

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
LARISSA SILVEIRA BOTONI

Prevalência de *Staphylococcus pseudintermedius*
resistente à metilina (MRSP) em cães com
piodermite superficial atendidos no
Hospital Veterinário da UFMG
entre março e julho de 2013

BELO HORIZONTE
2013

LARISSA SILVEIRA BOTONI

Prevalência de *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticilina (MRSP) em cães com piodermite atendidos no Hospital Veterinário da UFMG entre março e julho de 2013.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Medicina e Cirurgias Veterinárias

Orientadora: Prof. Dra. Fabíola de Oliveira Paes Leme

BELO HORIZONTE
ESCOLA DE VETERINÁRIA DA UFMG
2013

B745p Botoni, Larissa Silveira, 1986-
Prevalência de *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à metilina (MRSP) em cães com piodermite atendidos no Hospital Veterinário da UFMG entre março e julho de 2013 / Larissa Silveira Botoni. – 2013.

52 p. : il.

Orientadora: Fabíola de Oliveira Paes Leme
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

1. Cão – Doenças – Teses. 2. Pele – Doenças – Teses. 3. Agentes antibacterianos – Teses. 4. Infecções estafilocócicas – Teses. I. Leme, Fabíola de Oliveira Paes.
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.708 965

ASSINATURA DA BANCA

Ao Mateus, meu maior e melhor companheiro.

À minha família, que dá sentido a tudo.

Aos animais, fonte de inspiração.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter guiado o caminho e me segurado nos momentos difíceis.

Ao Mateus, companheiro de vida, por acreditar nos meus sonhos e contribuir para que eles se realizem. Obrigada por entender os momentos difíceis. À minha família por darem sentido ao dia a dia e me apoiarem sempre em todas as horas.

À Tia, por ter guiado meus passos e me acompanhado sempre com amizade e sabedoria. Serei eternamente grata.

À Fabíola por ter me acolhido e orientado brilhantemente estes dois anos, contribuiu muito para o meu crescimento.

Aos Professores colaboradores Marcos Bryan, Francisco Lobato e Andrey Lage, muito obrigada pelo apoio essencial na parte microbiológica.

Ao Professor Carlos Eduardo Larsson por se disponibilizar para avaliar e contribuir com o nosso trabalho.

Aos alunos e funcionários do Departamento de Preventiva, em especial Rodrigo Otávio, Fernanda Morcatti e Gustavo Pawlowsky, sem vocês este trabalho não chegaria ao fim.

Ao aluno de iniciação científica Lucas Braga pelo excelente trabalho.

Aos Professores Lissandro da Conceição e à colega Elisa Bourguignon por cederem as amostras teste.

À Carolina Scherer pela ajuda e parceria fundamental.

A todos os amigos, obrigada por fazerem parte da minha vida e entenderem a ausência necessária.

A todos os colegas do HV-UFGM.

À CAPES e CNPq.

A todos os animais envolvidos no experimento e aos meus queridos cães pelo amor incondicional.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1	Introdução.....	14
2.2	Microbiota cutânea de cães.....	14
2.3	Piodermite bacteriana superficial.....	17
2.4	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	18
2.5	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> Resistente à Meticilina (MRSP).....	20
2.5.1	Definição e epidemiologia.....	20
2.5.2	Identificação de MRSP.....	23
2.5.3	Distribuição mundial de MRSP.....	23
2.5.4	Tratamento de piodermite por MRSP.....	24
3	OBJETIVOS E HIPOTETESES.....	25
3.1	Hipoteses.....	25
3.2	Objetivos Gerais.....	25
3.3	Objetivos Específicos.....	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1	Animais.....	26
4.2	Coleta de material, processamento de amostras e avaliação fenotípica.....	26
4.2.1	Isolamento bacteriano.....	26
4.2.2	Avaliação fenotípica e identificação de <i>S. pseudintermedius</i>	27
4.3	Antibiograma.....	29
4.4	Avaliação genotípica.....	30
4.4.1	Extração de DNA.....	30
4.4.2	Identificação do gene <i>mecA</i>	31
4.4.3	Identificação genotípica de <i>S. pseudintermedius</i>	31
4.4	Análise estatística.....	32
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1	Características gerais do grupo amostral.....	32
5.2	Identificação fenotípica e genotípica das amostras coletadas.....	35
5.2.1	Prevalência de SIG nos isolados avaliados por provas bioquímicas.....	35
5.2.2	Identificação genotípica de <i>S. pseudintermedius</i>	37
5.2.3	Correlações entre isolamento bioquímico e identificação genotípica.....	38
5.3	Antibiograma.....	38
5.4	Identificação do gene <i>mecA</i>	41
5.5	Correlações entre antibiograma, identificação de gene <i>mecA</i> e antibioticoterapia prévia.....	42
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
7	CONCLUSÕES.....	44
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
9	ANEXOS.....	50

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS:

Figura 1: Exame citológico de lesão em colarinho epidérmico de animal com piodermite superficial.	27
Figura 2: Isolamento primário em ágar sangue.....	27
Figura 3: Isolamento secundário de amostras selecionadas em ágar Mueller Hinton.....	28
Figura 4: Provas bioquímicas.....	30
Figura 5: Teste da urease.....	32

LISTA DE GRÁFICOS:

Gráfico 1: Distribuição de machos e fêmeas no grupo amostral (n= 43).....	34
Gráfico 2: Distribuição da idade em anos dos pacientes selecionados (n=43).....	34
Gráfico 3: Distribuição racial no grupo amostral (n=43).....	36
Gráfico 4: Utilização prévia de antimicrobianos baseada em questionário.....	36
Gráfico 5: Prevalência de SIG por provas bioquímicas (n=86).....	39
Gráfico 6: Prevalência de SIG por PCR (n=68).....	41

LISTA DE QUADROS:

Quadro 1: Diferenciação fenotípica de cocos Gram-positivo.....	28
Quadro 2: Diferenciação entre SIG e outros estafilococos isolados em cães	31
Quadro 3: Perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas.....	39
Quadro 4: Padrão para interpretação de diâmetro de halos formados em antibiograma com discos impregnados de antimicrobianos.....	40

LISTA DE TABELAS:

Tabela 1: Correlação entre identificação fenotípica e genotípica e entre espécie identificada por PCR na narina e na lesão.....	38
Tabela 2: Correlações entre antibiograma, identificação de gene <i>mecA</i> e antibioticoterapia prévia.....	43

RESUMO

O *Staphylococcus pseudintermedius* é a bactéria mais comumente isolada de cães e está frequentemente associada à piодermite e otites nesses animais. Atualmente, tem sido descrito o *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à metilicina (MRSP). Estes microorganismos são portadores do gene *mecA*, responsável pela transcrição da proteína PBP2a que reduz a susceptibilidade dessas bactérias a todos os antibióticos betalactâmicos. O objetivo deste estudo foi avaliar a prevalência de MRSP em cães com piодermite superficial atendidos no Hospital Veterinário da UFMG. Foram selecionados para o estudo 43 cães com piодermite superficial diagnosticados por exame físico e dermatológico entre março e julho de 2013. Dos animais selecionados, 75% tinham histórico de antibioticoterapia prévia. Foram coletadas amostras em haste de algodão estéril de secreção de lesões de pele e narina direita. As amostras foram cultivadas em ágar sangue de carneiro e, posteriormente, avaliadas fenotipicamente e genotipicamente. Na identificação fenotípica, 88% dos isolados foram classificados como bactéria do SIG (*Staphylococcus pseudintermedius* Group). Na identificação genotípica para classificação como *Staphylococcus pseudintermedius*, este número cresceu para 91%, demonstrando correlação significativa com o resultado da identificação bioquímica. Observou-se correlação significativa entre a espécie identificada nas lesões de pele e narinas. No antibiograma a prevalência de resistência foi de 7% a amicacina, 23% a amoxicilina + clavulanato, 24% a cefalexina, 18% ao cloranfenicol, 38% a enrofloxacina, 40% a estreptomicina, 30% a gentamicina, 34% a oxacilina, 77% a penicilina, 6% a polimixina B, 62% a tetraciclina e 77% a sulfa + trimetoprim. Trinta e cinco por cento das amostras apresentava o gene *mecA*, demonstrando correlação significativa com a frequência de resistência à oxacilina. Observou-se também correlação significativa entre a prevalência de *mecA* nas narinas e lesões de pele. Não houve correlação entre a antibioticoterapia prévia e a frequência de gene *mecA* nas amostras. Desta forma, conclui-se que o *S. pseudintermedius* é a bactéria mais prevalente em piодermite canina e o gene *mecA* está significativamente presente nas lesões e narinas dos animais testados.

Palavras-chave: doenças de cão, doença de pele, infecções estafilocócicas, antibacterianos, oxacilina, *mecA*, SIG, MRSP.

ABSTRACT

Staphylococcus pseudintermedius is the most commonly isolated bacteria in dogs and is often associated with pyoderma and otitis in these animals. In the past years, methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) was described. These microorganisms have in their genome the *mecA* gene, responsible for the transcription of the PBP2a protein that reduces the susceptibility of these bacteria to all beta-lactamic antibiotics. The aim of this study was to evaluate the frequency of MRSP in dogs with superficial pyoderma presented at the Veterinary Hospital of UFMG. Forty-three dogs with superficial pyoderma were selected for the study diagnosed by physical and dermatological examination from March to July of 2013. From the selected animals, 75% had a history of prior antibiotic therapy. The samples were collected in sterile swab secretion of skin lesions and right nostril and were streaked on sheep blood agar and subsequently evaluated phenotypically and genotypically. At the phenotypic identification, 88% of the isolates were classified as SIG (*Staphylococcus pseudintermedius* Group). At the genotypic identification for classification as *Staphylococcus pseudintermedius*, this number grows to 91%, showing a significant correlation with the result of biochemical identification. A significant correlation between the species identified in skin lesions and nostrils. In the antibiogram, prevalence of resistance was amikacin 7% to 23% amoxicillin + clavulanate, 24% cephalexin, chloramphenicol 18%, 38% enrofloxacin 40% streptomycin, gentamicin 30%, 34% oxacillin, 77% penicillin, polymyxin B 6%, 62% and 77% tetracycline trimethoprim sulfa. Thirty-five percent of the samples had the *mecA* gene, demonstrating a significant correlation with the prevalence of oxacillin resistance. We also observed a significant correlation between the frequency of *mecA* in the lesions and nostrils. There was no correlation between previous antibiotic therapy and frequency of *mecA* gene in samples. In conclusion, *S. pseudintermedius* is the most common bacteria in canine pyoderma and the *mecA* gene is present in significant frequency in the lesions and nostrils of the tested animals.

Key words: dog diseases, skin disease, staphylococcal infections, antibiotics, oxacillin, *mecA*, SIG, MRSP.

1 INTRODUÇÃO

A dermatologia representa cerca de 40% da casuística total da clínica veterinária. Dentre estes casos dermatológicos, se destaca a piodermite superficial, que é a dermatopatia mais frequente. (Hill et al., 2006; Miller et al., 2013). As piodermites são, em sua maioria, secundárias a causas primárias tais como alergias, distúrbios de queratinização e endocrinopatias. Devido ao seu caráter secundário a doenças crônicas, existe forte tendência à recorrência, o que requer vários ciclos de terapia antimicrobiana de longa duração, que é a base do tratamento destas afecções. As drogas de escolha para piodermites bacterianas são os antibióticos betalactâmicos. O agente etiológico mais comum da piodermite é o *Staphylococcus pseudintermedius*. (Hnilica, 2012; Miller et al, 2013).

