777.
- Buboltz AM, Nicholson TL, Weyrich LS, Harvill ET. 2009. Role of the Type III Secretion System in a Hypervirulent Lineage of *Bordetella bronchiseptica*. *Infect Immun.* 77(9):3969–3977. doi:10.1128/IAI.01362-08.
- Buonavoglia C, Martella V. 2007. Canine respiratory viruses. *Vet Res.* 38(2):355–373. doi:10.1051/vetres:2006058.
- Canonne AM, Billen F, Tual C, Ramery E, Roels E, Peters I, Clercx C. 2016. Quantitative PCR and Cytology of Bronchoalveolar Lavage Fluid in Dogs with *Bordetella bronchiseptica* Infection. *J Vet Intern Med.* 30(4):1204–1209. doi:10.1111/jvim.14366.
- Canonne AM, Roels E, Menard M, Desquilbet L, Billen F, Clercx C. 2020. Clinical response to 2 protocols of aerosolized gentamicin in 46 dogs with *Bordetella bronchiseptica* infection (2012-2018). *J Vet Intern Med.* 34(5):2078–2085. doi:10.1111/jvim.15843.
- Carter GR, Wise DJ. 2005. Paramyxoviridae. *Concise Rev Vet Virol.* [accessed 2020 May 10]. <https://www.ivis.org/library/concise-review-of-veterinary-virology/paramyxoviridae-0>.
- Castleman WL, Powe JR, Crawford PC, Gibbs EPJ, Dubovi EJ, Donis RO, Hanshaw D. 2010. Canine H3N8 Influenza Virus Infection in Dogs and Mice. *Vet Pathol.* 47(3):507–517. doi:10.1177/0300985810363718.
- Cattelan N, Dubey P, Arnal L, Yantorno OM, Deora R. 2016. *Bordetella* biofilms: A lifestyle leading to persistent infections. *FEMS Pathog Dis.* 74(1):1–8. doi:10.1093/femspd/ftv108.
- Chalker VJ, Brooks HW, Brownlie J. 2003. The association of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* with canine infectious respiratory disease. *Vet Microbiol.* 95:149–156. doi:10.1016/S0378-1135(03)00155-X.
- Chalker VJ, Owen WMA, Paterson C, Barker E, Brooks H, Rycroft AN, Brownlie J. 2004. Mycoplasmas associated with canine infectious respiratory disease. *Microbiology.* 150(10):3491–3497. doi:10.1099/mic.0.26848-0.

- Chalker VJ, Toomey C, Opperman S, Brooks HW, Ibuoye MA, Brownlie J, Rycroft AN. 2003. Respiratory Disease in Kennelled Dogs: Serological Responses to *Bordetella bronchiseptica* Lipopolysaccharide Do Not Correlate with Bacterial Isolation or Clinical Respiratory Symptoms. *Clin Diagnostic Lab Immunol.* 10(3):352–356. doi:10.1128/CDLI.10.3.352-356.2003.
- Chandler JC, Lappin MR. 2002. Mycoplasmal Respiratory Infections in Small Animals: 17 Cases (1988–1999). *J Am Anim Hosp Assoc.* 38(2):111–119. doi:10.5326/0380111.
- Chapman PS, Boag AK, Guitian J, Boswood A. 2004. *Angiostrongylus vasorum* infection in 23 dogs (1999–2002). *J Small Anim Pract.* 45(9):435–440. doi:10.1111/j.1748-5827.2004.tb00261.x.
- Chastre J, Fagon JY, Soler P, Domart Y, Pierre J, Dombret MC, Gibert C, Hance AJ. 1989. Quantification of BAL Cells Containing Intracellular Bacteria Rapidly Identifies Ventilated Patients with Nosocomial Pneumonia. *Chest.* 95(3):190S-192S. doi:10.1378/chest.95.3_Supplement.190S.
- CLSI. 2018. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals. 4th ed. CLSI supplement VET08. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cohn LA. 2010. Inhalant drug therapy (Proceedings). [accessed 2020 Oct 26]. <https://www.dvm360.com/view/inhalant-drug-therapy-proceedings>.
- Confer DL, Eaton JW. 1982. Phagocyte Impotence Caused by an Invasive Bacterial Adenylate Cyclase. *Science (80-).* 217(4563):948–950. doi:10.1126/science.6287574.
- Conway H, Dix KJ, McDonald JD, Miller RA, Wall HG, Wolff RK, Reed MD. 2013. Comparison of inhalation toxicity studies of gentamicin in rats and dogs. *Inhal Toxicol.* 25(13):714–724. doi:10.3109/08958378.2013.843043.
- Cookson BT, Cho HL, Herwaldt LA, Goldman WE. 1989. Biological Activities and Chemical Composition of Purified Tracheal Cytotoxin of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun.* 57(7):2223–2229. doi:10.1128/iai.57.7.2223-2229.1989.
- Cookson BT, Vandamme P, Carlson LC, Larson AM, Sheffield JVL, Kersters K, Spach DH. 1994. Bacteremia Caused by a Novel *Bordetella* Species, “*B. hinzii*.” *J Clin Microbiol.* 32(10):2569–2571. doi:10.1128/jcm.32.10.2569-2571.1994.
- Coote JG. 1992. Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 88(2):137–161. doi:10.1016/0378-1097(92)90688-K.
- Cotter PA, Miller JF. 1994. BvgAS-Mediated Signal Transduction: Analysis of Phase-Locked Regulatory Mutants of *Bordetella bronchiseptica* in a Rabbit Model. *Infect Immun.* 62(8):3381–3390. doi:10.1128/iai.62.8.3381-3390.1994.
- Cotter PA, Miller JF. 1997. A mutation in the *Bordetella bronchiseptica* *bvgS* gene results in reduced virulence and increased resistance to starvation, and identifies a new class of Bvg-regulated antigens. *Mol Microbiol.* 24(4):671–685. doi:10.1046/j.1365-2958.1997.3821741.x.
- Cotter PA, Yuk MH, Mattoo S, Akerley BJ, Boschwitz J, Relman DA, Miller JF. 1998. Filamentous Hemagglutinin of *Bordetella bronchiseptica* Is Required for Efficient

