

Perfil fenotípico e susceptibilidade antimicrobiana de *Streptococcus equi* isolados de equinos da região Sul do Brasil¹

Jackeline K. Kirinus², Luciana Pötter², Letícia T. Gressler², Fernando L.L. Leite² e Agueda P.C. Vargas^{2*}

ABSTRACT.- Kirinus J.K., Pötter L., Gressler L.T., Leite F.L.L. & Vargas A.P.C. 2011. [Phenotypic profile and antimicrobial susceptibility of *Streptococcus equi* isolated from horses in southern Brazil.] Perfil fenotípico e susceptibilidade antimicrobiana de *Streptococcus equi* isolados de equinos da região Sul do Brasil. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 31(3):231-238. Laboratório de Bacteriologia, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima 1000, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil. E-mail: agueda.vargas@gmail.com

Phenotypic characteristics [morphology, biochemical fermentation, antimicrobial susceptibility, index of multiple resistances to antimicrobials (IMRA), minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of benzilpenicillin] of 38 *Streptococcus equi* isolates from clinical samples of horses with strangles were the aim of this study. The phenotypic analyses demonstrated three colony patterns, three carbohydrate fermentation biotypes and IMRA variation from 0 to 0.4. All the isolates of *S. equi* demonstrated sensitivity to penicillin, both by the disc diffusion method and microdilution method. The average MIC and MBC for benzilpenicillin were of 0.0095µg/mL and 0.0267µg/mL for *S. equi* subsp. *equi* and of 0.0128µg/mL and 0.0380µg/mL for *S. equi* subsp. *zooepidemicus*. The values of MIC and MBC differed between the subspecies ($p < 0.05$). The diameter of penicillin inhibition halo demonstrated a relation with the MIC ($\hat{y} = 0.03638 - 0.00072x$) for *Streptococcus equi* subsp. *equi*. A relation between the diameter of the inhibition halo of penicillin was also observed with the MBC for *S. equi* subsp. *equi* ($\hat{y} = 0.10931 - 0.00223x$). However for the samples of *S. equi* subsp. *zooepidemicus* this relation was only verified with the MBC ($\hat{y} = 0.1322 - 0.00271x$). The MIC of benzilpenicillin of the samples isolated from the Central, Planalto and South regions of Rio Grande do Sul were statistically similar, although different from the Paraná state sample, suggesting the atypical character of this strain. All the *S. equi* isolates are sensitive to penicillin and sulfazotrim, confirming these as antibiotics of choice for the treatment of infections caused by this agent in the clinical veterinary practice. The results obtained do not discard the prudent use of antimicrobials.

INDEX TERMS: *Streptococcus equi*, strangles, phenotypic characterization, susceptibility, resistance.

RESUMO.- As características fenotípicas [morfológicas, bioquímicas, susceptibilidade aos antimicrobianos, índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA), con-

centração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) da benzilpenicilina] de 38 isolados de *Streptococcus equi* oriundos de amostras clínicas de animais com adenite equina foram alvo deste estudo. A fenotípica demonstrou três padrões de colônias, três biotipos de fermentação de carboidratos e variação de 0 a 0,4 no IRMA. Todos os isolados de *S. equi* demonstraram sensibilidade à penicilina, tanto pelo método de disco difusão quanto pelo método de microdiluição. A CIM e CBM média de benzilpenicilina foi de 0,0095µg/mL e 0,0267µg/mL para *S.*

¹ Recebido em 6 de setembro de 2010.

Aceito para publicação em 6 de outubro de 2010

² Laboratório de Bacteriologia (Labac), Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, sala 5137, prédio 44, Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brasil. *Autor para correspondência: agueda.vargas@gmail.com

equi subesp. *equi* e de 0,0128µg/mL e 0,0380µg/mL para *S. equi* subesp. *zooepidemicus*. Os valores de CIM e CBM diferiram entre as subespécies ($p < 0,05$). O diâmetro do halo de inibição de penicilina demonstrou relação com a CIM ($\hat{y} = 0,03638 - 0,00072x$) para *S. equi* subesp. *equi*. Também foi demonstrada relação entre o diâmetro do halo de inibição de penicilina com a CBM para *S. equi* subesp. *equi* ($\hat{y} = 0,10931 - 0,00223x$). Entretanto para as amostras de *S. equi* subesp. *zooepidemicus* esta relação somente foi verificada para a CBM ($\hat{y} = 0,1322 - 0,00271x$). A CIM de benzilpenicilina frente às amostras isoladas da região Central, Planalto e Sul do estado do Rio Grande do Sul foram estatisticamente semelhantes, mas diferiram do isolado do estado do Paraná, sugerindo o caráter atípico desta cepa. Todos os isolados de *S. equi* são sensíveis à penicilina e sulfazotrim, confirmando a eleição destes antimicrobianos para o tratamento das infecções por este agente na clínica veterinária. Os resultados obtidos não dispensam a utilização prudente dos antimicrobianos.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Streptococcus equi*, garrotilho, fenotipia, susceptibilidade, resistência.

INTRODUÇÃO

A adenite equina é uma enfermidade respiratória, causada por *Streptococcus equi* subsp. *equi*, cocos Gram positivos b-hemolíticos do grupo C de Lancefield, catalase negativa (Quinn et al. 1994). A doença é considerada altamente contagiosa entre os equídeos, afetando o trato respiratório superior com formação de abscessos nos linfonodos regionais que podem eventualmente romper, drenando o conteúdo purulento para o trato respiratório superior, ou supurar pela pele (Quinn et al. 1994, Timoney 1997, Harrington et al. 2002, Waller & Jolley 2007).

S. equi subsp. *equi* é fenotípica e geneticamente relacionado com *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, ambos considerados até 1984 espécies distintas (Facklam 2002). Acredita-se que *S. equi* subsp. *equi* possa ter evoluído do ancestral *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, que é causador de doenças secundárias em equinos e também em outras espécies de animais, incluindo o homem (Holden et al. 2009).