Desde a década de 80, tem sido descrito o *S. pseudintermedius* resistente à meticilina (MRSP), semelhante ao que ocorre com o *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA), patógeno muito relevante na Medicina, sobretudo em infecções hospitalares graves. MRSP em Medicina

Veterinária tem se tornado relevante devido à sua frequência crescente nas piodermite bacterianas recorrentes, dificultando ainda mais o tratamento. A ligação das drogas betalactâmicas à parede celular da bactéria se dá através da proteína PBP. Quando a bactéria é portadora do gene *mecA*, este faz a transcrição de PBP2a, que não se liga aos betalactâmicos, gerando resistência a todas as drogas da classe (Maranan, 1997; Andrade, 2002; Bannoehr e Guardabassi, 2012; Miller et al., 2013).

A frequência de resistência à meticilina em cães tem crescido significativamente ao longo das décadas. Desta forma, é essencial que os clínicos se conscientizem da importância do uso responsável de drogas antimicrobianas no que tange a escolha correta do medicamento, dose ideal e tempo de tratamento. Além disso, é imprescindível que se acrescente à rotina clínica a realização de antibiograma, sobretudo nos casos de recorrência de infecções ou tratamento ineficientes (Weese e Van Duijkeren, 2010; Beck et al, 2012, Miller et al 2013).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Introdução

Os casos dermatológicos são muito prevalentes na clínica de pequenos animais (Hill et al., 2006; Miller et al., 2013). Estima-se que 30 a 40% de todos os animais examinados na rotina clínica veterinária apresentem dermatopatias como queixa principal ou como doença secundária (Ihrke, 1996; Miller et al., 2013) Em pesquisa realizada em 2001 nos Estados Unidos, notou-se que, em 17 hospitais veterinários ligados a instituições de ensino, as doenças dermatológicas mais frequentes, em ordem decrescente foram: dermatite alérgica à picada de ectoparasitas (DAPE), piodermite bacteriana, seborreia, dermatites alérgicas, demodicose, escabiose, dermatoses

imunomediadas, dermatoses endócrinas e dermatite acral por lambedura (Miller et al., 2013).

A pele dos animais é responsável pela formação de uma barreira protetora fundamental à vida e possui diversos mecanismos, dentre eles componentes físicos, químicos e microbiológicos. Os pelos formam a linha de defesa física contra a entrada de patógenos, mas também são capazes de albergá-los. Logo abaixo deles, está a camada córnea da epiderme que é composta por queratinócitos e uma emulsão de secreção sebácea, além de ácidos graxos, que juntos formam uma efetiva barreira física e química contra possíveis agentes invasores (Miller et al., 2013).

2.2 Microbiota cutânea de cães

A microbiota cutânea pode ser dividida em residente e transitória. Os microrganismos residentes são aqueles que são adquiridos da mãe no período neonatal, persistem por toda a vida do animal e são capazes de proliferar na pele íntegra. As bactérias residentes

mais comumente encontradas colonizando a superfície da pele de cães são: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus xylosum*, *Streptococcus spp*, *Clostridium spp*, *Propionibacterium acnes*, *Acinetobacter spp*, dentre outras. Os

pelos e folículos pilosos aparentemente apresentam sua própria microbiota residente, sendo composta em sua maioria por *Bacillus spp*, *Micrococcus spp*, *Staphylococcus pseudintermedius* e outras bactérias Gram negativas aeróbias. Microrganismos transitórios podem ser isolados de pele saudável, mas não têm importância clínica a não ser que estejam envolvidos em processos patológicos. Os mais comumente isolados são: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Corynebacterium spp* e *Pseudomonas spp* (Harvey e Lloyd, 1995; Miller et al., 2013).

As bactérias residentes da pele contribuem muito para defesa, estando as bactérias localizadas na epiderme superficial e infundíbulo dos folículos pilosos. Esses microrganismos vivem em simbiose provavelmente trocando fatores de crescimento e são adquiridos da mãe no período neonatal. Esta relação íntima entre o microrganismo e o hospedeiro permite que essas bactérias ocupem nichos microbiológicos e impeçam a colonização de outros patógenos (Miller et al., 2013).

No passado, debatia-se se o *S. pseudintermedius* fazia parte da

microbiota residente ou transitória. Atualmente, sabe-se que um mesmo animal pode albergar em seu corpo distintas cepas diferentes da bactéria, algumas dominantes que persistem por toda a vida e outras transitoriamente presentes. O número de microrganismos pode variar de acordo com a localização no corpo, sendo as áreas mais úmidas (mento, interdígitos, abdômen e axilas) as mais intensamente colonizadas. Em processos patológicos, as espécies de bactérias encontradas e seu número pode variar. Em pacientes com determinadas dermatopatias, tais como alergias e seborreia, o número de bactérias aumenta, não só no local da lesão, como na pele como um todo (Harvey e Lloyd, 1995; Saijonmaa-Koulumies e Lloyd, 1996; Miller et al., 2013;).

O *Staphylococcus pseudintermedius* pode ser frequentemente isolado de narinas, orofaringe, região perianal e axilas tanto de animais saudáveis como daqueles com piodermite. Sendo estes locais classificados como reservatórios da bactéria, que pode servir como fonte para uma próxima infecção. Contudo, o estado geral do animal deve ser determinado antes de se avaliar a colonização pela bactéria. Observa-se assim que indivíduos atópicos são mais

colonização nas áreas de reservatório do microrganismo quando comparados a animais saudáveis (Bannoehr e Guardabassi, 2012; Beck et al., 2012; Miller et al., 2013). Apesar de as características de colonização por *S. pseudintermedius* em cães não ser completamente definidas ainda, alguns estudos sugerem que mais da metade dos animais sejam portadores perenes do microrganismo nos locais reservatórios, mas o estado de portador intermitente ou mesmo de não portador também pode existir (Wertheim et al., 2005; Bannoehr e Guardabassi, 2012).

Sempre se especulou os motivos pelos quais apenas um pequeno número do vasto grupo de bactérias ambientais é capaz de colonizar ou infectar a pele de animais. Atualmente, concluiu-se que a capacidade de se aderir ao tegumento do hospedeiro é um pré-requisito para que isso aconteça. A adesão é uma via de mão dupla entre as células epidérmicas e as bactérias, que possuem moléculas específicas que se ligam em receptores também específicos do hospedeiro. Alguns fatores que aumentam a aderência do microrganismo no tegumento são: temperatura elevada, aumento do tempo de contato, maior concentração de bactéria e presença de certos processos patológicos. Cepas de

S. pseudintermedius de cães com piodermite têm demonstrado maior capacidade de adesão aos corneócitos. Por outro lado, corneócitos de cães atópicos têm uma ligação mais forte ao *S. pseudintermedius*, aumentando assim a probabilidade de ocorrência da infecção (Harvey e Noble, 1994; Miller et al., 2013).

É importante frisar a diferença entre os termos colonização e infecção. Presença de microrganismos isolados do interior de pústulas ou pápulas intactas é indicativo de infecção, principalmente se houver presença de células inflamatórias em pleno processo de fagocitose. Colonização significa que um patógeno em potencial está habitando o organismo do hospedeiro, mas ainda não está causando nenhuma reação, mormente quando inexistem células inflamatórias em atividade fagocitária. O desafio em se avaliar os resultados de uma cultura de amostras obtidas de piodermite canina está em distinguir colonização de infecção. Nestes casos, exames citológicos diretos de exsudatos das lesões podem ser mais informativos que culturas, pois a presença de neutrófilos degenerados e bactérias fagocitadas são evidências de infecção e significam resposta do hospedeiro (Miller et al., 2013).

2.3 Piodermite bacteriana superficial

A piodermite bacteriana superficial é uma das dermatopatias mais frequentes em cães e trata-se de uma infecção dos folículos pilosos e epiderme adjacente que é, na grande maioria das vezes, secundária a causas de base tais como alergias e endocrinopatias. As lesões tegumentares mais comuns são: pápulas, pústulas, colarinhos epidérmicos, crostas melicéricas, eritema, alopecia circular e hiperpigmentação. Quando comparado com humanos e outros animais domésticos, a piodermite é muito mais comum em cães. As razões para essa maior susceptibilidade desses animais não são ainda claramente esclarecidas, mas provavelmente inclui fatores fisiológicos e anatômicos. O estrato córneo de cães, camada mais superficial da epiderme responsável pela barreira epidérmica, é mais fina que a de outras espécies, possui escassez de lipídios extracelulares e o pH é mais alto (Gortel, 2013; Miller et al., 2013).

O *Staphyococcus pseudintermedius* é apontado como o principal agente etiológico de piodermite em cães. Contudo, este microrganismo, por ser um residente do tegumento do animal,

não causa infecção em pele íntegra. Assim, quase sempre, qualquer infecção cutânea deve ser considerada como enfermidade secundária de doença primária dermatológica, metabólica ou imunológica. As causas de base mais comuns de piodermite são: alergias, disqueratinização, hiperadrenocorticismos e hipotireoidismo (Hnilica, 2012; Gortel 2013; Miller et al., 2013).

Outra forma da enfermidade tegumentar descrita é a piodermite recorrente idiopática, conhecida por ser caracteristicamente primária, ou seja, há ausência de evidências de doença de base. Sua ocorrência é mais rara em comparação com a piodermite secundária. Observa-se tendência a repetição, sendo necessários vários cursos de antibioticoterapia e até terapia constante para controle das infecções. As características mais comuns de piodermite primária recorrente são: desaparecimento completo das lesões tegumentares após antibioticoterapia, sem doença residual e recidiva em um período entre quatro semanas a seis meses após a interrupção da terapia (Hnilica, 2012; Miller et al., 2013).

Entretanto, a existência real desta enfermidade é discutida. Os autores questionam se na verdade, decorreria de alguma causa primária ainda não estabelecida ou de infecção secundária a injúria transitório à pele (Hnilica, 2012; Miller et al., 2013).

A conduta mais indicado para a terapia das piодermites superficiais é a identificação e controle da causa de base. O uso de antimicrobianos por, no mínimo, três a quatro semanas com manutenção por duas a três semanas após a resolução do quadro é preconizado. Além disso, banhos intervalados, de dois a sete dias com xampu

2.4 *Staphylococcus pseudintermedius*

O gênero *Staphylococcus* compreende uma variedade de patógenos oportunistas de relevância variável na medicina veterinária e as espécies mais importantes são o *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus pseudintermedius*, que outrora eram classificado como *Staphylococcus intermedius* (Devriese et al., 2005, Kwon et al., 2006).

O *Staphylococcus pseudintermedius*, é oportunista que habita a pele, os tratos nasal, intestinal e as mucosas de

antibacteriano à base de substâncias com potencial antisséptico como clorexidine ou peróxido de benzoíla, também são recomendados. Os antibióticos de escolha são a cefalexina ou outras cefalosporinas, a amoxicilina com ácido clavulânico, mas outros podem ser selecionados com base no antibiograma. Entretanto, é fundamental que a causa primária seja determinada e adequadamente corrigida afim de se evitar resistência bacteriana por uso prolongado de antimicrobianos. Quando a essa é observada, o tratamento torna-se um grande desafio para o clínico (Hnilica, 2012; Miller, 2013).

animais hígidos. Pertence à Família *Micrococcaceae* e tem sido apontado como o principal agente causador de piодermite e otite externa em cães (Ihrke, 1987; Harvey e Lloyd, 1994; Miller et al., 2013). São cocos Gram positivos e agrupam-se na forma de cachos de uva. Suas colônias são de tamanho médio, coloração esbranquiçada e opaca e constitui cerca de 90% dos estafilococos isolados de cães saudáveis ou com piодermite. (Bannoehr e Guardabassi, 2012).

Até o ano de 1976, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus hyicus* eram consideradas as bactérias patogênicas isoladas de cães. Naquele ano foi identificado o *Staphylococcus intermedius*, espécie formada dos biotipos E e F do *S. aureus*, comumente associados com infecções em cães, raposas e pombos (Hájek, 1976).