- Establishment of Tracheal Colonization. *Infect Immun.* 66(12):5921–5929. doi:10.1128/iai.66.12.5921-5929.1998.
- Coutte L, Antoine R, Drobecq H, Loch C, Jacob-Dubuisson F. 2001. Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. *EMBO J.* 20(18):5040–5048. doi:10.1093/emboj/20.18.5040.
- Crawford PC, Dubovi EJ, Castleman WL, Stephenson I, Gibbs EPJ, Chen L, Smith C, Hill RC, Ferro P, Pompey J, et al. 2005. Transmission of Equine Influenza Virus to Dogs. *Science* (80-). 310(5747):482–485. doi:10.1126/science.1117950.
- Day MJ, Carey S, Clercx C, Kohn B, Marsillo F, Thiry E, Freyburger L, Schulz B, Walker DJ. 2020. Aetiology of Canine Infectious Respiratory Disease Complex and Prevalence of its Pathogens in Europe. *J Comp Pathol.* 176:86–108. doi:10.1016/j.jcpa.2020.02.005.
- Dear JD. 2020. Bacterial Pneumonia in Dogs and Cats: An Update. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract.* 50(2):447–465. doi:10.1016/j.cvsm.2019.10.007.
- Diavatopoulos DA, Cummings CA, Schouls LM, Brinig MM, Relman DA, Mooi FR. 2005. *Bordetella pertussis*, the Causative Agent of Whooping Cough, Evolved from a Distinct, Human-Associated Lineage of *B. bronchiseptica*. *PLoS Pathog.* 1(4):0373–0383. doi:10.1371/journal.ppat.0010045.
- Ditchfield J, Macpherson LW, Zbitnew A. 1962. Association of Canine Adenovirus (Toronto A 26/61) with an Outbreak of Laryngotracheitis (“Kennel Cough”): A Preliminary Report. *Can Vet J.* 3(8):238–23847.
- Ericsson AC, Personett AR, Grobman ME, Rindt H, Reinero CR. 2016. Composition and Predicted Metabolic Capacity of Upper and Lower Airway Microbiota of Healthy Dogs in Relation to the Fecal Microbiota. Wilson BA, editor. *PLoS One.* 11(5):e0154646. doi:10.1371/journal.pone.0154646.
- Erles K, Brownlie J. 2008. Canine Respiratory Coronavirus: An Emerging Pathogen in the Canine Infectious Respiratory Disease Complex. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract.* 38(4):815–825. doi:10.1016/j.cvsm.2008.02.008.
- Erles K, Toomey C, Brooks HW, Brownlie J. 2003. Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease. *Virology.* 310(2):216–223. doi:10.1016/S0042-6822(03)00160-0.
- EUCAST. Antimicrobial wild type distributions of microorganisms. [accessed 2020 May 20]. <https://mic.eucast.org/Eucast2/SearchController/search.jsp?action=performSearch&BginIndex=0&Micdif=mic&NumberIndex=50&Antib=-1&Specium=791>.
- Evans DG, Maitland HB. 1939. The toxin of *Br. bronchiseptica* and the relationship of this organism to *H. pertussis*. *J Pathol Bacteriol.* 48(1):67–78. doi:10.1002/path.1700480109.
- Fastrès A, Canonne MA, Taminiau B, Billen F, Garigliany M-M, Daube G, Clercx C. 2020. Analysis of the lung microbiota in dogs with *Bordetella bronchiseptica* infection and correlation with culture and quantitative polymerase chain reaction. *Vet Res.* 51(1):46. doi:10.1186/s13567-020-00769-x.
- Ferry NS. 1911. Etiology of Canine Distemper. *J Infect Dis.* 8(4):399–420. doi:10.1093/clinids/10.Supplement_2.17.

- Ferry NS. 1912. *Bacillus bronchisepticus* (bronchicanis) : The Cause of Distemper in Dogs and a Similar Disease in other Animals. *Vet J.* 68(7):376–391. doi:10.1016/s0372-5545(17)66038-3.
- Flak TA, Goldman WE. 1996. Autotoxicity of Nitric Oxide in Airway Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 154(4_pt_2):S202–S206. doi:10.1164/ajrccm/154.4_Pt_2.S202.
- Flak TA, Goldman WE. 1999. Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis. *Cell Microbiol.* 1(1):51–60. doi:10.1046/j.1462-5822.1999.00004.x.
- Flak TA, Heiss LN, Engle JT, Goldman WE. 2000. Synergistic Epithelial Responses to Endotoxin and a Naturally Occurring Muramyl Peptide. Burns DL, editor. *Infect Immun.* 68(3):1235–1242. doi:10.1128/IAI.68.3.1235-1242.2000.
- Ford RC. 2012. Canine Infectious Respiratory Disease. In: Greene CE, editor. *Infectious Diseases of the Dog and Cat.* 4th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Inc. p. 55–65.
- Francis MS, Schesser K, Forsberg Å, Wolf-Watz H. 2004. Type III Secretion Systems in Animal- and Plant-Interacting Bacteria. In: Cossart P, Boquet P, Normark S, Rappuoli R, editors. *Cellular Microbiology, Second Edition.* 2nd ed. Washington, DC: American Society of Microbiology. p. 361–392.
- Gallego C, Middleton AM, Martínez N, Romero S, Iregui C. 2013. Interaction of *Bordetella bronchiseptica* and Its Lipopolysaccharide with In Vitro Culture of Respiratory Nasal Epithelium. *Vet Med Int.* 2013:1–9. doi:10.1155/2013/347086.
- Gerlach G, von Wintzingerode F, Middendorf B, Gross R. 2001. Evolutionary trends in the genus *Bordetella*. *Microbes Infect.* 3(1):61–72. doi:10.1016/S1286-4579(00)01353-8.
- Goodnow RA. 1980. Biology of *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol Rev.* 44(4):722–738. doi:10.1128/MMBR.44.4.722-738.1980.
- Gough A, Thomas A, O'Neill D. 2018. *Breed Predispositions to Disease in Dogs and Cats.* 3rd ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Greene CE. 2012. Canine Herpesvirus Infection. In: Greene CE, editor. *Infectious Diseases of the Dog and Cat.* 4th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Inc. p. 48–54.
- Greene CE, Prescott JF. 2012. Gram-Positive Bacterial Infections. In: Greene CE, editor. *Infectious Diseases of the Dog and Cat.* 4th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Inc. p. 325–333.
- Guetter SD, Eiteman MA. 2014. Production of biomass and filamentous hemagglutinin by *Bordetella bronchiseptica*. *Bioprocess Biosyst Eng.* 37:115–123. doi:10.1007/s00449-013-0977-4.
- Heiss LN, Moser SA, Unanue ER, Goldman WE. 1993. Interleukin-1 is Linked to the Respiratory Epithelial Cytopathology of Pertussis. *Infect Immun.* 61(8):3123–3128. doi:10.1128/IAI.61.8.3123-3128.1993.
- Henderson IR, Nataro JP. 2001. Virulence Functions of Autotransporter Proteins. *Infect Immun.* 69(3):1231–1243. doi:10.1128/IAI.69.3.1231.
- Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC, Ala'Aldeen D. 2004. Type V Protein Secretion Pathway: the Autotransporter Story. *Microbiol Mol Biol Rev.*

- 68(4):692–744. doi:10.1128/MMBR.68.4.692-744.2004.
- Henderson IR, Navarro-Garcia F, Nataro JP. 1998. The great escape: Structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol.* 6(9):370–378. doi:10.1016/S0966-842X(98)01318-3.
- Henderson MW, Inatsuka CS, Sheets AJ, Williams CL, Benaron DJ, Donato GM, Gray MC, Hewlett EL, Cotter PA. 2012. Contribution of Bordetella Filamentous Hemagglutinin and Adenylate Cyclase Toxin to Suppression and Evasion of Interleukin-17-Mediated Inflammation. *Infect Immun.* 80(6):2061–2075. doi:10.1128/IAI.00148-12.
- Hopkins S. 1991. Clinical toleration and safety of azithromycin. *Am J Med.* 91(3):S40–S45. doi:10.1016/0002-9343(91)90401-I.
- Horiguchi Y, Nakai T, Kume K. 1989. Purification and characterization of Bordetella bronchiseptica dermonecrotic toxin. *Microb Pathog.* 6(5):361–368. doi:10.1016/0882-4010(89)90078-8.
- Horiguchi Y, Nakai T, Kume K. 1991. Effects of Bordetella bronchiseptica Dermonecrotic Toxin on the Structure and Function of Osteoblastic Clone MC3T3-E1 Cells. *Infect Immun.* 59(3):1112–1116. doi:10.1128/iai.59.3.1112-1116.1991.
- Horiguchi Y, Senda T, Sugimoto N, Katahira J, Matsuda M. 1995. Bordetella bronchiseptica dermonecrotizing toxin stimulates assembly of actin stress fibers and focal adhesions by modifying the small GTP-binding protein rho. *J Cell Sci.* 108:3243–3251.
- Horiguchi Y, Sugimoto N, Matsuda M. 1993. Stimulation of DNA Synthesis in Osteoblast-Like MC3T3-E1 Cells by Bordetella bronchiseptica Dermonecrotic Toxin. *Infect Immun.* 61(9):3611–3615. doi:10.1128/IAI.61.9.3611-3615.1993.
- Horiguchi Y, Sugimoto N, Matsuda M. 1994. Bordetella bronchiseptica dermonecrotizing toxin stimulates protein synthesis in an osteoblastic clone, MC3T3-E1 cells. *FEMS Microbiol Lett.* 120:19–22. doi:10.1111/j.1574-6968.1994.tb07001.x.
- Iida T, Okogoni T. 1971. Lethality of Bordetella pertussis in Mice. *J Med Microbiol.* 4(1):51–61.
- Inatsuka CS, Julio SM, Cotter PA. 2005. Bordetella filamentous hemagglutinin plays a critical role in immunomodulation, suggesting a mechanism for host specificity. *Proc Natl Acad Sci.* 102(51):18578–18583. doi:10.1073/pnas.0507910102.
- Inatsuka CS, Xu Q, Vujkovic-Cvijin I, Wong S, Stibitz S, Miller JF, Cotter PA. 2010. Pertactin is Required for Bordetella Species to Resist Neutrophil-Mediated Clearance. *Infect Immun.* 78(7):2901–2909. doi:10.1128/IAI.00188-10.
- Irie Y, Mattoo S, Yuk MH. 2004. The Bvg Virulence Control System Regulates Biofilm Formation in Bordetella bronchiseptica. *J Bacteriol.* 186(17):5692–5698. doi:10.1128/JB.186.17.5692-5698.2004.
- Jacob-Dubuisson F, Kehoe B, Willery E, Reveneau N, Locht C, Relman DA. 2000. Molecular characterization of Bordetella bronchiseptica filamentous haemagglutinin and its secretion machinery. *Microbiology.* 146:1211–1221. doi:10.1099/00221287-146-5-1211.
- Jambhekar A, Robin E, Le Boedec K. 2019. A systematic review and meta-analyses of the