A diferenciação entre os subtipos é realizada de forma rotineira pela utilização de técnicas fenotípicas, como a fermentação de açúcares (Timoney 2004). O grupo C de Lancefield, do qual faz parte *S. equi*, apresenta três espécies, classificadas de acordo com a produção de hemólise e capacidade de fermentação de trealose, sorbitol e lactose (Lancefield 1933, Quinn et al. 1994, Kuwamoto et al. 2001). Apesar da larga utilização desses critérios fenotípicos, cepas atípicas de *S. equi* subsp. *equi* podem fermentar alguns dos carboidratos, induzindo a erros na interpretação dos resultados (Grant et al. 1993).

A partir do diagnóstico da enfermidade, a conduta terapêutica recomendada inclui o uso de antimicrobianos. Todavia, o tratamento pode ser dificultado pela resistência de *S. equi* aos antimicrobianos, o que se constitui numa consequência natural e inevitável (Harrington et al. 2002,

Feary 2005). Por outro lado, cabe ressaltar que estudos referentes à susceptibilidade de *S. equi* são muito escassos, tanto no Brasil como na literatura internacional. Neste contexto, o objetivo desse estudo foi analisar amostras clínicas oriundas de equinos com adenite equina, relacionando as características fenotípicas [morfológicas, bioquímicas, susceptibilidade aos antimicrobianos, índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA), concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) da benzilpenicilina] para isolados de *S. equi* com vistas à aplicação no diagnóstico e tratamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Características fenotípicas

Morfologia das colônias de *Streptococcus* sp. Foram analisadas 38 amostras de *S. equi*, isoladas de equinos das raças puro sangue inglês, crioulo e brasileiro de hipismo com sinais clínicos de garrotilho, obtidos da rotina de diagnóstico laboratorial (37 dos isolados do estado do Rio Grande do Sul: destes, 22 da região sul do estado, 14 da região central e um da região do planalto) e um isolado do estado do Paraná; distribuídos em 19 estabelecimentos de criação.

O cultivo bacteriano primário foi realizado em meio base de ágar sangue (Himedia Laboratories®) acrescido de 5% de sangue ovino desfibrinado e incubado a 37°C por 48 horas. Foram observadas as características morfo-tintoriais dos isolados, bem como a produção de hemólise (Quinn et al. 1994). Colônias beta-hemolíticas de cocos Gram positivos, catalase negativa, foram repicadas no meio de cultura citado anteriormente, incubadas a 37°C por 48 horas e após caracterizadas morfológicamente (Koneman et al. 2001) através da margem, cor, densidade, superfície, hemólise e tamanho das colônias.

Amostras de referência de *S. equi* subesp. *equi*_ATCC 39506, *Staphylococcus aureus*_ATCC 25923 e *Escherichia coli*_ATCC 25922 foram utilizadas como controle de qualidade tanto para o método de disco difusão, como para o método de microdiluição.

Caracterização bioquímica

As colônias morfológicamente caracterizadas como *S. equi* foram suspensas em solução salina em turvação equivalente a escala cinco de McFarland, para a inoculação dos testes bioquímicos de fermentação de carboidratos: trealose, sorbitol e lactose (Grant et al. 1993, Quinn et al. 1994).

Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos (TSA) - método de disco difusão

Para avaliação da susceptibilidade antimicrobiana *in vitro*, utilizou-se o método de Kirby Bauer Modificado (Nccls 1999). Foram testados os seguintes antimicrobianos pertencentes às classes: 1) aminoglicosídeos - amicacina (30µg), estreptomomicina (10µg), gentamicina (10µg) e neomicina (30µg); 2) betalactâmicos - amoxicilina (10µg), ampicilina (10µg), cefalexina (30µg), cefalotina (30µg), imipenem (10µg), oxacilina (1µg) e penicilina (10 UI); 3) fluoroquinolonas - enrofloxacin (5µg); 4) lincosamidas - lincomicina (2µg); 5) propanodiol - cloranfenicol (30µg); 6) macrolídeos - azitromicina (15µg) e eritromicina (15µg); 7) polimixinas - polimixina B (300 UI); 8) rifamicinas - rifampicina (5µg); 9) sulfamidas - sulfazotrim (25µg); e 10) tetraciclina - tetraciclina (30µg);

Os resultados foram interpretados de acordo com o padrão

estabelecido pelo Nccls (1999) e os diâmetros dos halos de inibição da penicilina foram anotados para correlacionar com os resultados da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM).

O índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA) foi calculado conforme metodologia descrita por Krumperman (1983), através da razão entre o número de classes antimicrobianas contra as quais cada isolado é resistente e o número total de classes de antimicrobianos testados.

Determinação da CIM e CBM de benzilpenicilina - método de microdiluição

A atividade antimicrobiana foi determinada para a benzilpenicilina (Novafarma, indústria farmacêutica[®]) utilizando o método de microdiluição, baseado no documento M7-A6 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2003), com pequenas modificações. O método consistiu na distribuição de 100µL de caldo Mueller Hinton (Himedia Laboratories[®]) em placas de poliestireno retangulares com 96 poços de fundo chato, estéreis. A seguir, 100µL da solução estoque de benzilpenicilina (2,4µg/mL) foram acrescentados ao primeiro poço e após homogeneização, sucessivamente foi realizada diluição na razão de dois, sendo testadas 12 concentrações (1,2 a 0,00058µg/mL) da penicilina.

O inóculo bacteriano foi preparado, com turbidez idêntica à solução padrão da escala 0,5 de McFarland (1-2x10⁸ UFC/mL), com cultivo em placa dos isolados (*S. equi* subsp. *equi* e *S. equi* subsp. *zooeptidemicus*) em base de ágar sangue acrescido de 5% de sangue ovino desfibrinado, por 24 horas a 35°C+2°C. Esta suspensão foi diluída em caldo Mueller Hinton (Himedia Laboratories[®]) para aproximadamente 1-9x10⁶ UFC/mL e 100µL/poço foram utilizados nos ensaios até 15 minutos após o preparo. As microplacas foram incubadas por 24 horas a 35°C+2°C, em condições de aerobiose. Após o período de incubação, a CIM foi determinada como a menor concentração que inibiu efetivamente o crescimento bacteriano nos poços de microdiluição. Para esta determinação foi adicionado 20µL de solução a 1% do corante cloreto de 2,3,5-trifenil tetrazólio (Vetec[®]), em cada poço da microplaca, a fim de auxiliar na revelação da CIM (Murari et al. 2008). De acordo com os padrões, para estreptococos beta-hemolítico (CLSI 2009), os isolados com valores de CIM <0,12µg/mL foram considerados sensíveis à penicilina.