Em 2005, Devriese et al. perceberam, durante a realização de exames moleculares de rotina que quatro amostras com características eletroforéticas semelhantes se destacavam dos demais isolados. Estas amostras eram oriundas de caninos, felinos, equinos e um psitacídeo. Os isolados foram avaliados molecularmente por 16S rRNA. Depois deste processo, realizou-se o sequenciamento das amostras diferentes e formação de um dendrograma para tipificação destes isolados. O resultado foi a obtenção de três espécies diferentes, o *S. intermedius*, *S. delphini* e o recém descoberto *S. pseudintermedius*, que no conjunto foram chamados de SIG (*Staphylococcus intermedius* Group). O *S. pseudintermedius* foi denominado desta forma pela sua semelhança fenotípica com o *S. intermedius*, por isso acrescentaram o prefixo *pseud*,

que quer dizer “falso” em Latim (Devriese et al., 2005). *S. delphini* tem sido associado a infecções cutâneas purulentas de golfinhos. Já *S. intermedius* é encontrado em isolados de pombos. O *S. pseudintermedius* e não o *S. intermedius*, é o agente etiológico de piodermites em cães (Devriese et al., 2005; Bannoehr e Guardabassi, 2012; Miller et al., 2013).

Os membros do grupo SIG não podem ser diferenciados por testes bioquímicos, pois não apresentam diferenças claras entre si. Sendo assim, a diferenciação deve ser feita por testes genotípicos (Sasaki et al., 2007). Entretanto, desde a reclassificação, tem sido proposto que todos os isolados cutâneos de cães devem ser classificados como *S. pseudintermedius* se não for possível a realização de PCR para a identificação molecular (Devriese et al., 2009; Bannoehr e Guardabassi, 2012).

Posteriormente à reclassificação, métodos de PCR foram surgindo para a diferenciação genotípica dos membros do SIG. Entretanto, nenhum se mostrara muito confiável até que Bannoehr et al. (2009), descreveram o teste de polimorfismo e tamanho do fragmento de restrição (PCR-RFLP) utilizando a

enzima de restrição *Mbol*, o que permitiu diferenciar os membros do SIG. Posteriormente, Sasaki et al. (2010) desenvolveram um método de PCR-MULTIPLEX para diferenciar *Staphylococcus* coagulase positiva baseados nos genes *nuc* e *hsp60* e concluíram que este método comparado ao de Bannoehr et al. (2009) era mais simples, rápido e específico.

Os estafilococos estão entre os microrganismos não formadores de esporos mais resistentes. Eles resistem à desidratação, são relativamente termorresistentes e toleram melhor os

medicamentos antissépticos que outras bactérias. O *Staphylococcus pseudintermedius* tem sido descrito como produtor de vários tipos de toxinas, tais como enterotoxinas, toxinas esfoliativas, leucotoxinas, Proteína A e hemolisinas. Tais toxinas aumentam a virulência do patógeno no hospedeiro e a adesão da bactéria ao queratinócito. Além disso, é importante ressaltar a ação destas toxinas na forma de superantígenos capazes de provocar uma resposta imune de hipersensibilidade no animal (Manders, 1998, Hendricks et al., 2002; Miller et al., 2013).

2.5 *Staphylococcus pseudintermedius* Resistente à Meticilina (MRSP)

2.5.1 Definição e epidemiologia

A resistência a antimicrobianos ocorre devido a mutações espontâneas à recombinação de genes nas bactérias durante seu processo evolutivo. Este processo decorre de seleção natural de cepas mais resistentes aos antibióticos mais usados, tornando os indivíduos mais aptos a sobreviver no meio. O surgimento da resistência pode ocorrer no microorganismo pela mutação espontânea ou pela incorporação do gene de resistência de outras bactérias, através de plasmídeos e transferência de material genético (Andrade, 2002).

Há alguns anos, *Staphylococcus sp.* eram considerados microrganismos sensíveis a drogas betalactâmicas. Entretanto, tem sido crescente a descrição de cepas resistentes a estas drogas. Segundo Weese e Van Duijkeren (2010) e Beck et al. (2012) é notória a capacidade dos estafilococos em se tornar resistentes as drogas antimicrobianas.

Historicamente, os estafilococos que apresentam essa resistência a drogas betalactâmicas são denominados como “meticilina resistentes”, pois a metilina era o antibiótico de escolha

para ser utilizada em antibiogramas. O termo “oxacilina-resistente” é o mais indicado, já que os testes que incorporam a oxacilina têm maior probabilidade de detectar a resistência do que os de meticilina ou nafcilina, entretanto, o termo “meticilina-resistente” permanece em uso por já ser consagrado (NCCLS, 2003). A resistência a meticilina é conferida pelo gene *mecA*, presente no elemento genético móvel chamado *SCCmec* dos estafilococos. Este elemento é composto por dois componentes genéticos essenciais, o *ccr* e o *mec*. O complexo gênico *ccr* codifica recombinases responsáveis pela inserção e excisão do *SCCmec* ao cromossomo hospedeiro, ou seja, promove sua mobilidade. O complexo *mec* é composto pelos genes *IS431 mec*, *mecA* e genes regulatórios intactos ou truncados, chamados de *mecRIe mecI* (Zhang et al, 2005). O gene *mecA* codifica uma proteína de ligação à penicilina alterada, chamada PBP2a que reduz a afinidade da bactéria a todos os antibióticos betalactâmicos, como as as penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos (Zhang et al, 2005; Kwon et al., 2006; Weese e Van Duijkeren, 2010).

O *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) tem sido descrito na

medicina desde a década de 60, com aumento significativo do número de casos, devido ao uso empírico de antibióticos, tornando-se assim objeto de preocupação de clínicos e pesquisadores. Em humanos, o *S. aureus* é uma bactéria residente de mucosas e pele e é reconhecido como o principal agente causador de infecção cutânea, feridas cirúrgicas e infecções nosocomiais desde o século passado (Musher e Mackenzie, 1977; Maranan, et al., 1997). Em clínica veterinária de pequenos animais, os MRSA têm menor relevância, mas podem, também, causar infecções cutâneas, do trato urinário e em feridas cirúrgicas. Dados de tipificação das cepas dessas bactérias dão suporte à hipótese de que o surgimento de MRSA em animais de estimação se deva ao seu contato íntimo com os seus proprietários, já que existe grande semelhança entre as cepas animais e humanas. Tem-se observado que cães e gatos não se mantêm colonizados por MRSA, desta forma, os microrganismos são caracterizados, nesta espécie, como de microbiota transitória, não se fazendo necessária a descolonização destes animais (Weese e Van Duijkeren, 2010).

Desde a década de 80, tem sido descrito também o *S. pseudintermedius*

resistente à meticilina (MRSP) na medicina veterinária. Esta resistência também é conferida pelo gene *mecA* assim como no *S. aureus*. Estes microrganismos apresentam grande relevância na clínica médica de pequenos animais por se tratarem de bactérias residentes da pele de cães e responsáveis por infecções oportunistas. A resistência aos betalactâmicos dificulta o tratamento de animais acometidos, pois estas drogas são aquelas de escolha em tais casos (Weese e Van Duijkeren, 2010; Beck et al 2012; Miller et al. 2013).

Diferentemente do que acontece com MRSA em humanos, a colonização destes pacientes animais por MRSP é incomum, mas tem sido descrita na literatura (Van Hoovels et al., 2006; Sasaki et al., 2007; Stegmann et al., 2010; Weese e Van Duijkeren, 2010). Frank et al. (2009) demonstraram, a partir de material oriundo de lesões de pele de 25 cães com piodermite recorrente bem como das narinas dos seus proprietários, que dois destes possuíam MRSP com o mesmo gene de resistência e mesmo perfil de sensibilidade a antimicrobianos que seus cães doentes. Além da colonização com cepas MRSP advindas de cães doentes, pode ocorrer, também, a

transferência do gene *mecA* de MRSP para outras espécies de *Staphylococcus* em humanos, como foi evidenciado em *S. aureus* isolados de uma criança (Wielders et al., 2001).

Na grande maioria dos casos de piodermite, a escolha do antibiótico a ser prescrito é empírica, de acordo com a experiência do clínico. Entretanto, devido à natureza secundária da infecção, recorrências são comuns mormente se não houver controle da causa primária. O longo período de tratamento antimicrobiano e a alta frequência de recorrência têm sido apontados como fatores de risco para o desenvolvimento de resistência a meticilina, já que os betalactâmicos são as drogas de escolha (Morris et al., 2006; Jones et al., 2007; Kawakami et al., 2010; Huerta, et al., 2011; Onuma et al., 2011; Hnilica et al., 2012; Miller et al. 2013). Se a recorrência ocorrer em até dois meses após do término do tratamento, sugere-se que a doença de base não esteja controlada, levando a um provável episódio de piodermite. Se durante a antibioticoterapia com a dose adequada de medicamento a cura das lesões for parcial ou não estiver ocorrendo, sugere-se fazer cultura e antibiograma das secreções para seleção correta da base a ser usada, já que há

indícios de resistência microbiana e possivelmente resistência à meticilina

(Hnilica, 2012; Miller et al., 2013).

2.5.2 Identificação de MRSP

A resistência à meticilina pode ser demonstrada pelo emprego no antibiograma de disco de oxacilina, fato que apresenta forte correlação com a identificação do gene *mecA*. Este método diagnóstico é simples e pouco oneroso, sendo utilizado com grande frequência nos laboratórios. A detecção da resistência à meticilina no antibiograma é retratada pela formação de halos menores que 10 mm em torno do disco de oxacilina. Contudo, se houver resistência a oxacilina e sensibilidade a qualquer outro betalactâmico *in vitro*, no antibiograma, o responsável deve emitir laudo de

resistência para todas as drogas da classe, já que o gene *mecA* provoca resistência a todas os demais. Assim, é contraindicado o uso de qualquer antibiótico betalactâmico na presença de resistência à oxacilina a menos que não haja outra opção terapêutica e o paciente esteja demonstrando resposta favorável. A forma mais precisa de determinação de resistência à meticilina é através de identificação molecular e evidenciação do gene *mecA* por PCR, mas poucos laboratórios tem este método disponível na rotina (NCCLS, 2003; Sasaki et al., 2005; CLSI, 2012; Hnilica, 2012; Miller et al., 2013).

2.5.3 Distribuição mundial de MRSP

A prevalência de MRSP em infecções de pacientes de clínicas e hospitais veterinários tem crescido substancialmente nas últimas décadas. Em dois estudos de susceptibilidade do *S. pseudintermedius* a antimicrobianos, na década de 80, não foram encontradas bactérias MRSP (Philips e Williams, 1984; Medleau et al., 1986). Entretanto, dois outros estudos retrospectivos,

realizados nos Estados Unidos, documentaram prevalência de MRSP entre 15 e 17% dos isolados microbiológicos (Morris et al., 2006; Jones et al., 2007). Desde a última década, as taxas de resistência só têm aumentado, chegando a 30% de MRSP encontrados em um estudo da Universidade do Tennessee e 66% no Japão (Jones et al., 2007; Kawakami et

al., 2010). Em outra pesquisa, realizada no Japão, em que foram utilizadas amostras provindas de 69 animais com piodermite, entre 1999 e 2000, e 123 em 2009, notou-se que a prevalência de MRSP aumentou significativamente e foi mais prevalente

2.5.4 Tratamento de piodermite por MRSP

Quando a resistência bacteriana é confirmada, o tratamento de pacientes com piodermite é mais complicado, pois a resistência a drogas betalactâmica limita muito as opções terapêuticas de antimicrobianos de uso oral. Sendo assim, faz-se necessário o uso de medicamentos tópicos, não apenas como coadjuvantes, mas, muitas vezes, como tratamento único. Nestes casos, a escolha empírica do antimicrobiano não é adequada, devendo ser solicitado sempre o antibiograma para determinação da droga mais eficiente para o tratamento (Hnilica, 2012; Miller et al., 2013). A estratégia ideal para a escolha do tratamento tópico inclui a escolha do princípio ativo e do veículo que vai carregá-lo à pele do animal. Assim, o ideal é que haja o princípio ativo e veículo ideais, tempo de contato suficiente e efeito residual (Jeffers, 2013).

em animais que possuíam histórico de antibioticoterapia anterior. Sendo assim, aparentemente estes resultados podem ser associados ao uso crescente e inadvertido de antimicrobianos (Onuma et al., 2011).