- association between 4 mycoplasma species and lower respiratory tract disease in dogs. *J Vet Intern Med.* 33(5):1880–1891. doi:10.1111/jvim.15568.
- Joffe DJ, Lelewski R, Weese JS, McGill-Worsley J, Shankel C, Mendonca S, Sager T, Smith M, Poljak Z. 2016. Factors associated with development of Canine Infectious Respiratory Disease Complex (CIRDC) in dogs in 5 Canadian small animal clinics. *Can Vet J.* 57(1):46–51.
- Kadlec K, Schwarz S. 2018. Antimicrobial Resistance in *Bordetella bronchiseptica*. *Microbiol Spectr.* 6(4):365–375. doi:10.1128/microbiolspec.ARBA-0024-2017.
- Kattar MM, Chavez JF, Limaye AP, Rassouljian-Barrett SL, Yarfitz SL, Carlson LC, Houze Y, Swanzy S, Wood BL, Cookson BT. 2000. Application of 16S rRNA Gene Sequencing to Identify *Bordetella hinzii* as the Causative Agent of Fatal Septicemia. *J Clin Microbiol.* 38(2):789–794. doi:10.1128/jcm.38.2.789-794.2000.
- Kumar S, Driskell EA, Cooley AJ, Jia K, Blackmon S, Wan X-F, Uhl EW, Saliki JT, Sanchez S, Krimer PM, et al. 2015. Fatal Canid Herpesvirus 1 Respiratory Infections in 4 Clinically Healthy Adult Dogs. *Vet Pathol.* 52(4):681–687. doi:10.1177/0300985814556190.
- Kuwaie A, Matsuzawa T, Ishikawa N, Abe H, Nonaka T, Fukuda H, Imajoh-Ohmi S, Abe A. 2006. BopC is a Novel Type III Effector Secreted by *Bordetella bronchiseptica* and Has a Critical Role in Type III-dependent Necrotic Cell Death. *J Biol Chem.* 281(10):6589–6600. doi:10.1074/jbc.M512711200.
- Kuwaie A, Momose F, Nagamatsu K, Suyama Y, Abe A. 2016. BteA Secreted from the *Bordetella bronchiseptica* Type III Secretion System Induces Necrosis through an Actin Cytoskeleton Signaling Pathway and Inhibits Phagocytosis by Macrophages. Frischknecht F, editor. *PLoS One.* 11(2):e0148387. doi:10.1371/journal.pone.0148387.
- Kuwaie A, Ohishi M, Watanabe M, Nagai M, Abe A. 2003. BopB is a type III secreted protein in *Bordetella bronchiseptica* and is required for cytotoxicity against cultured mammalian cells. *Cell Microbiol.* 5(12):973–983. doi:10.1046/j.1462-5822.2003.00341.x.
- Labiris NR, Dolovich MB. 2003. Pulmonary drug delivery. Part I: Physiological factors affecting therapeutic effectiveness of aerosolized medications. *Br J Clin Pharmacol.* 56(6):588–599. doi:10.1046/j.1365-2125.2003.01892.x.
- Lappin MR, Blondeau J, Boothe D, Breitschwerdt EB, Guardabassi L, Lloyd DH, Papich MG, Rankin SC, Sykes JE, Turnidge J, et al. 2017. Antimicrobial use Guidelines for Treatment of Respiratory Tract Disease in Dogs and Cats: Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases. *J Vet Intern Med.* 31(2):279–294. doi:10.1111/jvim.14627.
- Larson JM, Tavakkoli A, Drane WE, Toskes PP, Moshiree B. 2010. Advantages of Azithromycin Over Erythromycin in Improving the Gastric Emptying Half-Time in Adult Patients With Gastroparesis. *J Neurogastroenterol Motil.* 16(4):407–413. doi:10.5056/jnm.2010.16.4.407.
- Larson LJ, Henningson J, Sharp P, Thiel B, Deshpande MS, Davis T, Jayappa H, Wasmoen T, Lakshmanan N, Schultz RD. 2011. Efficacy of the Canine Influenza Virus H3N8 Vaccine To Decrease Severity of Clinical Disease after Cochallenge with Canine Influenza Virus and *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Clin Vaccine Immunol.* 18(4):559–564. doi:10.1128/CVI.00500-10.

- Lartigue MF, Poirel L, Fortineau N, Nordmann P. 2005. Chromosome-Borne Class A BOR-1 β -Lactamase of *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 49(6):2565–2567. doi:10.1128/AAC.49.6.2565–2567.2005.
- Lee-Fowler T, Reiner C. 2012. Bacterial Respiratory Infections. In: Greene CE, editor. *Infectious Diseases of the Dog and Cat*. 4th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Inc. p. 936–950.
- López A, Martinson SA. 2017. Respiratory System, Mediastinum and Pleurae. In: Zachary JF, editor. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. 6th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Inc. p. 471–560.
- MacLachlan NJ, Dubovi EJ. 2017. Paramyxoviridae and Pneumoviridae. In: MacLachlan NJ, Dubovi EJ, editors. *Fenner's Veterinary Virology*. 5th ed. Elsevier. p. 327–356. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128009468000179>.
- Maddison JE, Watson ADJ, Elliott J. 2008. Antibacterial drugs. In: Madison JE, Page SW, Church DB, editors. *Small Animal Clinical Pharmacology*. 2nd ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Inc. p. 148–185.
- Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, et al. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 18(3):268–281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
- Mattoo S, Cherry JD. 2005. Molecular Pathogenesis, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Respiratory Infections Due to *Bordetella pertussis* and Other *Bordetella* Subspecies. *Clin Microbiol Rev.* 18(2):326–382. doi:10.1128/CMR.18.2.326–382.2005.
- Mattoo S, Foreman-Wykert AK, Cotter PA, Miller JF. 2001. Mechanisms of *Bordetella* Pathogenesis. *Front Biosci.* 6(1):e168–e186. doi:10.2741/Mattoo.
- Mattoo S, Miller JF, Cotter PA. 2000. Role of *Bordetella bronchiseptica* Fimbriae in Tracheal Colonization and Development of a Humoral Immune Response. Burns DL, editor. *Infect Immun.* 68(4):2024–2033. doi:10.1128/IAI.68.4.2024-2033.2000.
- Mazar J, Cotter PA. 2006. Topology and maturation of filamentous haemagglutinin suggest a new model for two-partner secretion. *Mol Microbiol.* 62(3):641–654. doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05392.x.
- McCool FD, Rosen MJ. 2006. Nonpharmacologic Airway Clearance Therapies. *Chest.* 129(1):250S-259S. doi:10.1378/chest.129.1_suppl.250S.
- McKenzie III HC, Murray MJ. 2000. Concentrations of gentamicin in serum and bronchial lavage fluid after intravenous and aerosol administration of gentamicin to horses. *Am J Vet Res.* 61(10):1185–1190. doi:10.2460/ajvr.2000.61.1185.
- McKenzie III HC, Murray MJ. 2004. Concentrations of gentamicin in serum and bronchial lavage fluid after once-daily aerosol administration to horses for seven days. *Am J Vet Res.* 65(2):173–178. doi:10.2460/ajvr.2004.65.173.
- Melvin JA, Scheller E V., Noël CR, Cotter PA. 2015. New Insight into Filamentous Hemagglutinin Secretion Reveals a Role for Full-Length FhaB in *Bordetella* Virulence.