A CBM foi determinada através do plaqueamento de 50 µL de cada poço em base de ágar sangue, acrescido de 5% de sangue ovino desfibrinado em placas de Petri de 60x15mm (Prolab[®]) incubadas por 24 horas a 35°C+2°C.

O ensaio de cada amostra foi realizado em triplicata; também foram realizados controles positivos (meio de cultura e inóculo) e negativos (somente meio de cultura; meio de cultura e antimicrobiano) para cada ensaio.

Análise estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade, distribuição de frequência, análise de variância e análise não paramétrica de Kruskal-Wallis. Foi realizado teste de correlação e comparação de médias em nível de 5% de significância. Também foram submetidos à análise de regressão, na qual a escolha dos modelos baseou-se na significância dos coeficientes linear, quadrático e cúbico, utilizando-se o teste "t" de Student, com 5% de probabilidade (Sas 2001).

Para estabelecer a relação entre CIM, CBM e o diâmetro do halo de inibição da penicilina em milímetros (mm) foi aplicada a análise de regressão linear.

A susceptibilidade das amostras de *S. equi* frente aos antimicrobianos foi avaliada pelo teste de Kruskal-Wallis. Foram atribuídos valores para as respostas ao teste de sensibilidade (sensível = 2, intermediário = 1, resistente = 0). Quando identificadas diferenças aplicou-se o teste de Duncan para comparar as médias. As análises foram realizadas pelo proGrama estatístico Sas (2001).

RESULTADOS

Todos os 38 isolados bacterianos beta-hemolíticos do gênero *Streptococcus* apresentaram colônias de densidade translúcida, superfície brilhante e tamanho variando de 0,5-1,0mm. A margem e a cor das colônias analisadas tiveram três padrões entre os isolados. Assim 16 isolados demonstraram margem inteira e cor amarela (padrão A), dois isolados com margem inteira e cor branca (padrão B) e 20 isolados com margem ondulada e cor branca (padrão C).

A análise bioquímica classificou os 38 isolados em três biotipos. Vinte isolados do biotipo I (*S. equi* subsp. *equi*), não fermentadores dos carboidratos trealose, sorbitol e lactose; 16 isolados do biotipo II (*S. equi* subsp. *zooeptidemicus*), fermentadores de lactose e sorbitol e dois isolados do biotipo III, considerados como *S. equi* subsp. *equi* atípicos, somente fermentadores de lactose.

Os 38 isolados de *S. equi* analisados demonstraram 100% de sensibilidade à azitromicina, cefalexina, cloranfenicol, imipenem, lincomicina, penicilina, polimixina B e sulfazotrim; 97% de sensibilidade à ampicilina, cefalotina e eritromicina; 95% à gentamicina e neomicina; 92% à amoxicilina e oxacilina; 87% à enrofloxacin e estreptomina; 85% à rifampicina; 79% à tetraciclina; e 76% à ampicacina (Quadro 1).

Entre as classes de antimicrobianos testados, ocorreu maior resistência ao grupo dos aminoglicosídeos 42% (16/38 isolados), dentre estes 16 isolados, 11 foram classificados como *S. equi* subsp. *equi* e cinco *S. equi* subsp. *zooeptidemicus*. Seis isolados de *S. equi* subsp. *equi* foram resistentes à classe dos beta-lactâmicos. Foi observado 8% (3/38) dos isolados resistentes à oxacilina e amoxicilina. Já ao grupo das fluoroquinolonas, observou-se que 13% (5/38) das amostras eram resistentes, novamente um maior número nas amostras classificadas como *S. equi* subsp. *equi* (4/22). Entretanto, na classe das tetraciclinas o maior número de resistências ocorreu nas amostras de *S. equi* subsp. *zooeptidemicus* (6/16) do que nas amostras de *S. equi* subsp. *equi* (2/22). A análise estatística comprovou que os resultados aos grupos das tetraciclinas e das fluoroquinolonas diferiram entre as subespécies de *S. equi* (p<0,05).

Dos 38 isolados, seis (15,7%) foram sensíveis aos 20 antimicrobianos das 10 classes testadas e 15 (39,4) tiveram índice de resistência múltipla aos antimicrobianos (IRMA) 0,0, ou seja, resistência a somente uma classe de antimicrobiano testado. O (IRMA) dos isolados de *S. equi* variou de 0 a 0,4 (resistência a 6 classes de antimicrobianos). Porém, cinco (13%) dos 38 isolados clínicos demonstraram IRMA acima de 0,2. O maior número de isolados com resis-

Quadro 1. Susceptibilidade antimicrobiana e índice de resistência múltipla a diferentes classes de antimicrobianos de *Streptococcus equi* pelo método de disco difusão

Amos- tra	BETA-LAC.						AMINOGL.				FLU	LIN	PRO	MAC		POL	RIF	SUT	TET	IRMA
	A	A	C	C	I	P	A	E	G	N	ENO	LIN	CLO	ERI	AZI	POL*	RIF	SUT	TET	
	M	M	F	F	M	E	M	S	E	E							RIF	SUT	TET	
1 ^e	S	S	S	R	S	S	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	0,40
2 ^e	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	0,20
3 ^e	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	0,00
4 ^e	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	I	S	S	I	0,30
5 ^e	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	0,30
6 ^e	S	I	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,10
7 ^e	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	0,10
8 ^e	I	R	S	S	S	I	R	R	I	I	R	R	S	S	I	S	S	S	S	0,30
9 ^e	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,00
10 ^e	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	I	0,10
11 ^e	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,00
12 ^e	S	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,10
13 ^e	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,00
14 ^e	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,00
15 ^e	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,00
16 ^e	S	S	S	S	S	S	S	I	S	R	S	I	S	S	S	S	R	S	I	0,20
17 ^e	S	I	S	S	S	S	S	S	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	0,10
18 ^e	S	S	S	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,10
19 ^e	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	0,20
20 ^e	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	R	S	S	0,10
21 ^e	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,10
22 ^e	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	R	S	S	0,10
23 ^z	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	0,20
24 ^z	I	S	S	S	S	S	S	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	R	0,20
25 ^z	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	I	S	S	I	R	0,10
26 ^z	S	I	S	S	S	S	S	S	I	S	S	I	S	S	S	S	S	S	I	0,00
27 ^z	I	I	S	S	S	S	S	R	I	S	I	R	S	S	S	I	S	S	R	0,30
28 ^z	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	I	S	I	S	0,00
29 ^z	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,00
30 ^z	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,00
31 ^z	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	0,10
32 ^z	S	I	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,00
33 ^z	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	0,00
34 ^z	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	0,00
35 ^z	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0,00
36 ^z	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	R	0,00
37 ^z	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	0,10
38 ^z	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	I	S	0,10
39 ^a	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	0,20
40 ^b	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	0,10
41 ^c	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	0,20