Os tipos de tratamento tópico mais utilizados nesses casos são xampus, condicionadores, banhos de imersão, aspersores, cremes, géis, pomadas e lenços umedecidos. Existem diversos princípios ativos que podem ser manipulados nessas apresentações, sendo os mais utilizados: clorexidine, peróxido de benzoíla, ácido fúsidico, mupirocina e hipoclorito de sódio. Frente a essas substâncias, os patógenos não apresentam resistência conhecida, sendo uma excelente alternativa para infecções por MRSP. A grande limitação do uso de produtos tópicos é a necessidade de aplicação várias vezes ao dia para aumentar o tempo de contato do patógeno com a droga. Entretanto, para minimizar este problema, é ideal que seja acrescentado à formulação agentes capazes de potencializar a ação dos antimicrobianos ou aumentar o tempo de contato destes com a pele. Exemplos

destes agentes são quitosanas e lipossomos (Hnilica, 2012; Jeffers, 2013; Miller, 2013).

Para infecções generalizadas, o ideal é o uso de xampús, condicionadores ou imersão em soluções a cada dois a sete dias, dependendo do caso e da necessidade do animal. Já para quadros

os mais localizados, podem ser utilizados cremes, pomadas, géis, lenços umedecidos várias vezes ao dia sempre orientando o proprietário a limitar intervenção do animal com a área por pelo menos 30 minutos após a medicação para garantir mínima ação do medicamento (Jeffers, 2013; Miller et al., 2013).

3 OBJETIVOS E HIPÓTESES

3.1 Hipóteses

- *S. pseudintermedius* resistente à meticilina é prevalente nas lesões dermatológicas de cães com piodermite superficial atendidos no Hospital Veterinário da UFMG.
- *S. pseudintermedius* resistente à oxacilina no antibiograma é portador do gene *mecA*.
- *S. pseudintermedius* resistente à meticilina é mais prevalente em animais que passaram por antibioticoterapia prévia.

3.2 Objetivos gerais

Determinar a prevalência de *S. pseudintermedius* resistente à meticilina nos animais com piodermite superficial atendidos na

rotina do serviço de dermatologia do Hospital Veterinário da UFMG entre março e junho de 2013

3.5 Objetivos específicos

- Isolar e identificar o *S. pseudintermedius* em animais portadores de piodermite;
- Realizar antibiograma e PCR para identificação de resistência a meticilina.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram selecionados 43 cães, atendidos no Hospital Veterinário da UFMG, com diagnóstico estabelecido de piodermite superficial. O período de coletas situou-se entre março e julho de 2013. O diagnóstico da doença bacteriana foi executado por exame dermatológico e citológico. No exame físico, levou-se em consideração a presença de alopecia circular, pápulas, pústulas, eritema, colarinhos epidérmicos. Para o exame citológico, foram selecionados os

4.2 Coleta de material, processamento de amostras e avaliação fenotípica

4.2.1 Isolamento bacteriano

Foram coletadas em haste de algodão estéril amostras das secreções das lesões da pele e da narina direita. As coletas foram realizadas preferencialmente das pústulas intactas, após rompê-las com agulha hipodérmica. Na ausência de pústulas, coletou-se material dos colarinhos epidérmicos na porção inferior dos retalhos vesicobolhopustulares epidérmicos. Essas hastes de algodão foram, então, armazenadas em meio de *Stuart* em, no máximo, 48 horas.

animais cujas lesões apresentavam bactérias cocóides em grande quantidade e presença de células inflamatórias após a realização do decalque da lesão e coloração das lâminas por panóptico (Newprov®).

Os proprietários ao assinarem a autorização para inclusão do animal no experimento (Anexo 1), receberam um questionário com as seguintes perguntas: queixa principal, uso prévio de antibióticos, uso prévio de drogas imunossupressoras nos últimos seis meses e o resultado destes tratamentos (Anexo 2).

Dentro deste período executava-se a inoculação do material em placas contendo Ágar Sangue (Fig. 1) para serem incubadas a 37° C em estufa por 24 horas, para a tentativa de isolamento primário.

As colônias presentes, após a incubação do material, foram analisadas quanto à morfologia, coloração de Gram resultados à avaliação citológica. Foram selecionadas duas colônias morfometricamente idênticas de coloração branca, tamanho médio, com cocos gram-positivos dispostos em conformação de “cachos de uva” para

isolamento secundário em Ágar Mueller Hinton a 37° C dentro de 24 horas (Fig.2).



Figura 1: Colônias de *S. pseudintermedius* oriundas de amostras de lesões tegumentares de cães com piodermite superficial em Ágar Sangue após incubação em estufa a 37° C dentro de 24 horas. Fonte: Arquivo Pessoal.



Figura 2: Colônias de *S. pseudintermedius* oriundas de amostras de lesões tegumentares de cães com piodermite superficial em Ágar Mueller Hinton a 37° C em estufa dentro de 24 horas. Fonte: Arquivo Pessoal.

4.2.2 Avaliação fenotípica e identificação de *S. pseudintermedius*

Para diferenciação entre bactérias do gênero *Staphylococcus* de outros cocos Gram positivos foi realizada a avaliação da morfologia da colônia, e de provas bioquímicas: coagulase, catalase e

oxidase. Posteriormente à classificação dos isolados como sendo do gênero *Staphylococcus sp.*, amostras das colônias foram utilizadas em testes de Voges Proskauer ou produção de

acetoína, manitol, sacarose, trealose, arginina, uréia e resposta à polimixina B para que fossem identificadas como pertencentes SIG e diferenciadas de outras espécie de *Staphylococcus* sp. (Fig. 3). Após a completa identificação fenotípica, as amostras foram armazenadas em Caldo BHI-Glicerol e

congeladas em freezer a -80°C para a identificação e detecção do gene *mecA* por PCR (Devriese et al., 2009 Bannoehr e Guardabassi, 2012). Os resultados das provas bioquímicas foram interpretados (Quadro 1 e 2) segundo Quinn et al. (2005) e Bannoehr e Guardabassi (2012).

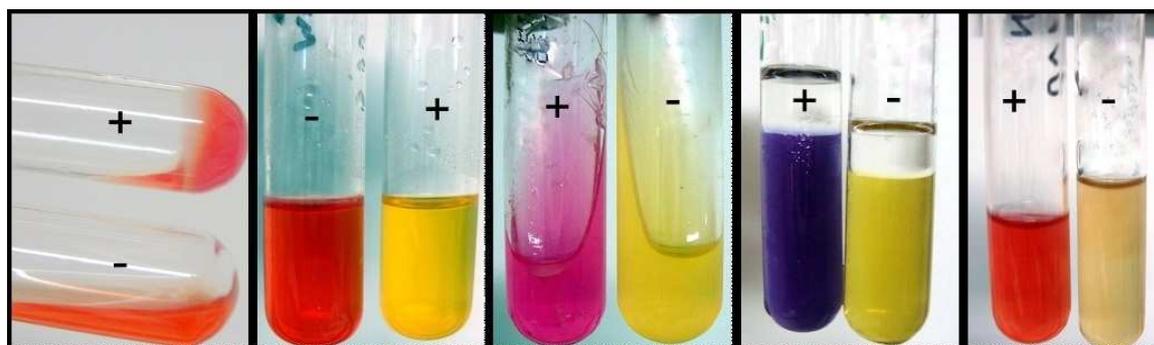


Figura 3: Provas bioquímicas realizadas a partir de colônias de *S. pseudintermedius* isoladas de amostras de cães com piodermite superficial. Da esquerda para direita: coagulase, fermentação de carboidratos, urease, arginina, Voges Proskauer. Observa-se: + reação positiva; -: reação negativa.

Fonte: Arquivo Pessoal.

Microorganismo	Microscopia	Coagulase	Catalase	Oxidase
<i>Staphylococcus</i> spp.	Cachos de uva.	+/-	+	-
<i>Micrococcus</i> spp.	Tétrades.	-	+	+
<i>Streptococcus</i> e <i>Enterococcus</i> spp.	Cadeias.	-	-	-

Quadro 1: caracterização diferencial fenotípica de cocos Gram-positivos a partir de avaliação morfológica e provas bioquímicas (adaptado de Quinn et al, 2005).

Espécie de <i>Staphylococcus</i>	Coagulase	Produção de acetoina (VP)	Polimixina B	Manitol	Sacarose	Trealose	Uréia	Arginina
SIG	+	-	S	(d)	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	+	+	R	+	+	+	-	+
<i>S. schleiferi schleiferi</i>	d	+	S	-	-	d	+	+
<i>S. schleiferi coagulans</i>	+	+	S	d	+	-	-	+
<i>S. epidermidis</i>	-	+	R	-	d	d	d	+
<i>S. aemolyticus</i>	-	+	S	d	+	+	-	+

Quadro 2: diferenciação entre SIG e outros estafilococos isolados em cães a partir de provas bioquímicas e suscetibilidade a antimicrobianos (adaptado de Quinn et al; 2005; Bannoehr e Guardabassi, 2012). +: >90% de cepas positivas; - : > 90% de cepas negativas; d: 11-89% de cepas positivas; (): reação tardia. R: diâmetro do halo <10mm. S: diâmetro do halo >10mm.

4.3 Antibiograma

Os antibióticos selecionados constituintes dos discos impregnados foram: amicacina 30µg, amoxicilina+ácido clavulânico 20/10 µg, cefalexina 30 µg, cloranfenicol 30 µg, enrofloxacino 5 µg, estreptomicina 30µg, gentamicina 10 µg, oxacilina 1 µg, penicilina 10 µg, tetraciclina 30 µg e trimetoprima-sulfametoxazole 1,25/23,75 µg (Laboratório DME®) de acordo com recomendações do CLSI (2012) para testes de susceptibilidade de *Staphylococcus sp.* a antibióticos.

Após o isolamento secundário, todas as amostras foram inoculadas em Caldo Mueller Hinton até obtenção de grau de turbidez de 0,5 na Escala de

McFarland. Assim, por meio de haste de algodão estéril o material foi estriado em toda a extensão da placa de ágar Mueller Hinton para a realização do antibiograma. Os discos dos antibióticos selecionados foram devidamente posicionados em forma concêntrica de modo que não houvesse sobreposição dos halos. Após incubação por 24 horas em estufa a 37° C, foi realizada a leitura em milímetros do diâmetro dos halos de inibição formados e classificada a resistência ou suscetibilidade (Quadro 3), de acordo com os padrões para cada antibiótico (CLSI, 2012).