- Miller JF, editor. *MBio*. 6(4):1–10. doi:10.1128/mBio.01189-15.
- Mishra M, Parise G, Jackson KD, Wozniak DJ, Deora R. 2005. The BvgAS Signal Transduction System Regulates Biofilm Development in *Bordetella*. *J Bacteriol*. 187(4):1474–1484. doi:10.1128/JB.187.4.1474-1484.2005.
- Mitchell JA, Brooks HW, Szladovits B, Erles K, Gibbons R, Shields S, Brownlie J. 2013. Tropism and pathological findings associated with canine respiratory coronavirus (CRCoV). *Vet Microbiol*. 162(2–4):582–594. doi:10.1016/j.vetmic.2012.11.025.
- Mitchell JA, Cardwell JM, Leach H, Walker CA, Le Poder S, Decaro N, Rusvai M, Egberink H, Rottier P, Fernandez M, et al. 2017. European surveillance of emerging pathogens associated with canine infectious respiratory disease. *Vet Microbiol*. 212:31–38. doi:10.1016/j.vetmic.2017.10.019.
- Mitchell JA, Cardwell JM, Renshaw RW, Dubovi EJ, Brownlie J. 2013. Detection of canine Pneumovirus in dogs with canine infectious respiratory disease. *J Clin Microbiol*. 51(12):4112–4119. doi:10.1128/JCM.02312-13.
- Mock M, Ullmann A. 1993. Calmodulin-activated bacterial adenylate cyclases as virulence factors. *Trends Microbiol*. 1(5):187–192. doi:10.1016/0966-842X(93)90089-A.
- Moreno López M. 1952. El género *Bordetella*. *Enferm Infec Microbiol Clin*. 5(3–4):177–183.
- Moyaert H, de Jong A, Simjee S, Rose M, Youala M, El Garch F, Vila T, Klein U, Rzewuska M, Morrissey I. 2019. Survey of antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens isolated from dogs and cats with respiratory tract infections in Europe: ComPath results. *J Appl Microbiol*. 127(1):29–46. doi:10.1111/jam.14274.
- Munita JM, Arias CA. 2016. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr*. 4(2):1–37. doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
- Musser JM, Hewlett EL, Peppler MS, Selander RK. 1986. Genetic diversity and relationships in populations of *Bordetella* spp. *J Bacteriol*. 166(1):230–237. doi:10.1128/JB.166.1.230-237.1986.
- Nagamatsu K, Kuwae A, Konaka T, Nagai S, Yoshida S, Eguchi M, Watanabe M, Mimuro H, Koyasu S, Abe A. 2009. *Bordetella* evades the host immune system by inducing IL-10 through a type III effector, BopN. *J Exp Med*. 206(13):3073–3088. doi:10.1084/jem.20090494.
- Okada K, Abe H, Ike F, Ogura Y, Hayashi T, Fukui-Miyazaki A, Nakamura K, Shinzawa N, Horiguchi Y. 2015. Polymorphisms Influencing Expression of Dermonecrotic Toxin in *Bordetella bronchiseptica*. Hozbor DF, editor. *PLoS One*. 10(2):e0116604. doi:10.1371/journal.pone.0116604.
- Panina EM, Mattoo S, Griffith N, Kozak NA, Yuk MH, Miller JF. 2005. A genome-wide screen identifies a *Bordetella* type III secretion effector and candidate effectors in other species. *Mol Microbiol*. 58(1):267–279. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04823.x.
- Park J, Zhang Y, Buboltz AM, Zhang X, Schuster SC, Ahuja U, Liu M, Miller JF, Sebahia M, Bentley SD, et al. 2012. Comparative genomics of the classical *Bordetella* subspecies: the evolution and exchange of virulence-associated diversity amongst closely related pathogens. *BMC Genomics*. 13:545. doi:10.1186/1471-2164-13-545.

- Parkhill J, Sebahia M, Preston A, Murphy LD, Thomson N, Harris DE, Holden MTG, Churcher CM, Bentley SD, Mungall KL, et al. 2003. Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nat Genet.* 35:32–40. doi:10.1038/ng1227.
- Peeters DE, McKiernan BC, Weisiger RM, Schaeffer DJ, Clercx C. 2000. Quantitative Bacterial Cultures and Cytological Examination of Bronchoalveolar Lavage Specimens in Dogs. *J Vet Intern Med.* 14(5):534. doi:10.1892/0891-6640(2000)014<0534:QBCACE>2.3.CO;2.
- Pesavento PA, Hurley KF, Bannasch MJ, Artiushin S, Timoney JF. 2008. A Clonal Outbreak of Acute Fatal Hemorrhagic Pneumonia in Intensively Housed (Shelter) Dogs Caused by *Streptococcus equi* subsp. *zooeconomicus*. *Vet Pathol.* 45(1):51–53. doi:10.1354/vp.45-1-51.
- Porter JF, Connor K, Donachie W. 1994. Isolation and characterization of *Bordetella parapertussis*-like bacteria from ovine lungs. *Microbiology.* 140(2):255–261. doi:10.1099/13500872-140-2-255.
- Preston A, Petersen BO, Duus JØ, Kubler-Kielb J, Ben-Menachem G, Li J, Vinogradov E. 2006. Complete Structures of *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis* Lipopolysaccharides. *J Biol Chem.* 281(26):18135–18144. doi:10.1074/jbc.M513904200.
- Priestnall SL, Erles K, Brooks HW, Cardwell JM, Waller AS, Paillot R, Robinson C, Darby AC, Holden MTG, Schöniger S. 2010. Characterization of Pneumonia Due to *Streptococcus equi* subsp. *zooeconomicus* in Dogs. *Clin Vaccine Immunol.* 17(11):1790–1796. doi:10.1128/CVI.00188-10. <https://cvi.asm.org/content/17/11/1790>.
- Priestnall SL, Mitchell JA, Walker CA, Erles K, Brownlie J. 2014. New and Emerging Pathogens in Canine Infectious Respiratory Disease. *Vet Pathol.* 51(2):492–504. doi:10.1177/0300985813511130.
- Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, FitzPatrick ES, Fanning S, Hartigan PJ. 2011. *Bordetella* species. In: Sayers M, editor. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Second. Dublin: Wiley-Blackwell. p. 325–329.
- Reagan KL, Sykes JE. 2020. Canine Infectious Respiratory Disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 50(2):405–418. doi:10.1016/j.cvsm.2019.10.009.
- Renshaw R, Laverack M, Zyllich N, Glaser A, Dubovi E. 2011. Genomic analysis of a pneumovirus isolated from dogs with acute respiratory disease. *Vet Microbiol.* 150(1–2):88–95. doi:10.1016/j.vetmic.2011.01.013.
- Renshaw RW, Zyllich NC, Laverack MA, Glaser AL, Dubovi EJ. 2010. Pneumovirus in Dogs with Acute Respiratory Disease. *Emerg Infect Dis.* 16(6):993–995. doi:10.3201/eid1606.091778.
- Rosendal S, Vinther O. 1977. Experimental mycoplasmal pneumonia in dogs: Electron microscopy of infected tissue. *Acta Pathol Microbiol Scand.* 85B(6):462–465. doi:10.1111/j.1699-0463.1977.tb02003.x.
- Rosenthal RS, Nogami W, Cookson BT, Goldman WE, Folkening WJ. 1987. Major Fragment of Soluble Peptidoglycan Released from Growing *Bordetella pertussis* is Tracheal Cytotoxin. *Infect Immun.* 55(9):2117–2120. doi:10.1128/IAI.55.9.2117-2120.1987.