^e = 1 a 22 (*S. equi* subsp. *equi*); ^z = 23 a 38 (*S. equi* subsp. *zooepidemicus*); ^a = *Escherichia coli*_ATCC 25922; ^b = *Staphylococcus aureus*_ATCC 25923; ^c = *S. equi* subsp. *equi*_ATCC 39506; BETA-LAC = beta-lactâmicos; AMINOGL.= aminoglicosídeos; FLU = fluoroquinolonas; LIN = lincosamidas; PRO = propanodiol; MAC = macrolídeos; POL = polimixinas; RIF = rifamicinas; SUT = sulfamidas; TET = tetraciclina; IRMA = índice de resistência múltipla aos antimicrobianos; AMO = amoxicilina; AMP = ampicilina; CFE = cefalexina; CFL = cefalotina; IMP = imipenem; OXA = oxacilina; PEN = penicilina; AMI = amicacina; EST = estreptomicina; GEN = gentamicina; NEO = neomicina; ENO = enrofloxacina; LIN = lincomicina; CLO = cloranfenicol; ERI = eritromicina; AZI = azitromicina; POL* = polimixina B; RIF = rifampicina; SUT = sulfazotrim; TET = tetraciclina; R = resistente; I = intermediário, S = sensível.

tência múltipla aos antimicrobianos ocorreu em *S. equi* subsp. *equi*. O IRMA médio foi de 0,13 para *S. equi* subsp. *equi* e de 0,07 para *S. equi* subsp. *zooepidemicus*.

O diâmetro médio do halo de inibição da penicilina para os isolados de *S. equi* subsp. *equi* foi de 37,00mm (variação de 27-50mm) e de *S. equi* subsp. *zooepidemicus* foi de 34,75mm (variação de 25-50mm). As amostras de controle

de qualidade *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *S. equi* subsp. *equi* demonstraram diâmetro do halo de inibição da penicilina de 20, 30 e 34mm, respectivamente.

A concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) média de benzilpenicilina foram de 0,0095µg/mL e 0,0267µg/mL para *S. equi* subsp. *equi* e de 0,0128µg/mL e 0,0380µg/mL para *S. equi* subsp. *zooe-*

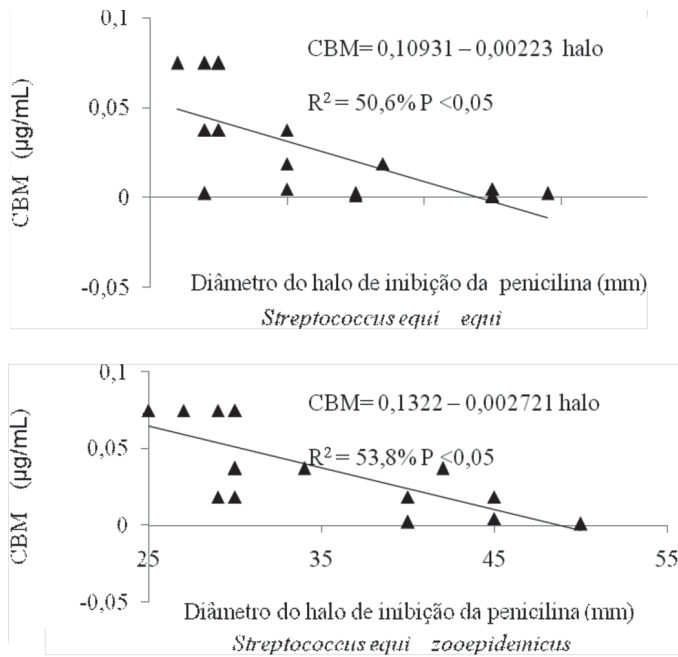


Fig. 1. Relação entre concentração bactericida mínima (CBM) e o diâmetro do halo de inibição da penicilina em milímetros para as subespécies de *Streptococcus equi*.

zooepidemicus. A análise de regressão linear ($\hat{Y} = -0,00012 + 2,94849x$) estabeleceu relação entre a CIM e CBM nas 22 amostras classificadas fenotipicamente como *S. equi* subsp. *equi* ($p < 0,05$; $R^2 = 78,9\%$). A CIM e o diâmetro do halo de inibição da penicilina em milímetros (mm) tiveram relação nas amostras de *S. equi* subsp. *equi* ($\hat{Y} = 0,03638 - 0,00072x$) ($p < 0,05$; $R^2 = 59,2\%$).

Desta mesma forma, a CBM e o diâmetro do halo de inibição da penicilina em mm relacionaram-se para as duas subespécies de *S. equi*. Pode-se inferir que na equação de regressão linear, a cada um mm de aumento no diâmetro do halo de inibição da penicilina, reduz a CBM em $0,00223 \mu\text{g/mL}$ e $0,00271 \mu\text{g/mL}$ para *S. equi* subsp. *equi* e *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, respectivamente (Fig. 1).

A origem geográfica das amostras diferiu para valores da CIM de benzilpenicilina, e mostrou que os isolados da região Central, Planalto e Sul do estado do Rio Grande do Sul foram semelhantes, cerca de $0,010 \mu\text{g/mL}$, mas diferentes quando comparados à amostra oriunda do estado do Paraná, $0,075 \mu\text{g/mL}$ (Fig. 2).