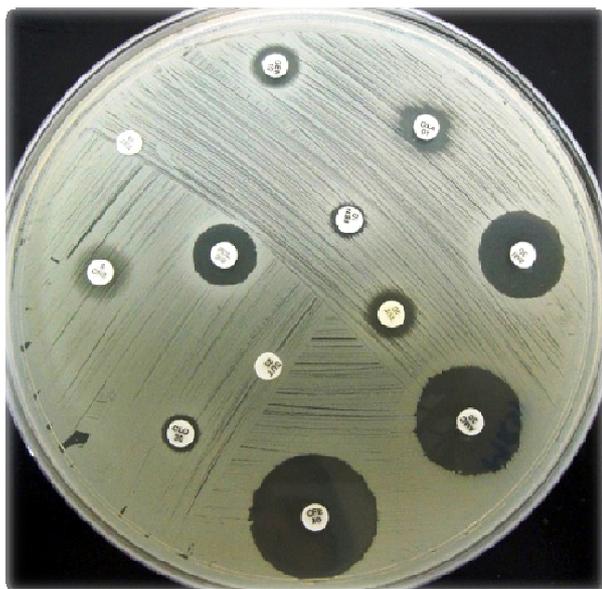


Figura 4: Placa de antibiograma com discos impregnados de antibióticos obtida a partir de colônias *S. pseudintermedius* isoladas de amostras de lesões de pele de cães com piodermite superficial. Fonte: Arquivo pessoal.

4.4 Avaliação genotípica

4.4.1 Extração de DNA

As amostras armazenadas a -80°C foram transferidas para refrigerador com temperatura de 2 e 4°C por 12 horas (*overnight*), para evitar variação brusca de temperatura para posteriormente serem descongeladas a temperatura ambiente a 25°C . Após descongelamento, os isolados foram estriados em Ágar sangue de carneiro e incubados a 37°C , por 24 horas. Amostras de uma colônia crescida em

cada placa foram coletadas por alça flambada e inoculadas em tubos, tipo Eppendorff, contendo uma alíquota de $20\mu\text{L}$ de água Mili-Q. Posteriormente, esse material foi submetido à fervura, ou seja, temperatura de 100°C durante 15 minutos para liberação do DNA no meio. Após a fervura, os isolados foram centrifugados a 60rpm com 10MA de potência, durante cinco minutos, para separação do sobrenadante, que foi coletado através de pipeta calibrada para 20 microlitros.

A identificação do gene *mecA* foi feita pelo do método descrito por Merothra et al. (2000). As amplificações foram realizadas com 25µl de solução contendo 3 µl de DNA, 0,8 µl de primer (3´5´ F ACTGCTATCCACCCTCAAC, R CTGGTGAAGTTGTAATCTGG), 10 µl de premix (Phoneutria ®) e 5,4 µl de água ultrapura (Phoneutria ®). As placas, contendo as amostras, foram alocadas no termociclador (Applied Biosystems®) onde sofreram desnaturação, amplificação e extensão do DNA conforme o seguinte protocolo: desnaturação a 94° C por 5 minutos, depois 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 94° C por

2 minutos, anelamento a 53° C por 2 minutos e extensão a 72° C por 1 minuto), terminando com extensão final a 72° C por 7 minutos. Depois deste processo, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,5%, com marcador molecular de 100 bp (Thermo Scientific®) e fotografadas sob luz UV em câmara escura. *Staphylococcus pseudintermedius* MRSP 3279 e *S. aureus* MRSA USA 100 foram utilizados como controles positivos, e solução de amplificação sem DNA como controle negativo. O gene *mecA* é expressado entre as bandas 100 e 200, possuindo um peso molecular equivalente a 160bp.

4.4.3 Identificação genotípica de *S. pseudintermedius*

A identificação foi feita através do método descrito por Sasaki et al. (2010) que utiliza a identificação do gene *nuc*. As amplificações foram realizadas utilizando-se 25 µL de solução, duas unidades de GoTaq™ DNA Polymerase, 1X Green GoTaq™ Reaction Buffer, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM de dNTP, 1 µM de primer (F2 TRGGCAGTAGGATTCGTAA; R5 CTTTTGTGCTYCMTTTTGG),

3 µl de DNA. Assim, as a placa contendo as amostras foram alocadas no termociclador para a realização de desnaturação, amplificação e extensão do DNA conforme o seguinte protocolo: desnaturação a 95°C por 2 minutos; 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 56°C por 35 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto) e extensão final a 72°C por 2 minutos. Depois deste

processo, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1,5% com marcador molecular de 100 bp (Thermo Scientific®) e fotografadas sob luz UV em câmara escura (Fig. 5). *Staphylococcus pseudintermedius*

MRSP 3279 foi utilizado como controle positivo, e solução de amplificação sem DNA como controle negativo. O gene *nuc* é expresso entre as bandas 900 e 1000 bp, possuindo um peso molecular equivalente a 926bp

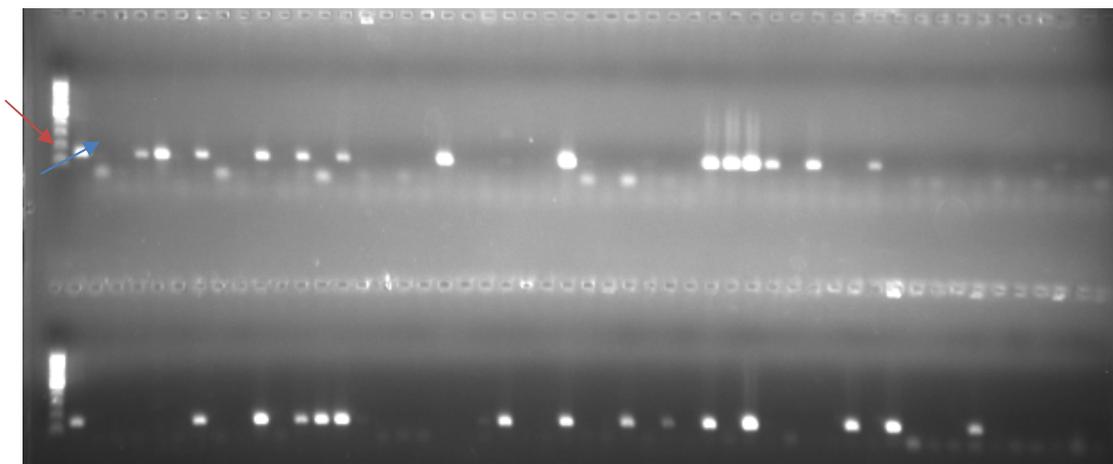


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose obtida a partir de *S. pseudintermedius* isolados de cães com piodermite superficial. Observa-se bandas específicas formadas por PCR para identificação de gene *mecA*. Na ponta da seta rubra está a marcação de 200bp e na ponta de seta azul está a marcação de 100bp, representando a presença do gene *mecA*. Fonte: Arquivo Pessoal.

4.4 Análise estatística

Os dados obtidos foram avaliados por frequência e correlação de Spearman, sendo o valor de $p < 0,01$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características gerais do grupo amostral

Dos 43 cães portadores de piodermite superficial selecionados, entre março e

julho de 2013, na rotina de dermatologia do Hospital Veterinário

da UFMG. Destes animais, 30 (70%) eram fêmeas e 13 (30%) eram machos, com idades entre um e 16 anos, média de sete anos e mediana de oito anos. O número de fêmeas selecionadas para o estudo foi significativamente maior que de machos, provavelmente devido à preferência dos proprietários por cadelas e não a uma predisposição sexual para a piodermite. Outros estudos brasileiros também observaram maior quantidade de fêmeas entre os animais participantes de pesquisas (Larsson Jr, 2008; Bourguignon et al., 2012). Não existem relatos de aparente predisposição sexual descritos em literatura para a piodermite bacteriana (Miller et al., 2013).

Considerando a média de idade dos animais atendidos, observa-se que a maioria dos pacientes encontra-se na meia idade, o que pode ser explicado pela natureza secundária da maioria das piodermites, dependendo das causas primárias. As alergias que são as causas mais frequentes tem sua manifestação inicial a partir de 1 a 3 anos de idade, com agravamento

progressivo dos sinais clínicos na ausência de tratamento, podendo assim ocorrer um número grande de casos na fase dos 7 anos de idade. As endocrinopatias que também são causas importantes de piodermite, ocorrem a partir dos 6 anos de idade (Miller et al., 2013).

As raças mais frequentes foram Poodle e Yorkshire. Entretanto, não se pode afirmar que se trata de predisposição racial à piodermite ou doenças primárias, já que todas as raças são susceptíveis a esta doença (Miller et al., 2013). Bourguignon et al. (2012) encontraram frequência maior de cães SRD, provavelmente pela maior ocorrência dos mesmos na localidade do estudo. Já no estudo de Larsson Jr. (2008), houve também o predomínio de cães da raça Poodle. Na literatura consultada, estudos não comprovam predisposições raciais, já que é necessário um levantamento específico da população local de cada raça, caso contrário haverá superestimação ou subestimação.

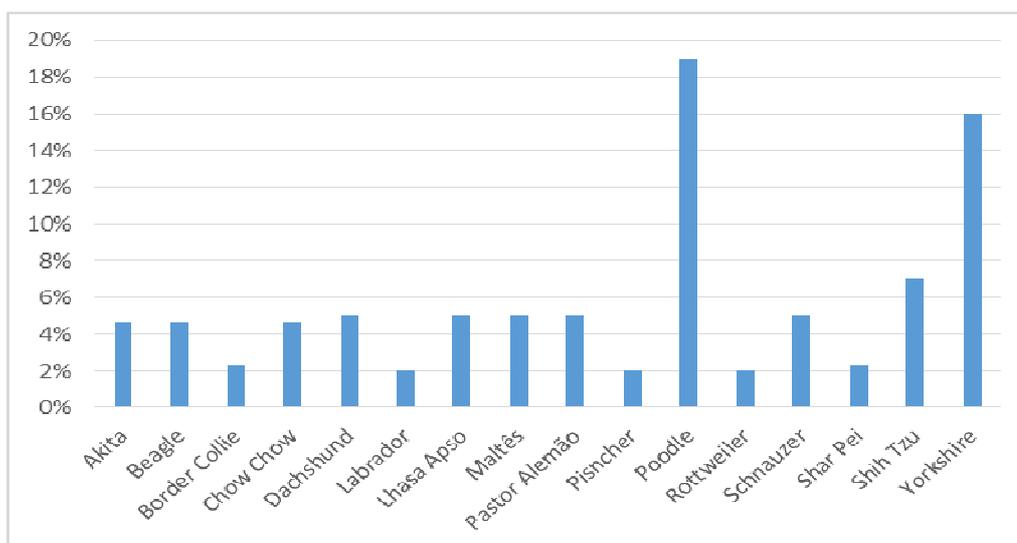


Gráfico 1: Distribuição racial no grupo amostral de cães com piодermite selecionados entre março e julho de 2013 no HV-UFMG para estudo de piодermite superficial. Belo Horizonte (2013).

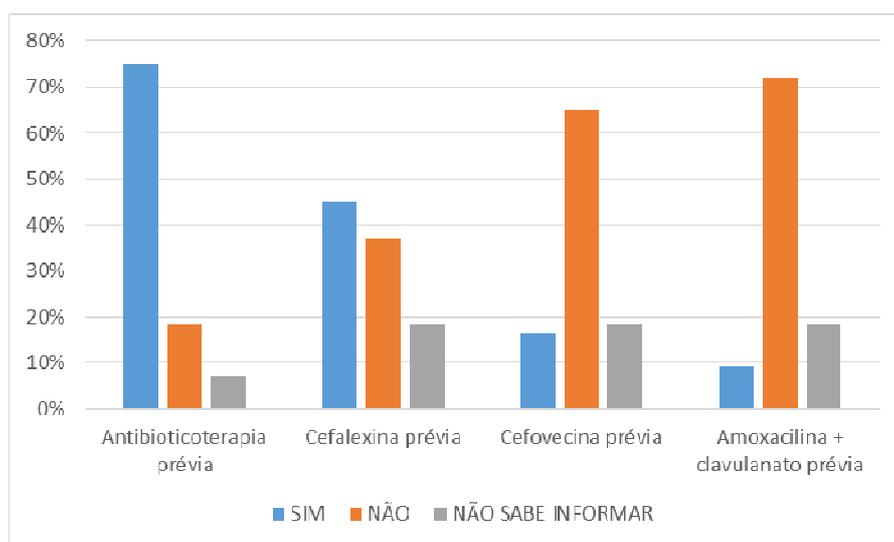


Gráfico 2: Utilização prévia de antimicrobianos segundo dados de questionário respondido pelos proprietários de cães com piодermite selecionados entre março e julho de 2013 no HV-UFMG para estudo de piодermite superficial. Belo Horizonte (2013).