- Rottbøll LAH, Friis C. 2016. Penetration of antimicrobials to pulmonary epithelial lining fluid and muscle and impact of drug physicochemical properties determined by microdialysis. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 78:58–65. doi:10.1016/j.vascn.2015.11.007.
- Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. 2018. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence.* 9(1):522–554. doi:10.1080/21505594.2017.1313372.
- Rubinstein E. 2001. Comparative safety of the different macrolides. *Int J Antimicrob Agents.* 18(SUPPL.1):71–76. doi:10.1016/S0924-8579(01)00397-1.
- Savelkoul PHM, de Kerf DPG, Willems RJ, Mooi FR, van der Zeijst BAM, Gaastra W. 1996. Characterization of the fim2 and fim3 fimbrial subunit genes of *Bordetella bronchiseptica*: roles of Fim2 and Fim3 fimbriae and flagella in adhesion. *Infect Immun.* 64(12):5098–5105. doi:10.1128/IAI.64.12.5098-5105.1996.
- Scarlato V, Aricò B, Prugnola A, Rappuoli R. 1991. Sequential activation and environmental regulation of virulence genes in *Bordetella pertussis*. *EMBO J.* 10(12):3971–3975. doi:10.1002/j.1460-2075.1991.tb04967.x.
- Scheller E V., Cotter PA. 2015. *Bordetella* filamentous hemagglutinin and fimbriae: critical adhesins with unrealized vaccine potential. Carbonetti N, editor. *Pathog Dis.* 73(8):ftv079. doi:10.1093/femspd/ftv079.
- Scheller E V., Melvin JA, Sheets AJ, Cotter PA. 2015. Cooperative Roles for Fimbria and Filamentous Hemagglutinin in *Bordetella* Adherence and Immune Modulation. Swanson MS, editor. *MBio.* 6(3):e00500-15. doi:10.1128/mBio.00500-15.
- Schulz BS, Kurz S, Weber K, Balzer H-J, Hartmann K. 2014. Detection of respiratory viruses and *Bordetella bronchiseptica* in dogs with acute respiratory tract infections. *Vet J.* 201(3):365–369. doi:10.1016/j.tvjl.2014.04.019.
- Schwarz S, Alešík E, Grobbel M, Lübke-Becker A, Wallmann J, Werckenthin C, Wieler LH. 2007. The BfT-GermVet monitoring program - Aims and basics. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 120(9–10):357–362. doi:10.2376/0005-9366-120-357.
- Singleton DA, Stavisky J, Jewell C, Smyth S, Brant B, Sánchez-Vizcaíno F, Dawson S, Pinchbeck GL, Noble PJM, Radford AD. 2019. Small animal disease surveillance 2019: Respiratory disease, antibiotic prescription and canine infectious respiratory disease complex. *Vet Rec.* 184(21):640–645. doi:10.1136/vr.l3128.
- Sisti F, Fernández J, Cordero A, Casabuono A, Couto A, Hozbor D. 2017. Modifications of *Bordetella bronchiseptica* core lipopolysaccharide influence immune response without affecting protective activity. *Bioorg Med Chem Lett.* 27(3):432–436. doi:10.1016/j.bmcl.2016.12.049.
- Sisti F, Fernández J, Rodríguez ME, Lagares A, Guiso N, Hozbor DF. 2002. In Vitro and In Vivo Characterization of a *Bordetella bronchiseptica* Mutant Strain with a Deep Rough Lipopolysaccharide Structure. *Infect Immun.* 70(4):1791–1798. doi:10.1128/IAI.70.4.1791-1798.2002.
- Skinner JA, Pilione MR, Shen H, Harvill ET, Yuk MH. 2005. *Bordetella* Type III Secretion Modulates Dendritic Cell Migration Resulting in Immunosuppression and Bacterial

- Persistence. *J Immunol.* 175(7):4647–4652. doi:10.4049/jimmunol.175.7.4647.
- Speakman A, Binns SH, Osborn AM, Corkill JE, Kariuki S, Saunders JR, Dawson S, Gaskell RM, Hart CA. 1997. Characterization of antibiotic resistance plasmids from *Bordetella bronchiseptica*. *J Antimicrob Chemother.* 40(6):811–816. doi:10.1093/jac/40.6.811.
- Spears PA, Temple LM, Miyamoto DM, Maskell DJ, Orndorff PE. 2003. Unexpected Similarities between *Bordetella avium* and Other Pathogenic *Bordetellae*. *Infect Immun.* 71(5):2591–2597. doi:10.1128/IAI.71.5.2591-2597.2003.
- Sykes JE. 2014a. Canine Viral Respiratory Infections. In: *Canine and Feline Infectious Diseases*. 1st ed. St. Louis, Missouri: Elsevier/Saunders. p. 170–181. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978143770795300017X>.
- Sykes JE. 2014b. Bordetellosis. In: *Canine and Feline Infectious Diseases*. 1st ed. St. Louis, Missouri: Elsevier/Saunders. p. 372–379. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781437707953000387>.
- Taha-Abdelaziz K, Bassel LL, Harness ML, Clark ME, Register KB, Caswell JL. 2016. Cilia-associated bacteria in fatal *Bordetella bronchiseptica* pneumonia of dogs and cats. *J Vet Diagnostic Investig.* 28(4):369–376. doi:10.1177/1040638716646806.
- Uhl MA, Miller JF. 1994. Autophosphorylation and phosphotransfer in the *Bordetella pertussis* BvgAS signal transduction cascade. *Proc Natl Acad Sci.* 91(3):1163–1167. doi:10.1073/pnas.91.3.1163.
- Uhl MA, Miller JF. 1996a. Central Role of the BvgS Receiver as a Phosphorylated Intermediate in a Complex Two-component Phosphorelay. *J Biol Chem.* 271(52):33176–33180. doi:10.1074/jbc.271.52.33176.
- Uhl MA, Miller JF. 1996b. Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: the *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. *EMBO J.* 15(5):1028–1036. doi:10.1002/j.1460-2075.1996.tb00440.x.
- Vandamme P, Heyndrickx M, Vancanneyt M, Hoste B, Falsen E, Kersters K, Hinz K-H. 1996. *Bordetella trematum* sp. nov., Isolated from Wounds and Ear Infections in Humans, and Reassessment of *Alcaligenes denitrificans* Ruger and Tan 1983. *Int J Syst Bacteriol.* 46(4):849–858. doi:10.1099/00207713-46-4-849.
- Vandamme P, Hommez J, Vancanneyt M, Monsieurs M, Hoste B, Cookson BT, Wirsing Von Konig CH, Kersters K, Blackal PJ. 1995. *Bordetella hinzii* sp. nov., Isolated from Poultry and Humans. *Int J Syst Bacteriol.* 45(1):37–45. doi:10.1099/00207713-45-1-37.
- Viitanen SJ. 2017. Canine Bacterial Pneumonia - Role of Acute-phase Proteins and Viral Co-Infections. Faculty of Veterinary Medicine University of Helsinki.
- Viitanen SJ, Lappalainen A, Rajamäki MM. 2015. Co-infections with Respiratory Viruses in Dogs with Bacterial Pneumonia. *J Vet Intern Med.* 29(2):544–551. doi:10.1111/jvim.12553.
- Voorhees IEH, Glaser AL, Toohey-Kurth K, Newbury S, Dalziel BD, Dubovi EJ, Poulsen K, Leutenegger C, Willgert KJE, Brisbane-Cohen L, et al. 2017. Spread of Canine Influenza A(H3N2) Virus, United States. *Emerg Infect Dis.* 23(12):1950–1957. doi:10.3201/eid2312.170246.