A CIM_{50} de benzilpenicilina foi de $0,0093 \mu\text{g/mL}$ tanto para as amostras de *S. equi* subsp. *equi*, quanto para *S. equi* subsp. *zooepidemicus*. A CBM_{50} de benzilpenicilina foi de $0,0187 \mu\text{g/mL}$ e $0,0375 \mu\text{g/mL}$ para *S. equi* subsp. *equi* e *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, respectivamente. A CIM_{90} de benzilpenicilina e a CBM_{90} de benzilpenicilina foram de $0,0187 \mu\text{g/mL}$ e $0,0750 \mu\text{g/mL}$, respectivamente para as duas subespécies de *S. equi*. A distribuição de frequência mostrou diferença para valores de CIM de benzilpenicilina em *S. equi* subsp. *equi* e *S. equi* subsp. *zooepidemicus* (Fig. 3).

A CIM e CBM das amostras utilizadas como controle de qualidade foram respectivamente $0,60 \mu\text{g/mL}$ e $1,20 \mu\text{g/mL}$

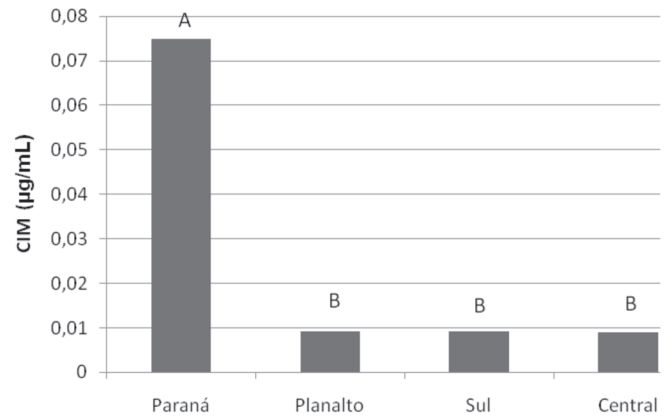


Fig. 2. Relação entre a origem geográfica dos isolados de *Streptococcus equi* e os valores da concentração inibitória mínima (CIM) de benzilpenicilina ($p < 0,05$).

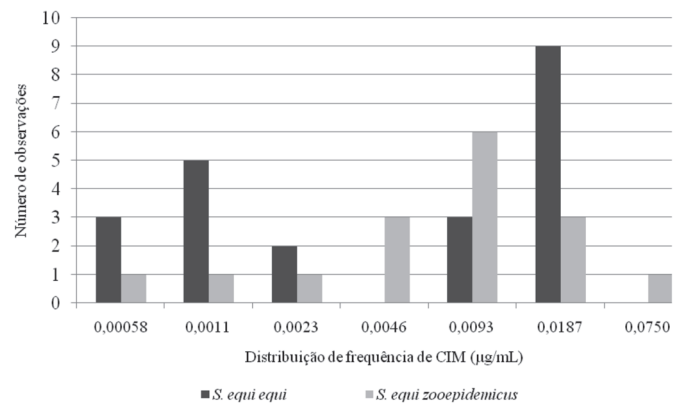


Fig. 3. Distribuição de frequência da concentração inibitória mínima (CIM) da benzilpenicilina frente aos isolados de *Streptococcus equi* subsp. *equi* e *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*.

$\mu\text{g/mL}$ para *Escherichia coli*; $0,0187 \mu\text{g/mL}$ e $0,0750 \mu\text{g/mL}$ para *Staphylococcus aureus* e $0,0046 \mu\text{g/mL}$ e $0,0046 \mu\text{g/mL}$ para *S. equi* subsp. *equi*.

A análise estatística não demonstrou relação entre as raças dos animais das quais tiveram origem as amostras, o IRMA, a procedência dos estabelecimentos e os biotipos das amostras estudadas.

DISCUSSÃO

De acordo com a classificação das colônias, o padrão C das colônias de *Staphylococcus equi* subsp. *zooepidemicus* foi uniforme. No entanto, para os isolados de *S. equi* subsp. *equi*, o padrão de colônias foi variável, o que confirma que esta característica fenotípica não pode ser utilizada para diferenciar estas subespécies (Timoney 2004).

Lindsay et al. (2009) relataram a relação entre a lise do ácido hialurônico com bacteriófagos carreadores de genes integrados ao cromossoma das bactérias em amostras de *S. equi* subsp. *zooepidemicus*. Chanter et al. (1999) e Holden et al. (2009) sugeriram que *S. equi* subsp. *zooepidemicus*, *in vitro*, têm baixo nível de expressão do gene codificador da cápsula de ácido hialurônico, o que pode

justificar porque os isolados de *S. equi* subsp. *zooepidemicus* apresentaram o padrão de colônias mais secas e espalhadas.

A variação do perfil fermentativo em cepas de *S. equi* mostra limitações da caracterização fenotípica (Grant et al. 1993), o que justifica a classificação de duas cepas de *S. equi* como atípicas, pois eram fermentadoras de lactose.

Os estudos sobre a susceptibilidade antimicrobiana de bactérias patogênicas a equinos são clinicamente importantes. A coleta de dados locais sobre a susceptibilidade aos antimicrobianos é o primeiro passo para a utilização antimicrobiana prudente (Weese et al. 2008). No entanto, no Brasil, bem como na literatura internacional são raros os dados disponíveis para discussão, o que limitou a comparação dos resultados obtidos neste trabalho, apenas com dados disponíveis de outras espécies de *Streptococcus*.

Os resultados obtidos para o IRMA são relevantes, pois segundo Krumperman (1983) índices acima de 0,2 podem ser potencial fonte de transmissão de genes de resistência. Uma vez que distintos genes de resistência são frequentemente agrupados, a transferência horizontal de um único elemento genético pode resultar em aquisição pelas bactérias receptoras de múltipla resistência (Poole 2005). A resistência a múltiplos antimicrobianos em bactérias isoladas de equinos aumenta o risco de falhas terapêuticas, além disso, os custos para os proprietários de cavalos tornam-se elevados devido à prolongada hospitalização e uso de antimicrobianos onerosos (Weese et al. 2008).