No presente estudo, 75% dos cães incluídos receberam antimicrobianos, entretanto, os proprietários muitas vezes não sabiam caracterizar o tempo de

administração antes da avaliação. O antimicrobiano mais utilizado foi a cefalexina, seguida pela cefovecina e amoxicilina com ácido clavulânico. Beck

et al. (2012) observaram 89% de histórico de antibioticoterapia prévia ao estudo de piodermite, diferindo dos resultados deste estudo. A sensibilidade e especificidade destes questionários é discutível, já que foi

baseado em informações subjetivas, fornecidas pelos proprietários que muitas vezes não se recordavam dos tratamentos anteriores ou forneciam informações incompletas.

5.2 Identificação fenotípica e genotípica das amostras coletadas

5.2.1 Prevalência de SIG nos isolados avaliados por provas bioquímicas

Foram coletadas duas amostras de cada animal selecionado, uma de lesão e outra de uma das narinas. No total, foram obtidas 86 amostras em hastes de algodão estéril que foram encaminhadas para isolamento e identificação bioquímica. Destas amostras, o crescimento foi detectado em 68 amostras, destas, 88,2% foram classificadas como pertencentes ao SIG e 11,8% como bactérias diversas não pertencentes ao grupo SIG. A frequência de bactérias do Grupo SIG identificadas por provas bioquímicas estão representadas no gráfico 3. Dentre as amostras em que não houve crescimento, 39% eram provenientes de narinas e apenas 2% de lesões de pele (Gráfico 4). Desta forma, observa-se diferença significativa entre as frequências de isolamento nas duas regiões corpóreas estudadas. Isto deve-se provavelmente ao fato de que mesmo as narinas sendo uma região de foco de perpetuação bacteriana, as colônias não necessariamente estão em crescimento, diferente do que ocorre na lesão de pele

com infecção bacteriana. Considerando as amostras em que houve crescimento de cada região, 92% dos isolados de narina e 88% de lesão de pele foram classificados como SIG.

A falha no cultivo pode ser devido a quantidade insuficiente de microorganismos, coleta ou inoculação inadequadas. Bourguignon et al. (2012) relataram crescimento de todas as 75 amostras coletadas. Já Wang et al. (2012) coletaram uma amostra por animal de um total de 260 animais e obtiveram 80 isolados, ausência de crescimento maior que a apresentada neste estudo.

Quando avaliados apenas os isolados obtidos, excluindo as amostras sem crescimento, a prevalência de bactérias do grupo SIG aumentou para 88%. Ruscher et al. (2008) encontraram uma prevalência de 76,2% de SIG na identificação fenotípica com 16.103 amostras. Já, Larsson Jr (2008) classificou 67,6% de suas amostras como *Staphylococcus intermedius*

(provavelmente *S. pseudintermedius*). Bourguignon et al. (2012) classificaram como SIG 73 dos seus 75 isolados oriundos de 25 animais. Sendo assim, os resultados encontrados assemelham-se àqueles da bibliografia compilada. As variações

provavelmente se deveram à

técnica empregada e o número de animais participantes, mas corroboram com afirmações da literatura de que as bactérias do grupo SIG são as mais prevalentes nos isolados de lesões de pele de cães.

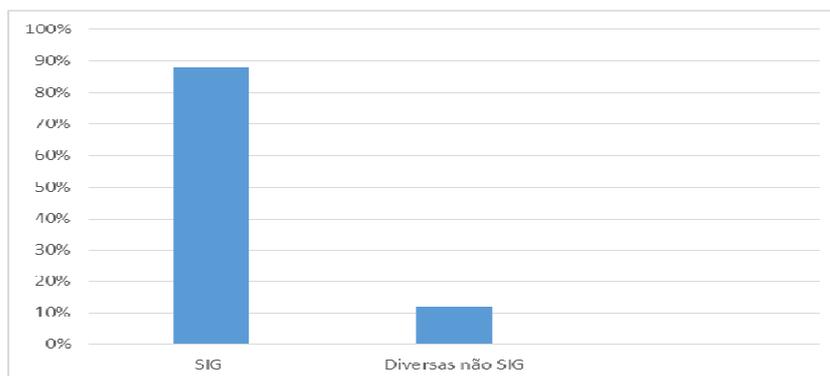


Gráfico 3: Classificação fenotípica baseada em provas bioquímicas dos isolados de amostras de lesões de pele e de narinas de cães com piodermite superficial coletadas entre março e junho de 2013 no HV-UFMG. Belo Horizonte (2013).

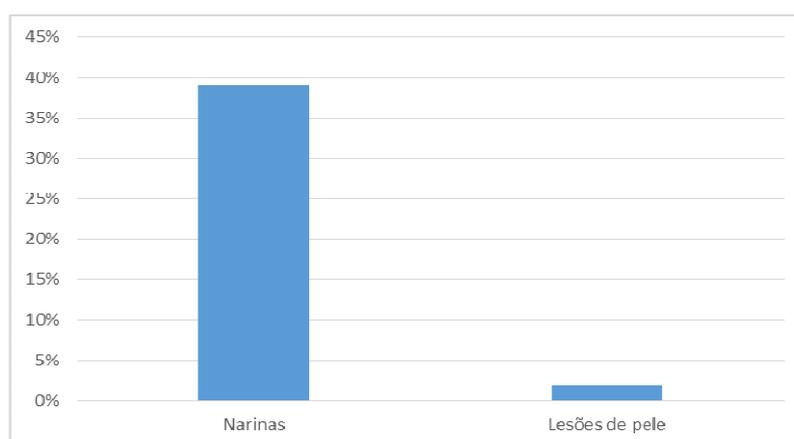


Gráfico 4: Frequência de amostras de narinas e de lesão de pele, de cães com piodermite superficial, em que não foi observado crescimento no isolamento bacteriano em Ágar Sangue. Belo Horizonte (2013).

5.2.2 Identificação genotípica de *S. pseudintermedius*

Foram selecionados para a identificação genotípica por PCR a totalidade os isolados obtidos, independente de terem sido classificados com SIG ou não. Sendo assim, foram analisadas 68 amostras, destas 62 (91%) foram classificadas como *Staphylococcus pseudintermedius* e seis (9%) como bactérias diversas não *S. pseudintermedius* e não foram classificadas, devido à ausência de *primers* específicos. A frequência de *S. pseudintermedius* encontradas na identificação genotípica está representada no gráfico 5.

A prevalência de *S. pseudintermedius* de 91% está de acordo com o estudo de Wang et al. (2012) e Bourguignon et al (2012)

que encontraram 92% e 96%, respectivamente, da bactéria entre os seus isolados. No entanto, difere do resultado encontrado por Paul et al. (2012), no qual a prevalência de *S. pseudintermedius* foi de 69%. Entretanto, neste estudo as coletas foram realizadas a partir de região perianal, cavidade oral e narinas de animais saudáveis, o que altera o resultado pela inexistência do quadro de piodermite superficial bacteriana.

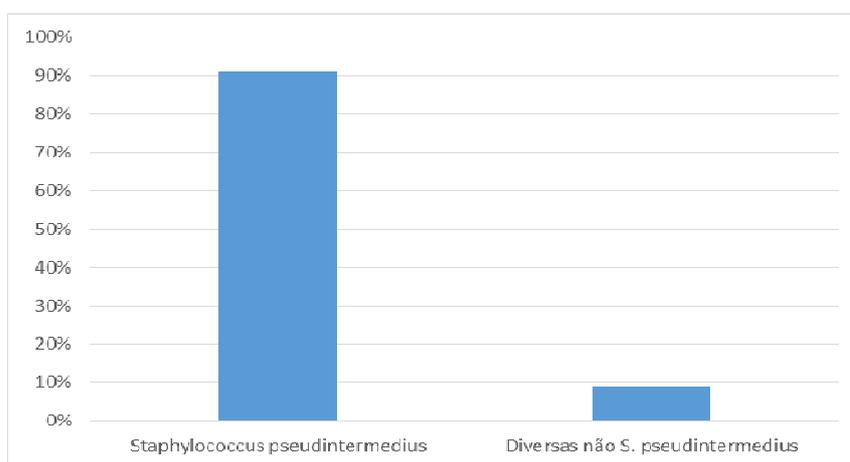


Gráfico 5: Frequência (%) de *S. pseudintermedius* em caninos acometidos por piodermite superficial segundo identificação genotípica. Belo Horizonte (2013).

5.2.3 Correlações entre isolamento bioquímico e identificação genotípica

Os resultados obtidos na identificação genotípica e fenotípica foram comparados demonstrando que existe correlação significativa entre as duas formas de identificação bacteriana (Tab. 1). Quando comparados a identificação genotípica dos isolados de narina e lesão, observou-se também correlação significativa entre a espécie encontrada nos mesmos (tab. 1). Isto sugere que ambos os métodos de diagnóstico são bastante eficientes na identificação de *S. pseudintermedius*. Os dados dispostos na bibliografia compilada relativos à comparação dos dois métodos é escassa. Já, em relação à correlação

significativa entre os isolados de narina e lesão, há indicação de que a colonização dos dois locais é semelhante, sugerindo que as narinas são realmente reservatórios destas bactérias, como observado por Paul et al. (2012) que avaliaram apenas animais saudáveis e por Beck et al. (2012) que por sua vez fizeram avaliação tanto em lesões como em eventuais regiões corpóreas focos de perpetuação bacteriana em animais com piodermite. Entretanto, não se pode afirmar se as narinas ou lesões são fontes de colonização entre si ou que se tratam da mesma cepa bacteriana, para isso seria necessário a tipificação das amostras.

Tabela 1: Correlação entre identificação fenotípica e genotípica e entre espécie identificada por PCR na narina e na lesão de piodermite superficial de caninos acometidos. Dados expressados como r de Spearman e valor de significância. Belo Horizonte (2013).

Correlação	Correlação r	Significância
Identificação fenotípica x identificação genotípica	0,495	**0,0004
PCR narina x PCR lesão	0,787	**0,0002

*Dados expressados como r de Spearman e valor de $p < 0,01$. ** significativo.*

5.3 Antibiograma

Todos os isolados foram submetidos a antibiograma, mesmo sendo classificados como não pertencentes do grupo SIG. Os antibióticos testados foram: amicacina,

amoxicilina + ácido clavulânico, cefalexina, cloranfenicol, enrofloxacina, estreptomicina, gentamicina, oxacilina, penicilina, polimixina B, sulfa +

trimetoprim, tetraciclina (Gráfico 5, Quadro 3). O tamanho padrão do diâmetro dos halos formados para interpretação do

antibiograma para cada antimicrobiano está representado no quadro 4.