- Watanabe M, Takimoto H, Kumazawa Y, Amano K-I. 1990. Biological Properties of Lipopolysaccharides from *Bordetella* Species. *J Gen Microbiol.* 136(3):489–493. doi:10.1099/00221287-136-3-489.
- Watson PJ, Wotton P, Eastwood J, Swift ST, Jones B, Day MJ. 2006. Immunoglobulin Deficiency in Cavalier King Charles Spaniels with *Pneumocystis* Pneumonia. *J Vet Intern Med.* 20(3):523–527. doi:10.1111/j.1939-1676.2006.tb02891.x.
- Weiss A. 2006. The Genus *Bordetella*. In: Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E, editors. *The Prokaryotes*. 3rd ed. New York, NY: Springer New York. p. 648–674.
- Weyant RS, Hollis DG, Weaver RE, Amin MF, Steigerwalt AG, O'Connor SP, Whitney AM, Daneshvar MI, Moss CW, Brenner DJ. 1995. *Bordetella holmesii* sp. nov., a New Gram-Negative Species Associated with Septicemia. *J Clin Microbiol*. 33(1):1–7. doi:10.1128/JCM.33.1.1-7.1995.
- Wingfield WE, Matteson VL, Hackett T, Walton R, Lagutchik M. 1997. Arterial Blood Gases in Dogs with Bacterial Pneumonia. *J Vet Emerg Crit Care.* 7(2):75–78. doi:10.1111/j.1476-4431.1997.tb00046.x.
- von Wintzingerode F, Schattke A, Siddiqui RA, Rösick U, Göbel UB, Gross R. 2001. *Bordetella petrii* sp. nov., isolated from an anaerobic bioreactor, and emended description of the genus *Bordetella*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51(4):1257–1265. doi:10.1099/00207713-51-4-1257.
- Wolff J, Cook GH, Goldhammer AR, Berkowitz SA. 1980. Calmodulin activates prokaryotic adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci.* 77(7):3841–3844. doi:10.1073/pnas.77.7.3841.
- Yih WK, Silva EA, Ida J, Harrington N, Lett SM, George H. 1999. *Bordetella holmesii* -Like Organisms Isolated from Massachusetts Patients with Pertussis-Like Symptoms. *Emerg Infect Dis.* 5(3):441–443. doi:10.3201/eid0503.990317.
- van der Zee A, Mooi F, Van Embden J, Musser J. 1997. Molecular Evolution and host Adaptation of *Bordetella* spp.: Phylogenetic Analysis Using Multilocus Enzyme Electrophoresis and Typing with Three Insertion Sequences. *J Bacteriol.* 179(21):6609–6617. doi:10.1128/JB.179.21.6609-6617.1997.

Anexos

Anexo 1: Hemograma de dia 12/1/2019

Hemograma

Nome do Animal:	Sissy
Espécie:	Cão
Género:	Feminino
Data:	12/01/2019
Hora:	20:30

Parâmetros	Valores de referência	Resultado
WBC	6.00 – 17.00 10 ⁹ /L	63.57
Neu #	3.62 – 12.30 10 ⁹ /L	55.83
Lym #	0.83 – 4.91 10 ⁹ /L	3.57
Mon #	0.14 – 1.97 10 ⁹ /L	3.90
Eos #	0.04 – 1.62 10 ⁹ /L	0.09
Bas #	0.0 – 0.12 10 ⁹ /L	0.18
Neu %	52.0 - 81 %	87.9
Lym %	12.0 – 33.0 %	5.6
Mon %	2.0 – 13.0 %	6.2
Eos %	0.5 – 10.0 %	0.1
Bas %	0.0 – 1.3 %	0.2
RBC	5.10 – 8.50 10 ¹²	5.63
HGB	110 - 190 g/L	116
HCT	33.0 – 56.0 %	36.9
MCV	60.0 – 76.0 fl	65.5
MCH	20.0 – 27.0 pg	20.7
MCHC	300 - 380 g/L	316
RDW-CV	12.5 – 17.2 %	16.9
RDW-SD	33.2 – 46.3 fl	45.2
PLT	117 - 490 10 ⁹ /L	176
MPV	8.0 – 14.1 fl	9.4
PDW	12.0 – 17.5	16.7
PCT	0.09 – 0.58 %	0.166

Anexo 2: Hemograma de dia 24/1/2019

Hemograma

Nome do Animal:	Sissy
Espécie:	Cão
Género:	Feminino
Data:	24/01/2019
Hora:	

Parâmetros	Valores de referência	Resultado
WBC	6.00 – 17.00 10 ⁹ /L	30.21 H
Neu #	3.62 – 12.30 10 ⁹ /L	22.54 H
Lym #	0.83 – 4.91 10 ⁹ /L	4.35
Mon #	0.14 – 1.97 10 ⁹ /L	3.17 H
Eos #	0.04 – 1.62 10 ⁹ /L	0.06
Bas #	0.0 – 0.12 10 ⁹ /L	0.09
Neu %	52.0 - 81 %	74.6
Lym %	12.0 – 33.0 %	14.4
Mon %	2.0 – 13.0 %	10.5 H
Eos %	0.5 – 10.0 %	0.2 L
Bas %	0.0 – 1.3 %	0.3
RBC	5.10 – 8.50 10 ¹²	4.74
HGB	110 - 190 g/L	102
HCT	33.0 – 56.0 %	28.8
MCV	60.0 – 76.0 fl	60.7 H
MCH	20.0 – 27.0 pg	21.5 H
MCHC	300 - 380 g/L	354
RDW-CV	12.5 – 17.2 %	17.2
RDW-SD	33.2 – 46.3 fl	36.5
PLT	117 - 490 10 ⁹ /L	332
MPV	8.0 – 14.1 fl	15.3
PDW	12.0 – 17.5	18.2 H
PCT	0.09 – 0.58 %	0.508

Anexo 3: Hemograma de dia 28/1/2019

Hemograma

Nome do Animal:	Sissy
Espécie:	Cão
Género:	F
Data:	28/01/2019
Hora:	

Parâmetros	Valores de referência	Resultado
WBC	6.00 – 17.00 10 ⁹ /L	40.39 H
Neu #	3.62 – 12.30 10 ⁹ /L	33.02 H
Lym #	0.83 – 4.91 10 ⁹ /L	3.37
Mon #	0.14 – 1.97 10 ⁹ /L	3.80 H
Eos #	0.04 – 1.62 10 ⁹ /L	0.15
Bas #	0.0 – 0.12 10 ⁹ /L	0.05
Neu %	52.0 - 81 %	81.8 H
Lym %	12.0 – 33.0 %	8.4 L
Mon %	2.0 – 13.0 %	9.4
Eos %	0.5 – 10.0 %	0.3 L
Bas %	0.0 – 1.3 %	0.1
RBC	5.10 – 8.50 10 ¹²	4.70 L
HGB	110 - 190 g/L	104 L
HCT	33.0 – 56.0 %	31.6 L
MCV	60.0 – 76.0 fl	67.2
MCH	20.0 – 27.0 pg	22.2
MCHC	300 - 380 g/L	331
RDW-CV	12.5 – 17.2 %	19.2 H
RDW-SD	33.2 – 46.3 fl	47.2 H
PLT	117 - 490 10 ⁹ /L	133
MPV	8.0 – 14.1 fl	9.5
PDW	12.0 – 17.5	16.7
PCT	0.09 – 0.58 %	0.127