A classe dos aminoglicosídeos é comumente usada no tratamento de infecções bacterianas (Mckenzie 2004), entretanto, a resistência bacteriana a esta classe é relativamente comum devido à transferência por plasmídeos (Spinosa 2006). Embora na teoria os aminoglicosídeos possam ser utilizados, a maior resistência de *S. equi* observada às classes de antimicrobianos que apresentam elementos móveis pode estar atribuída ao desenvolvimento de vários mecanismos para neutralizar a ação dos agentes antimicrobianos (Sweeney et al. 2005). O mais comum é a inativação enzimática do fármaco, modificação ou substituição deste, ativação do efluxo e redução da assimilação. A resistência natural de *S. equi* subsp. *equi* frente aos aminoglicosídeos pode ser explicada pela natureza microaerófila deste microrganismo, uma vez que a entrada deste antimicrobiano na parede bacteriana é dependente de oxigênio (Prescott & Baggot 1994).

A sensibilidade à penicilina encontrada em todos os isolados do presente estudo, tanto no método de disco difusão quanto no método de microdiluição corroboraram o estudo realizado por Trolldenier et al. (2000) na Alemanha e Sweeney et al. (2005) nos Estados Unidos da América, que demonstraram a sensibilidade aos antimicrobianos pertencentes à classe dos beta-lactâmicos (benzilpenicilina, ampicilina, oxacilina e cefotaxime) em 100% dos 191 isolados de *S. equi*, oriundos de equinos. Também um estudo realizado na Escola Veterinária de Ontário, no Canadá, mostrou que 97% dos isolados clínicos de *S. equi* foram sensíveis à penicilina (Weese et al. 2008). Penicili-

na e sulfazotrim são usualmente utilizadas como fármacos de primeira escolha para o tratamento de infecções por *S. equi* em equinos (Luque et al. 2006). Também foi observada sensibilidade >90% em um estudo sobre o tratamento de sinusites e infecções das bolsas gútrais em equinos (Clark et al. 2008), o que ratifica o resultado encontrado no presente trabalho. Este dado é contrastante com as declarações dos médicos veterinários clínicos de falhas nos tratamentos de adenite equina (comunicações pessoais) quando utilizam penicilina, antimicrobiano de eleição. Isto pode ser atribuído às considerações de Yelle (1987) de que a utilização da terapia antimicrobiana após a formação dos abscessos nos linfonodos dos equinos pode prolongar o curso da infecção e dificultar a cura. Também as concentrações da penicilina em produtos comerciais bem como condutas terapêuticas inapropriadas, podem justificar as discrepâncias dos resultados obtidos *in vitro* e *in vivo* frente às amostras de *S. equi*.

Ainda na classe dos beta-lactâmicos, pode-se observar que ocorreu uma resistência de 8% à oxacilina e amoxicilina; este fato pode estar relacionado ao espectro de ação desses antimicrobianos. Prescott (2004) relata que a combinação de espectro, fármacos inibidores de beta-lactamases e o aumento da eficiência podem estar relacionados à resistência adquirida à estes antimicrobianos.

Alerta-se que possam ocorrer interações entre antimicrobianos, principalmente de natureza farmacodinâmica (Saraiva et al. 1997, Lopardo 2007). Por isso, é importante que o médico veterinário respeite os parâmetros como a susceptibilidade do agente infectante, propriedades farmacocinéticas do medicamento e toxicidade potencial antes da administração de antimicrobianos, o que pode justificar falhas nos tratamentos (Prescott 2004).

A resistência das subespécies de *S. equi* à classe das fluorquinolonas foi inferior à observada nos isolados clínicos deste gênero bacteriano na Escola Veterinária de Ontário, no Canadá (33%) e pelo Instituto Nacional de Veterinária de Uppsala na Suécia (100%) (Weese et al. 2008). Este fato pode ser explicado pelas diferenças nas populações estudadas. Ressalta-se a menor relevância destes resultados na terapia de infecções produzidas por *S. equi*, uma vez que a enrofloxacinina deve ser evitada em potros devido aos efeitos adversos, como artropatias, nessa faixa etária bem como atividade limitada para esse gênero bacteriano (Yoon et al. 2004).

A maior frequência dos isolados resistentes à tetraciclina ocorreu no grupo do *S. equi* subsp. *zooepidemicus*; este resultado foi ao encontro dos obtidos por Clark et al. (2008) no Canadá, onde observaram que 26,7% dos isolados de *S. equi* subsp. *zooepidemicus* eram resistentes à tetraciclina. Lopardo (2007) observou resistência de 72,4% de amostras de *S. agalactiae* isoladas de humanos frente à tetraciclina num trabalho realizado na Argentina. A utilização das tetraciclinas em equinos tem sido evitada devido à tendência de supressão da microbiota intestinal normal e à superinfecção com *Salmonella* sp. ou *Clostridium difficile* (Prescott 2004).

A concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) são parâmetros amplamente utilizados na avaliação da susceptibilidade antimicrobiana, normalmente estão relacionadas com a farmacocinética e estimativa de dosagem do fármaco para determinação dos organismos resistentes ou susceptíveis aos antimicrobianos (Prescott & Yielding 1990).

Segundo o CLSI não existe um número de *breakpoints* para a interpretação de CIM e CBM de benzilpenicilina para *S. equi*. De acordo com o CLSI (2009), valores de CIM <0,12µg/mL para estreptococos beta-hemolítico os classifica como sensíveis à penicilina. Portanto, os resultados obtidos através do método de disco difusão foram confirmados pela CIM de benzilpenicilina, assegurando a correlação dos resultados. Em outro estudo, Tracy et al. (2001) avaliaram a susceptibilidade de 44 isolados de *S. milleri* frente à penicilina; CIM <0,12µg/mL confirmaram a sensibilidade desta espécie a este antimicrobiano. No entanto, Heffelfinger et al. (2000) interpretam como sensível quando a CIM for <1,00µg/mL de penicilina para *Streptococcus pneumoniae*. Pesquisa envolvendo *Enterococcus faecalis*, demonstrou sensibilidade à penicilina para valores de 1,2-4,8µg/mL (Zimmermann et al. 1971). Os valores de benzilpenicilina na CIM₅₀ = 0,0093µg/mL foram aproximadamente três vezes inferior às concentrações relatadas por Breiman & Silverblatt (1986), onde um isolado humano de *S. equi* requereu uma CIM = 0,025µg/mL para penicilina. Portanto, constatou-se que os valores CIM e CBM de benzilpenicilina para *S. equi* foram inferiores quando comparados aos outros estudos.