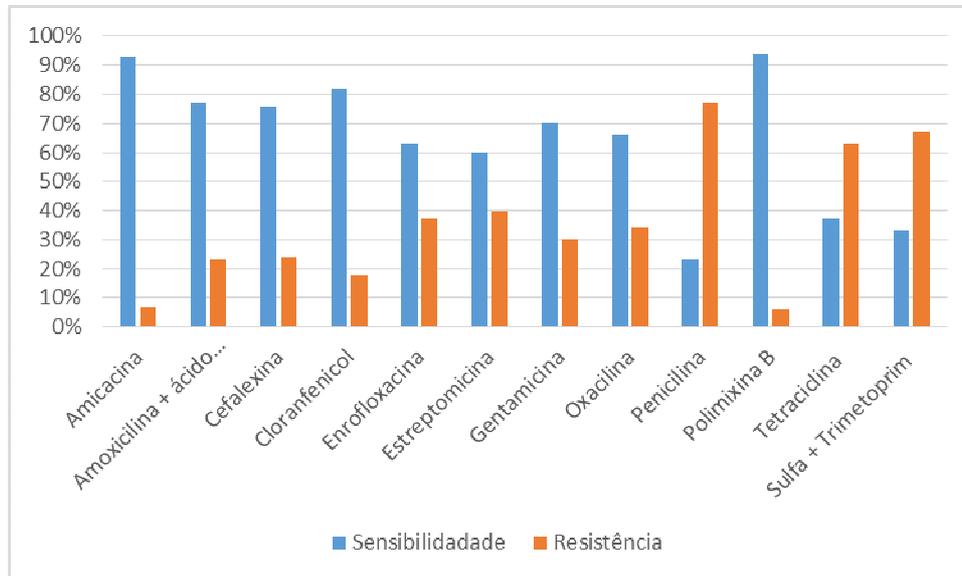


Gráfico 5: Perfil de sensibilidade (%) a antimicrobianos utilizados em antibiograma de amostras isoladas de caninos acometidos por piodermite superficial. Belo Horizonte (2013).

Antimicrobiano	Resistência	Sensibilidade
Amicacina	7%	93%
Amoxicilina + clavulanato	23%	77%
Cefalexina	24%	76%
Cloranfenicol	18%	82%
Enrofloxacino	38%	62%
Estreptomicina	40%	60%
Gentamicina	30%	70%
Oxacilina	34%	66%
Penicilina	77%	23%
Polimixina B	6%	94%
Tetraciclina	62%	38%
Sulfa + Trimetoprim	67%	33%

Quadro 3: Perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas utilizadas em antibiograma de amostras de lesões de pele e narinas de cães portadores de piodermite superficial. Belo Horizonte (2013).

Antimicrobiano	Sensível	Intermediário	Resistente
Amicacina 30µg	≥17	15-16	≤14
Amoxicilina+ác. clavulânico 20/10 µg	≥20	-	≤19
Cefalexina 30 µg	≥14	15-17	≤18
Cloranfenicol 30 µg	≥18	13-17	≤12
Enrofloxacino 5 µg	≥18	15-17	≤14
Estreptomicina 30 µg	≥11	12-14	≤13
Gentamicina 10 µg	≥15	13-14	≤12
Neomicina 30 µg	≥18	19-21	≤22
Oxacilina 1 µg	≥13	11-12	≤10
Penicilina 10 µg	≥29	-	≤28
Tetraciclina 30 µg	≥19	15-18	≤14
Trimetoprim-sulfametoxazol 1,25/23,75 µg	≥16	11-15	≤10

Quadro 4: Padrão para interpretação de diâmetro de halos formados em antibiograma com discos impregnados de antimicrobianos. Adaptado de CLSI (2012).

Os perfis de resistência das amostras testas foi bastante variado, 10% dos animais foram sensível a todos os antimicrobianos usados, 28% foram resistente a seis ou mais drogas, mas nenhum foi resistente a todos (Gráf. 6). As drogas mais eficientes em ordem decrescente foram: a polimixina B, amicacina e cloranfenicol, com 94%, 93% e 82% de sensibilidade, respectivamente. A Amicacina e polimixina B não estão disponíveis para uso oral e possuem efeitos colaterais importantes como nefrotoxicidade, entretanto, consiste em uma opção para o tratamento de infecções por MRSP se o

mesmo for bem monitorado pelo clínico. O cloranfenicol também pode ser considerado para o tratamento de infecções resistentes, caso haja sensibilidade no antibiograma, entretanto, deve ser usado com cautela devido à possibilidade de aplasia medular (Andrade, 2002). Os resultados encontrados para a amicacina e cloranfenicol estão de acordo com os encontrados por Onuma et al (2011), em que a sensibilidade destas drogas foi 97% e 85% respectivamente. São escassos os trabalhos envolvendo estas drogas antimicrobianas na literatura compilada

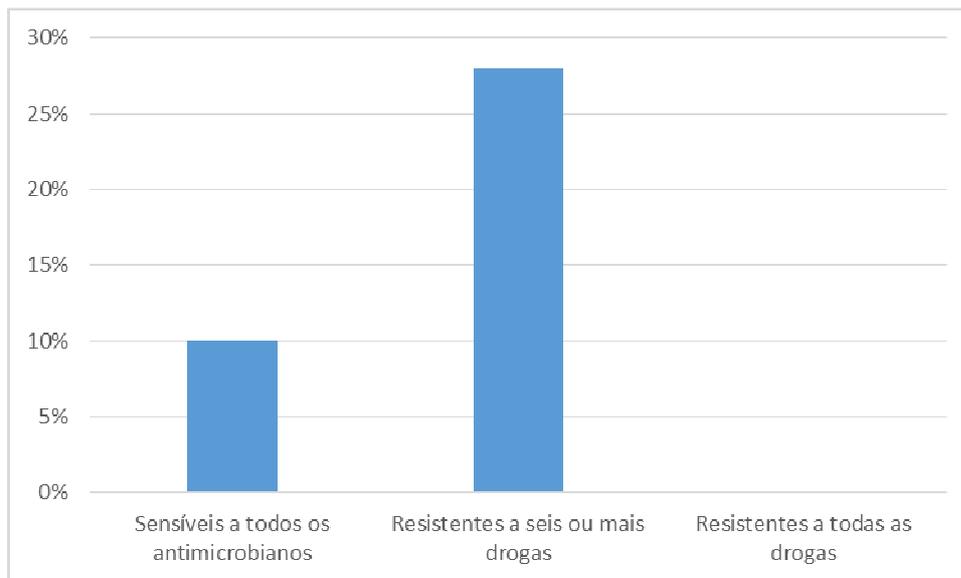


Gráfico 6: Avaliação da resistência a antimicrobianos no antibiograma de isolados oriundos de narinas e lesões de pele de caninos com piodermite superficial. Belo Horizonte (2013).

A amoxicilina com clavulanato e cefalexina apresentaram suscetibilidade semelhante e razoável, em torno de 75%. A sensibilidade à oxacilina foi menor e igual a 66%. Isto ratifica a superioridade da oxacilina em relação a outros betalactâmicos no diagnóstico da resistência a esta classe de antimicrobianos. Os resultados de suscetibilidade de cefalexina e amoxicilina com clavulanato diferem dos encontrados por Bourguignon (2012), que observou m

5.4 Identificação do gene *mecA*

Todos os 68 isolados foram testados para a presença do gene *mecA* por PCR com *primers* específicos. Destes, 25 (36,8%) apresentaram o gene e 43 (63,2%) não. Esses resultados corroboram com os encontrados por Beck et al. (2012) e Sasaki

torno de 90% de sensibilidade à cefalexina e à amoxicilina com clavulanato e de aproximadamente 80% para a oxacilina. Já Onuma et al (2011) não testaram amoxicilina com clavulanato, mas também obteve em torno de 90% de suscetibilidade para a cefalexina, assim como a oxacilina. Comparando a coincidência de resultados de susceptibilidade da oxacilina e dos demais betalactâmicos, está de acordo com Onuma et al (2011), que encontraram valores semelhantes entre estas drogas.

et al. (2007), que observaram 40,5% e 29,8% de MRSP em todas as suas amostras, respectivamente. Bourguignon et al. (2012) encontrou 94% de MRSP em amostras de cães com piodermite, diferindo bastante dos resultados obtidos

no presente estudo e com a literatura consultada. Ruscher et al. (2009) observaram apenas 0,8% de MRSP nos seus isolados de cães. Entretanto, este estudo incluiu animais portadores de diversas enfermidades, não apenas doenças de pele, que representaram 9% dos casos selecionados. A partir dos resultados

encontrados por Ruscher et al (2009) somados aos do presente estudo e da bibliografia consultada, pode-se sugerir que animais com piodermite superficial têm maior probabilidade de estar colonizados por MRSP do que os hígidos ou portadores de outras doenças não dermatológicas.

5.5 Correlações entre antibiograma, identificação de gene *mecA* e antibioticoterapia prévia

Quando comparada a prevalência de resistência a oxacilina no antibiograma e a presença do gene *mecA* no PCR, observou-se correlação significativa entre os dados, mostrando assim a grande eficiência dos dois métodos. Os resultados estão de acordo com o estudo de Bemis et al. (2006) que observaram alta correlação entre os resultados de antibiograma por difusão de disco impregnado e presença do gene *mecA* no PCR, concluindo então, que ambos os testes são eficientes. Entretanto, os resultados diferem dos encontrados por Bourguignon et al. (2012), pois a frequência de resistência à oxacilina foi menor que 20%, mas o gene *mecA* estava presente em 94% das amostras. Esta grande variação pode ter ocorrido devido a diferença das técnicas utilizadas e ao grupo amostral dos dois estudos.

Além disso, houve também correlação significativa entre os resultados

encontrados de presença de *mecA* nas amostras de narina e lesão, sugerindo que o animal que apresenta o gene nos patógenos de lesão de pele tem probabilidade de apresentar também naqueles das narinas, da mesma forma como discutido para a espécie isolada de cada local. A prevalência de gene *mecA* foi de 30% nos isolados de lesões tegumentares e de narinas dos animais testados. Beck et al. (2012) observaram 40,5 % e 34,1 % de MRSP nas lesões de pele e reservatórios de animais com piodermite na primeira coleta de amostras, respectivamente. Após o tratamento e cura clínica, coletaram novamente amostras dos mesmos locais e dos mesmos animais, observando 35,3% de MRSP em ambos os grupos de amostras. Assim sugere-se que a colonização da pele por MRSP está muito relacionada com a colonização de áreas corpóreas de perpetuação da colonização, os

reservatórios, entretanto, não se pode afirmar a origem da infecção sem que seja feita tipificação das amostras.

Não foi observada correlação significativa entre antibioticoterapia prévia e presença do gene *mecA* nas amostras isoladas de lesão e de narina (tab. 2). Assim como também não houve qualquer correlação entre o uso de amoxicilina com clavulanato, cefalexina ou cefovecina e a presença do gene *mecA*. A ausência de

correlação entre o histórico de antibioticoterapia e presença do gene *mecA* também foi observada por Beck et al. (2012), estando assim os resultados deste estudo de acordo. Nienhoff et al. (2011) encontraram associação relevante entre o uso de antibióticos nos últimos seis meses e a prevalência de gene *mecA* nas amostras de lesões de pele de 816 cães com piodermite. O mesmo foi observado por Onuma et al (2011), mas com um grupo amostral de 190 cães.

Tabela 2: Correlações entre antibiograma, identificação de gene *mecA* e antibioticoterapia prévia

Correlação	Correlação <i>r</i>	Significância
Antibioticoterapia prévia x <i>mecA</i>	0,037	0,736
Cefalexina prévia x <i>mecA</i>	0,132	0,226
Cefovecina prévia x <i>mecA</i>	0,096	0,381
Amoxicilina + clavulanato x <i>mecA</i>	0,174	0,109
<i>mecA</i> narina x <i>mecA</i> lesão	0,047	**0,002

Dados expressados como *r* de Spearman e valor de *p* <0,01. ** significativo.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Há cerca de cinco décadas o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina tem sido descrito na medicina com índices crescentes a cada ano, representando uma grande preocupação dos profissionais da área. O *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticilina foi descrito na

medicina veterinária mais recentemente, mas, de forma semelhante, tem apresentado número crescente de casos e dificultando o tratamento de animais portadores das cepas MRSP. A piodermite bacteriana por si só já representa um grande desafio para os clínicos devido ao seu

caráter secundário e recidivante. Isto se torna mais preocupante quando se trata de bactérias resistentes, pois além da causa primária, a piodermite passa a se perenizar devido a ineficiência do tratamento.