Anexo 4 Hemograma de dia 11/2/2019

Hemograma

Nome do Animal:	Sissy
Espécie:	Cão
Género:	F
Data:	11/02/2019
Hora:	20:52

Parâmetros	Valores de referência	Resultado
WBC	6.00 – 17.00 10 ⁹ / L	7.61
Neu #	3.62 – 12.30 10 ⁹ / L	5.7
Lym #	0.83 – 4.91 10 ⁹ / L	1.15
Mon #	0.14 – 1.97 10 ⁹ / L	0.64
Eos #	0.04 – 1.62 10 ⁹ / L	0.11
Bas #	0.0 – 0.12 10 ⁹ / L	0.00
Neu %	52.0 - 81 %	74.9
Lym %	12.0 – 33.0 %	15.1
Mon %	2.0 – 13.0 %	8.4
Eos %	0.5 – 10.0 %	1.5
Bas %	0.0 – 1.3 %	0.1
RBC	5.10 – 8.50 10 ¹²	5.12
HGB	110 - 190 g/L	125
HCT	33.0 – 56.0 %	39.6
MCV	60.0 – 76.0 fl	77.3
MCH	20.0 – 27.0 pg	24.4
MCHC	300 - 380 g/L	315
RDW-CV	12.5 – 17.2 %	13.7
RDW-SD	33.2 – 46.3 fl	39.8
PLT	117 - 490 10 ⁹ /L	260
MPV	8.0 – 14.1 fl	10.2
PDW	12.0 – 17.5	15.6
PCT	0.09 – 0.58 %	0.264

Anexo 5: Hemograma de dia 6/3/2019

Hemograma

Nome do Animal:	Sissy
Espécie:	Cão
Género:	F
Data:	6-3-2019
Hora:	9h

Parâmetros	Valores de referência	Resultado
WBC	6.00 – 17.00 10 ⁹ / L	10.80
Neu #	3.62 – 12.30 10 ⁹ / L	5.61
Lym #	0.83 – 4.91 10 ⁹ / L	4.12
Mon #	0.14 – 1.97 10 ⁹ / L	0.8
Eos #	0.04 – 1.62 10 ⁹ / L	0.67
Bas #	0.0 – 0.12 10 ⁹ / L	0.02
Neu %	52.0 - 81 %	51.9
Lym %	12.0 – 33.0 %	38.2
Mon %	2.0 – 13.0 %	3.5
Eos %	0.5 – 10.0 %	6.3
Bas %	0.0 – 1.3 %	0.1
RBC	5.10 – 8.50 10 ¹²	4.68
HGB	110 - 190 g/L	116
HCT	33.0 – 56.0 %	34.8
MCV	60.0 – 76.0 fl	74.
MCH	20.0 – 27.0 pg	24.7
MCHC	300 - 380 g/L	332
RDW-CV	12.5 – 17.2 %	15.9
RDW-SD	33.2 – 46.3 fl	43.5
PLT	117 - 490 10 ⁹ /L	170
MPV	8.0 – 14.1 fl	11.7
PDW	12.0 – 17.5	16.5
PCT	0.09 – 0.58 %	0.199

Anexo 6: Hemograma de dia 2/5/2019

Hemograma

Nome do Animal:	Sissy
Espécie:	Cão
Género:	F
Data:	02-05-2019
Hora:	12h

Parâmetros	Valores de referência	Resultado
WBC	6.00 – 17.00 10 ⁹ / L	8.11
Neu #	3.62 – 12.30 10 ⁹ / L	4.20
Lym #	0.83 – 4.91 10 ⁹ / L	3.23
Mon #	0.14 – 1.97 10 ⁹ / L	0.25
Eos #	0.04 – 1.62 10 ⁹ / L	0.43
Bas #	0.0 – 0.12 10 ⁹ / L	0.00
Neu %	52.0 - 81 %	51.8 L
Lym %	12.0 – 33.0 %	39.8 H
Mon %	2.0 – 13.0 %	3.0
Eos %	0.5 – 10.0 %	5.3
Bas %	0.0 – 1.3 %	0.1
RBC	5.10 – 8.50 10 ¹²	5.71
HGB	110 - 190 g/L	136
HCT	33.0 – 56.0 %	40.8
MCV	60.0 – 76.0 fl	71.4
MCH	20.0 – 27.0 pg	23.9
MCHC	300 - 380 g/L	334
RDW-CV	12.5 – 17.2 %	13.4
RDW-SD	33.2 – 46.3 fl	37.1
PLT	117 - 490 10 ⁹ /L	147
MPV	8.0 – 14.1 fl	12.6
PDW	12.0 – 17.5	17.3
PCT	0.09 – 0.58 %	0.185

Anexo 7: Cultura, TSA e Citologia do dia 15/1/2019

FICHA DE RESULTADOS



Cliníca: Hospital Veterinário do Porto
 Médico: Dr. Luis Lobo
 Animal: BISSY
 Espécie: Canina
 Sexo: F
 Raça: Cavalier King Charles
 Idade: 12 M
 Tutor: Cristóvão Ferreira

Serviço Especializado em Veterinária, Lda
 Rua Cerejeira da Seica, nº 5, S. Vicente
 478-911 Braga

Tel: 253 495 422
 Fax: 253 25 112
 Email: geral@inno.pt

NID: 287625
 Nord / Nº Tubo: 267334 / HVP788
 Data: 15-01-2019
 Microchip:

Microbiologia

Análises	Resultados / Unidades	Val. Referência	Resultados Anteriores
Exame Bacteriológico com Antibiograma			
Produto	Lavado broncoalveolar		
Isolou-se:	<i>Bordetella bronchiseptica</i>		
Susceptível a:	Imipenem, Gentamicina, Tetraciclina, Doxiciclina, Amicacina		
Intermédio a:	Cloranfenicol, Enrofloxacina		
Resistente a:	Trimetoprim+Sulfametoxazol		

Citologia

Análises	Resultados / Unidades	Val. Referência	Resultados Anteriores
Citologia			
Amostra	Lavado bronco-alveolar		
Número de preparações	2 lâminas realizadas a partir do material enviado		
Observação Microscópica	Amostra de boa celularidade. Observa-se uma exuberante população de células inflamatórias constituída predominantemente por neutrófilos não degenerados, raros macrófagos alveolares e eosinófilos associados a escassas bactérias bacilares livres e fagocitadas. Visualizam-se ainda raras células epiteliais colunares ciliadas sem atipia.		
Diagnóstico	A imagem citológica sugere a presença de um processo inflamatório supurativo séptico compatível com uma pneumonia.		

Maxdata Informática, Lda.

Com os melhores cumprimentos,

Paula Mendes, D.O.
 INNO Laboratório Veterinário
 Laboratório Veterinário

Anexo 8: Cultura, TSA e Citologia do dia 31/1/2019



Nº 584/19

HOSPITAL VETERINÁRIO DO PORTO

E-mail: hvp@onevetgroup.pt

Médico Veterinário:

Dr. Luís Lobo

Data de Chegada: 31/01/2019

Data de Saída: 07/02/2019

Proprietário: Cristovão Ferreira

Nome: **Sissy**

Idade: 3M

Sexo: F

Espécie: Canídeo

Raça: Cavalier King Charles

Material enviado: LBA e sangue

MICROBIOLOGIA

CITOLOGIA

O material observado em esfregaço apresenta sinais de inflamação purulenta muito intensa, com neutrófilos degenerados ocasionais e pequenos cocobacilos livres e intrafagocitários muito abundantes e ocasionais linfócitos pequenos. Presença de raras células de epitélio respiratório reactivas. Fundo proteináceo intenso.