Cabe ressaltar que os níveis de resistência são sempre definidos em relação às concentrações do soro baseados nos *breakpoints* propostos pelo NCCLS, contudo não dizem respeito a concentrações do antimicrobiano no sítio da infecção (Fong & Drlica 2008). Segundo Firth et al. (1986) as concentração plasmáticas máximas e mínimas de penicilina variaram de 1,86 a 0,4µg/mL, também variando com a via de aplicação e tempo após administração (valores 200 e 45 vezes superiores) aos obtidos na CIM média de benzilpenicilina para *S. equi* neste estudo.

Os dados de resistência provenientes de hospital/estabelecimento de criação devem ser interpretados com cautela, uma vez que a cultura e teste de susceptibilidade não são normalmente realizados antes de um tratamento inicial, em cavalos que estão sendo assistidos em hospitais. Geralmente os dados publicados na literatura científica são baseados em infecções refratárias previamente tratadas com um ou mais antimicrobianos. Estes vieses de seleção tendem a sobrevalorizar os níveis reais de resistência antimicrobiana e têm de ser considerados para uma interpretação correta dos dados sobre a prevalência da resistência. Diferenças metodológicas (métodos e critérios utilizados para a medição e definição de resistência) também devem ser consideradas quando se comparam os resultados comunicados por diferentes laboratórios. Da mesma forma, é importante considerar tais divergências, sobretudo quando comparam-se amostras de diferentes países (Weese et al. 2008).

Por fim, a utilização prudente e racional dos antimicrobianos deve ser considerada como uma importante questão ética na profissão veterinária, principalmente relacionada aos regimes de dosagens e administração adequada de cada fármaco. A abordagem global e os princípios básicos preconizados por organizações internacionais para minimizar o possível impacto do uso de antimicrobianos em animais sobre saúde pública são: a prevenção de doenças como uma ferramenta para reduzir o uso de antimicrobianos; diagnóstico preciso e teste de susceptibilidade antimicrobiana; justificativa para o uso de antimicrobianos; escolha de um produto antimicrobiano e via de administração apropriada; posologia adequada; aspectos éticos relacionados à prescrição e fornecimento de medicamentos antimicrobianos (Guardabassi et al. 2008).

CONCLUSÕES

A resistência múltipla aos antimicrobianos dos isolados representa um risco potencial para a saúde dos animais e uma ameaça à saúde pública.

Todos os isolados de *Staphylococcus equi* foram sensíveis à penicilina e sulfazotrim o que confirma a eleição destes antimicrobianos para o tratamento das infecções por este agente na clínica veterinária.

A concentração inibitória mínima (CIM), concentração bactericida mínima (CBM) apresentam relação com o diâmetro do halo de inibição da penicilina para isolados de *S. equi*.

Agradecimentos.- À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida e suporte financeiro; aos colaboradores do Laboratório de Bacteriologia da Universidade Federal de Santa Maria (Labac-UFSM), pela ajuda no desenvolvimento desse trabalho.

REFERÊNCIAS

- Breiman R.F. & Silverblatt F.J. 1986. Systemic *Streptococcus equi* infection in a horse handler: A case of human strangles. West J. Med. 145:385-386.
- Chanter N., Ward C.L., Talbot N.C., Flanagan J.A., Binns M., Houghton S.B., Smith K.C. & Mumford J.A. 1999. Recombinant hyaluronate associated protein as a protective immunogen against *Streptococcus equi* and *Streptococcus zooepidemicus* challenge in mice. Microbiol. Pathol. 27:133-143.
- Clark C., Greenwood S., Boison J.O., Trejo M.C. & Dowling P.M. 2008. Bacterial isolates from equine infections in Western Canada (1998-2003). Can. Vet. J. 49:153-160.
- CLSI 2003. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically. Document M7-A6, Approved Standard. Clinical and Laboratory Standards Institute. 6th ed. Wayne. 53p.
- CLSI 2009. Antimicrobial Susceptibility Testing M100-S19: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 19th Informational Supplement, Clinical and Laboratory Standards Institute Wayne. 77p.
- Facklam R. 2002. What happened to the Streptococci: Overview of taxonomic and nomenclature changes. Clin. Microbiol. Rev. 15:613-630.
- Feary D.J., Hyatt D., Traub J.D., Roach S., Jones R.L., Wu C.C. & Morley P.S. 2005. Investigation of falsely reported resistance of *Strep-*

- Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* isolates from horses to trimethoprim-sulfamethoxazole. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17:483-486.
- Firth E.C., Nouws J.F., Driessens F., Schmaetz P., Peperkamp K. & Klein W.R. 1986. Effect of the injection site on the pharmacokinetics of procaine penicillin G in horse. *Am. J. Vet. Res.* 47:2380-2384.
- Grant S.T., Efstratiou A. & Chanter N. 1993. Laboratory diagnosis of strangles and the isolation of atypical *Streptococcus equi*. *Vet. Rec.* 133:215-216.
- Guardabassi L., Jensen L.B. & Kruse H. 2008. Guide to Antimicrobial Use in Animals. Blackwell Publishing, Oxford. 223p.
- Harrington D.J., Sutcliffe I.C. & Chanter N. 2002. The molecular basis of *Streptococcus equi* infection and disease. *Microbes Infect.* 4:501-510.
- Heffelfinger J.D., Dowell S.F., Jorgensen J.H., Klugman K.P., Mabry L.R., Musher D.M., Plouffe J.F., Rakowsky A., Schuchat A. & Whitney C.G. 2000. Management of community-acquired pneumonia in the era of pneumococcal resistance: A report from the Drug-Resistant *Streptococcus pneumoniae* Therapeutic Working Group. *Arch. Intern. Med.* 160:1399-1408.
- Holden M.T., Heather Z., Paillot R., Steward K.F., Webb K., Ainslie F., Jourdan T., Bason N.C., Holroyd N.E., Mungall K., Quail M.A., Sanders M., Simmonds M., Willey D., Brooks K., Aanensen D.M., Spratt B.G., Jolley K.A., Maiden M.C., Kehoe M., Chanter N., Bentley S.D., Robinson C., Maskell D.J., Parkhill J. & Waller A.S. 2009. Genomic Evidence for the Evolution of *Streptococcus equi*: Host restriction, increased virulence, and genetic exchange with human pathogens. *PLoS. Pathog.* 5(3):e1000346. Epub.
- Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C. & Winn Jr W.C. 2001. Diagnóstico Microbiológico. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1465p.
- Krumperman P.H. 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 46:165-1670.
- Kuwamoto Y., Anzay T. & Wada R. 2001. Microplate sugar-fermentation assay distinguishes *Streptococcus equi* from other streptococci of Lancefield's group C. *J. Equine Vet. Sci.* 12:47-49.
- Lancefield R.C. 1933. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 57:571-595.
- Lindsay A.M., Zhang M., Mitchell Z., Holden M.T., Waller A.S., Sutcliffe I.C. & Black G.W. 2009. The *Streptococcus equi* prophage-encoded protein SEQ2045 is a hyaluronan-specific hyaluronate lyase that is produced during equine infection. *Microbiology* 155:443-449.
- Lopardo H. 2007. Antimicrobial resistance in β -hemolytic streptococci in Argentina. *Commun. Curr. Res. Educ. Top. Tre. Appl. Microbiol.* 2:794-798.
- Luque I., Fernández-Garrayzabal J.F., Blume V., Maldonado A., Astorga R. & Tarradas C. 2006. Molecular typing and anti-microbial susceptibility of clinical isolates of *Streptococcus equi* spp. *zooepidemicus* from equine bacterial endometritis. *J. Vet. Med. B* 53:451-454.
- McKenzie H.C. & Murray M.J. 2004. Concentrations of gentamicin in serum and bronchial lavage fluid after once-daily aerosol administration to horses for seven days. *Am. J. Vet. Res.* 65:173-178.
- Murari A.L., Carvalho F.H. & Heinzmann B.M. 2008. Composição e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Senecio crassiflorus* var. *crassiflorus*. *Quim. Nova* 31:1081-1084.
- NCCLS 1999. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Ninth Informational Supplement M100-S9 19:104.
- Prescott J.F. & Yieldin K.M. 1990. *In vitro* susceptibility of selected veterinary bacterial pathogens to ciprofloxacin, enrofloxacin and norfloxacin. *Can. J. Vet. Res.* 54:195-197.
- Prescott J.F. 2004. Antimicrobial Chemotherapy, p.26-43. In: Hirsh D.C., MacLachlan N.J. & Walker R.L. (Eds), *Veterinary Microbiology*. 2nd ed. Blackwell Publishing, Ames, Iowa.
- Prescott J.F. & Baggot J.D. 1994. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. 2nd ed. Blackwell, Ames, Iowa. 612p.
- Poole K. 2005. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J. Antimicrob. Chemotherapy* 56:20-51.
- Quinn P.J., Carter M.E., Markey B. & Carter G.R. 1994. *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe Publishing, London. 648p.
- Saraiva I.H., Jones R.N., Erwin M. & Sader H.S. 1997. Avaliação da sensibilidade a antimicrobianos de 87 amostras clínicas de enterococos resistentes à vancomicina. *Revta Assoc. Med. Bras.* 43:217-222.
- Spinosa H.S., Górnica S.L. & Bernardi M.M. 2006. Farmacologia Aplicada à Medicina Veterinária. 4th ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 897p.
- SAS 2001. Statistical Analysis System User's Guide: Statistics, version 8.2. Statistical Analysis System Institute, Cary. 1686p.
- Sweeney C.R., Timoney J.F., Newton J.R. & Hines M.T. 2005. *Streptococcus equi* infections in horses: Guidelines for treatment, control, and prevention of strangles. *J. Vet. Intern. Med.* 19:123-134.
- Timoney J.F. 2004. The pathogenic equine streptococci. *Vet. Res.* 35:397-409.
- Timoney J.F., Artiushin S.C. & Boschwitz J.S. 1997. Comparison of the sequences and functions of *Streptococcus equi* M-Like SeM and SzPSe. *Infect. Immun.* 65:3600-3605.
- Tracy M., Wanahita A., Shuhatovich Y., Goldsmith E.A., Clarridge J.E. & Musher D.M. 2001. Antibiotic susceptibilities of genetically characterized *Streptococcus milleri* group strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:1511-1514.
- Trolldenier H., Klarmann D., Krabisch P., Rohde J., Steiner A. & Verspohl J. 2000. Sensitivity of bovine and equine streptococci to beta-lactam antibiotics (benzylpenicillin, ampicillin, oxacillin, cefotaxime) in the agar diffusion and E-test. *Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr.* 113:234-245.
- Waller A.S. & Jolley K.A. 2007. Getting a grip on strangles: Recent progress towards improved diagnostics and vaccines. *Vet. J.* 173:492-501.
- Wesse J.S., Baptiste K.E., Baverude V. & Toutain P.L. 2008. Guidelines for antimicrobial use in horses, p.161-182. In: Guardabassi L., Jesdner L.B., Kruse H. (Eds), *Guide to Antimicrobial Use in Animals*. Blackwell Publishing, Oxford.
- Yelle M.T. 1987. Clinical aspects of *Streptococcus equi* infection. *Equine Vet. J.* 19:158-162.
- Yoon J.H., Brooks Jr R.L., Khan A., Pan H., Bryan J., Zhang J., Budberg S.C., Mueller P.O.E. & Halper J. 2004. The effect of enrofloxacin on cell proliferation and proteoglycans in horses tendon cells. *Cell Biol. Toxicol.* 20:41-54.
- Zimmermann R.A., Moellering Jr R.C. & Weinberg A.N. 1971. Mechanism of resistance to antibiotic synergism in enterococci. *J. Bacteriol.* 105: 873-879.