CULTURA MICROBIOLÓGICA

Resultado: Positivo

Agente bacteriano: *Bordetella bronchiseptica*

Teste de Susceptibilidade a Antibióticos (TSA)

Antibióticos	Resultado
Amicacina	Sensível
Amoxicilina	Resistente
Amoxicilina/Ácido Clavulânico	Resistente
Cefalotina	Resistente
Cefotaxima	Resistente
Cefoxitina	Resistente
Ceftazidima	Resistente
Clindamicina	Resistente
Cloranfenicol	Sensível
Doxiciclina	Resistente
Enrofloxacina	Resistente
Eritromicina	Intermédio
Gentamicina	Sensível
Tetraciclina	Resistente
Trimetoprim/Sulfametoxazol	Resistente

Pág. 1

Médico Veterinário

Constança Ferreira Pomba
OMV 1252

MICROBIOLOGIA

Determinação da Concentração Inibitória Mínima

Antibióticos	Resultado mg/L	Interpretação
Amicacina	16	S
Ampicilina	16	R
Amoxicilina/Ácido Clavulânico	≤ 8/4	R
Cefalotina	> 16	R
Cefotaxima	> 32	R
Cefoxitina	> 16	R
Ceftazidima	8	R
Ciprofloxacina	> 2	R
Cloranfenicol	≤ 8	S
Fosfomicina	> 64	R
Gentamicina	4	S
Levofloxacina	4	I
Minociclina	≤ 4	S
Tetraciclina	8	S
Trimetoprim/Sulfametoxazol	> 4/76	R

HEMOCULTURA

Resultado: Sem crescimento bacteriano após culturas sucessivas num período de 7 dias.

Pág. 2

Médico Veterinário

Constança Ferreira Pomba

Constança Ferreira Pomba
OMV 1252

Anexo 9: Cultura, TSA e Citologia do dia 7/3/2019



Nº 1405/19

HOSPITAL VETERINÁRIO DO PORTO

E-mail: hvp@onevetgroup.pt

Médico Veterinário:

Dr. Luís Lobo

Data de Chegada: 07/03/2019

Data de Saída: 14/03/2019

Proprietário: Cristovão Ferreira

Nome: **Sissy**

Idade: 5M

Sexo: F

Espécie: Canídeo

Raça: Cavalier King Charles

Material enviado: LBA

MICROBIOLOGIA

CITOLOGIA

O material observado em esfregaço apresenta raras células degeneradas não-identificáveis e escassos macrófagos em fundo proteináceo ligeiro.

CULTURA MICROBIOLÓGICA

Resultado: Positivo após cultura em meio de enriquecimento.

Agente bacteriano: *Bordetella bronchiseptica*

Teste de Susceptibilidade a Antibióticos (TSA)

Antibióticos	Resultado
Azitromicina	Sensível
Doxiciclina	Resistente
Eritromicina	Intermédio

Médico Veterinário

Constança Ferreira Pomba
OMV 1252

Anexo 10: Cultura, TSA e Citologia do dia 29/3/2019



Nº 1900/19

HOSPITAL VETERINÁRIO DO PORTO

E-mail: hvp@onevetgroup.pt

Médico Veterinário:

Dr. Luís Lobo

Data de Chegada: 29/03/2019

Data de Saída: 03/04/2019

Proprietário: Cristovão Ferreira

Nome: Sissy

Idade: 3M

Sexo: F

Espécie: Canídeo

Raça: Cavalier King Charles

Material enviado: LBA

MICROBIOLOGIA

CITOLOGIA

O material observado em esfregaço apresenta raras células degeneradas não identificáveis e ocasionais formas bacterianas (bastonetes) livres, em fundo proteináceo moderado.

CULTURA MICROBIOLÓGICA

Resultado: Positivo.

Agente bacteriano: *Bordetella bronchiseptica*

Teste de Susceptibilidade a Antibióticos (TSA)

Antibióticos	Resultado
Amicacina	Sensível
Amoxicilina	Resistente
Amoxicilina/Ácido Clavulânico	Resistente
Azitromicina	Sensível
Cefalotina	Resistente
Cefotaxima	Resistente
Cefoxitina	Resistente
Ceftazidima	Resistente
Cloranfenicol	Sensível
Doxiciclina	Resistente
Enrofloxacina	Intermédio
Gentamicina	Sensível
Tetraciclina	Resistente
Trimetoprim/Sulfametoxazol	Resistente

Médico Veterinário

Constança Ferreira Pomba
OMV 1252

Anexo 11: Cultura, TSA e Citologia do dia 18/4/2019



Nº 2368/19

HOSPITAL VETERINÁRIO DO PORTO
E-mail: hvp@onevetgroup.pt
Médico Veterinário:
Dr. Luís Lobo

Data de Chegada: 18/04/2019
Data de Saída: 24/04/2019

Proprietário: Cristovão Ferreira

Nome: **Sissy**

Idade: 3M

Idade: 3M

Espécie: Canídeo

Raça: Cavalier King Charles

Material enviado: LBA

MICROBIOLOGIA

CITOLOGIA

O material em esfregaço apresenta concentração acentuada de células degeneradas, concentração moderada de placas de células epiteliais e concentração discreta de neutrófilos, macrófagos e células colunares ciliadas em fundo de lâmina repleto de substância amorfa rósea. Foram observadas algumas estruturas sugestivas de bactérias do tipo cocos.

CULTURA MICROBIOLÓGICA – AEROBIOSE

Resultado: Positivo após cultura em meio de enriquecimento.

Agente bacteriano: *Staphylococcus spp.*

Teste de Susceptibilidade a Antibióticos (TSA)

Antibióticos	Resultado
Amicacina	Sensível
Amoxicilina	Resistente
Amoxicilina/Ácido Clavulânico	Sensível
Cefoxitina	Sensível
Clindamicina	Sensível
Cloranfenicol	Sensível
Enrofloxacina	Sensível
Eritromicina	Sensível
Gentamicina	Resistente
Penicilina	Resistente
Tetraciclina	Resistente
Trimetoprim/Sulfametoxazol	Sensível

Pág. 1

Médico Veterinário

Constança Ferreira Pomba
OMV 1252

L.D.M.V, Laboratório de Diagnóstico Molecular
Veterinário Lda.

Rua Margarida Palla, 5-A, 1495-143 Algés
Tel 214139730; Telem 912800936

www.genevet.pt
geral@genevet.pt

CULTURA MICROBIOLÓGICA – ANEROBIOSE

Resultado: Positivo após cultura em meio de enriquecimento.

Agente bacteriano: *Pseudomonas* spp.

Teste de Susceptibilidade a Antibióticos (TSA)

Antibióticos	Resultado
Amicacina	Sensível
Amoxicilina	Resistente
Amoxicilina/Ácido Clavulânico	Resistente
Ceftazidima	Sensível
Ciprofloxacina	Sensível
Cloranfenicol	Resistente
Enrofloxacina	Intermédio
Gentamicina	Intermédio
Marbofloxacina	Sensível
Piperacilina	Resistente
Tetraciclina	Resistente
Tobramicina	Sensível
Trimetoprim/Sulfametoxazol	Resistente

Pág. 2

Médico Veterinário

Constança Ferreira Pomba

Constança Ferreira Pomba
OMV 1252