É essencial a conscientização da comunidade médica a respeito do uso de antimicrobianos, ainda que não tenha sido comprovada definitivamente a sua correlação com a emergência de cepas bacterianas resistentes. Assim, é imperativo que os clínicos realizem a terapia com a droga correta, em dose e tempo adequados e façam o controle das causas primárias no intuito de

evitar a recidiva de piodermites. Além disso, deve ser instituído na rotina o uso do antibiograma para a seleção da droga mais eficiente mormente nos casos recorrentes e em que a terapia empírica não alcançou o sucesso desejado.

Os resultados deste estudo comprovaram ser o principal agente etiológico da piodermite canina, o *Staphylococcus pseudintermedius*, em concordância com outros estudos. Além disto, pôde-se observar prevalência significativa de MRSP nas amostras testadas e o perfil de resistência a antimicrobianos.

7 CONCLUSÕES

De acordo com as condições deste experimento, pode-se concluir que:

- O *S. pseudintermedius* foi a bactéria mais prevalente em lesões de pele de cães com piodermite superficial.
- O *S. pseudintermedius* estava presente na narina de cães, representando um reservatório para uma possível reinfecção. Sobretudo considerando MRSP, já que a sua presença em estas regiões

corpóreas pode predispor infecções futuras por esta cepa resistente.

- Não houve correlação entre a expressão do gene *mecA* e o uso de antibióticos prévios, provavelmente devido aos vieses do questionário.
- Os antibióticos mais eficazes, segundo o antibiograma, foram a amicacina, a polimixina B e o cloranfenicol. Devendo-se evitar a penicilina, sulfa + trimetoprim e tetraciclina, pois estes apresentaram o pior resultado *in vitro*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, S. F. *Manual de Terapêutica Veterinária*. 2.ed. São Paulo: Roca, 2002.

BANNOEHR, J; Franco, A; IURESCEIA, M. *et al.* Molecular Diagnostic Identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Clin. Microbiol.*, v.47, n.2, p.469-471, 2009.

BANNOEHR, J.; GUARDABASSI, L. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Vet Dermatol.* v. 23, p. 253-e52, 2012.

BEMIS, D. A.; JONES, R. D; HIATT, L. E. *et al.* Comparison of Tests to Detect Oxacillin Resistance in *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus schleiferi*, and *Staphylococcus aureus* Isolates from Canine Hosts. *J. of Clin. Microbiol.*, v.44, n.9, p.3374-3376, 2006.

BECK, K.M; WAISGLASS, S.E; DICK, H.L.N; *et al.* Prevalence of meticillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) from skin and carriage sites of dogs after treatment of their meticillin-resistant or meticillin-sensitive staphylococcal pyoderma. *Vet Dermatol* n. 23 p.369–e67. 2012.

BOURGUIGNON, E; CONCEIÇÃO, L; NERO, L. A *et al.* *Identificação e perfil de resistência a antimicrobianos de Staphylococcus pseudintermedius isolados de piodermite canina*. Dissertação de Mestrado. UFV-Viçosa, 2012.

CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement*. CLSI document M100-S22. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

DEVRIESE L. A; VANCANNEYT, M; BAELE, M. *et al.* *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. *Int J Syst Evol Microbiol* v. 55, p. 1569–1573, 2005.

DEVRIESE, L. A; HERMANS, K; BAELE, M. *et al.* *Staphylococcus pseudintermedius* Versus *Staphylococcus intermedius*. *Vet Microbiol*, v.133, p.206-207, 2009.

FRANK, L. A; KANIA, S. A.; KIRZEDER, E. M. *et al.* Risk of colonization or gene transfer to owners of dogs with meticillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Vet Dermatol.* v. 20, p. 496-501, 2009.

GORTEL, K. Recognizing pyoderma: more difficult than it may seem. *Vet Clin Small Anim* n. 43. p. 1–18. 2013.

HANSELMAN, B. A; KRUTH, S; WEESE, J. S. Methicillin-resistant staphylococcal colonization in dogs entering a veterinary teaching hospital. *Vet Microbiol.* n. 126. p. 277-281. 2008

HARVEY, R. G; LLOYD, D. H. The distribution of *Staphylococcus intermedius* and coagulase-negative staphylococci on the hair, skin surface, within the hair follicles and on the mucous membranes of dogs. *Vet Dermatol.*v. 5, p.75–81. 1994.

HARVEY, R. G; LLOYD, D. H. The distribution of bacteria (other than Staphylococci and *Propionibacterium acnes*) on the hair, skin surface and within the hair follicles of dogs. *Vet Dermatol.* v. 6. p. 79. 1995.

HÁJEK, V. *Staphylococcus intermedius*, a New Species Isolated from Animals. *Int. J. of Syst. Bacteriol.*, v.26, n.4, p. 401-408, 1976.

HARVEY, R. G; NOBLE, W. C. A temporal study comparing the carriage on *Staphylococcus intermedius* on normal dogs or atopic dogs in clinical remission. *Vet Dermatol.* n. 5. p. 21. 1994

HENDRICKS, A; SCHUBERTH, H. J; SCHUELER, K. *et al.* Frequency of superantigen producing *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from canine pyoderma and proliferation-inducing potential of superantigens in dogs. *Res Vet Sci* n. 73. p.273. 2002.

HNILICA, K. A. Doenças de pele bacterianas. *In: Dermatologia de pequenos animais: Atlas colorido e Guia Terapêutico – 3ed. – Rio de Janeiro: Elsevier, Cap. 3, p. 41-47, 2012.*

HUERTA, B; MALDONADO, A; GINEL, P. J. *et al.* Risk factors associated with the antimicrobial resistance of staphylococci in canine pyoderma. *Vet Microbiol.* n. 150. P. 302-308. 2011.

IHRKE, P. J. An overview of bacterial skin disease in the dog. *British Vet J.* v. 143, p. 112–118,1987.

IHRKE, P. J. Bacterial Skin Disease in the dog a guide to canine pyoderma. U.S.A: Bayer AG, p. 98. 1996.

JEFFERS, J G. *Topical therapy for Drug-Resistant Pyoderma in Small Animals.* *Vet Clin Small Anim* v. 43, p. 41–50, 2013.

JONES, R. D; KANIA, S. A; ROHRBACH, B.W. et al. Prevalence of oxacillin- and multidrugresistant staphylococci in clinical samples from dogs: 1,772 samples (2001-2005). *J Am Vet Med Assoc.* 2007;230:221-7.

LARSSON JUNIOR, C. E. Estudo comparativo da eficácia da imonoterapia com bacterina e de dois esquemas de pulsoterapia antibiótica no manejo de piodermites superficiais idiopáticas recidivantes caninas, 2008, 88p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo.

KAWAKAMI, T; SHIBATA, S; MURAYAMA, N. et al. Antimicrobial susceptibility and methicillin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi subsp. coagulans* isolated from dogs with pyoderma in Japan. *J Vet Med Sci* 2010;72:1615-9.

KWON, N; PARK, K; JUNG, W. et al. Characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from chicken meat and hospitalized dogs in Korea and their epidemiological relatedness. *Vet. Microbiol.* v.117, p.304-312, 2006.

MANDERS, S. M. Toxin mediated streptococcal and staphylococcal disease. *J. Am. Acad. Dermatol.* n. 39. p. 393. 1998.

MARANAN, M. C; MOREIRA, B; BOYLE-VAVRA, S. et al. Antimicrobial resistance in Staphylococci: epidemiology, molecular mechanisms and clinical relevance. *Infectious disease clinics of north America.* v. 11. n. 4. p. 813-847. 1997.

MEDLEAU, L; LONG, R. E; BROWN, J. Frequency and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus* species isolated from canine pyodermas. *Am J Vet Res* 1986;47:229-31.

MEHROTRA, M; WANG, G; JOHNSON, W. M. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J Clin Microbiol.* 2000 Mar 38(3):1032-5.

MILLER, W H; GRIFFIN, C E; CAMPBELL, K L. *Muller and Kirk's Small Animal Dermatology.* Elsevier, 7ed. 2013. p. 184-223.

MORRIS, D. O; ROOK, K. A; SHOFER, F. S. Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003-04). *Vet Dermatol* 2006;17:332–7.

MUSHER, D. M; MACKENZIE, S.O. Infections due to *Staphylococcus aureus*. *Medicine*, 56:383, 1977

PAUL, N. C; BARGAMAN, S. C; MOODLEY, A. *et al.* *Staphylococcus pseudintermedius* colonization patterns and strain diversity in healthy dogs: A cross-sectional and longitudinal study. *Vet. Microbiol.* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.06.012>

NCCLS. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition.* NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.)

NIENHOFF, U; KADLECK, L; CHABERNY, I. F. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* Among Dogs Admitted to a Small Animal Hospital. *Vet Microbiol.*, v.150, p.191-197, 2011.

ONUMA, K.; TANABE, T.; SATO, H. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from healthy dogs and dogs affected with pyoderma in Japan. *Vet Dermatol*, v.23, p.17–e5, 2011.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; *et al.* Gênero *Staphylococcus*. In: _____. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 55-60.

RUSCHER, C; LUBKE-BECKER, A; WLEKLINSKI, C. *et al.* Prevalence of Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from clinical samples of companion animals and equidae. *Vet Microbiol*, v. 136, p. 197–201, 2009.

SAIJONMAA-KOULUMIES, L. E; LLOYD, D. H. Colonization of the canine skin with bacteria. *Vet Dermatol*. n. 7. p. 153. 1996.

SASAKI, T.; KIKUCHI, K.; TANAKA, Y.; et al. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *J Clin Microbiol*, v. 45, p. 2770–2778, 2007.

SASAKI, T.; KIKUCHI, K.; TANAKA, Y. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a veterinary teaching hospital. *J Clin Microbiol*. v.45, p.1118–1125, 2007.

SASAKI, T.; TSUBAKISHITA, S.; TANAKA, Y. et al. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. *J. Clin. Microbiol*, v.48, p.765–769, 2010.

PHILLIPS, W. E; WILLIAMS, B. J. Antimicrobial susceptibility patterns of canine *Staphylococcus intermedius* isolates from veterinary clinical specimens. *Am J Vet Res* 1984;45:2376–9.

WANG, Y.; LOGUE, C. M.; LIU, K. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from canine pyoderma in North China. *J App Microbiol*. v.112, p.623–630, 2012.

WEESE, S.; VAN DUIJKEREN, E. Methicillin-resistant *Staphylococcus*

aureus and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Vet Microbiol* n. 140 p. 418–429. 2010.

ZHANG, K.; McCLURE, J. A; ELSAYED, S. et al. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. of Clin Microbiol*. n. 43. P. 5026–33. 2005.

WERTHEIM, H. F; MELLES, D. C; VOS, M. C. et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis*; n. 5; p. 751–762. 2005.

WEESE, S.; VAN DUIJKEREN, E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Vet Microbiol* n. 140 p. 418–429. 2010.

WIELDERS, C. L. C; VRIENS, M. R; BRISSE, S. et al. Evidence for in-vivo transfer of *mecA* DNA between strains of *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, v. 357, p.1674–5, 2001.

ANEXO 1: Termo de consentimento livre e esclarecido fornecido aos proprietários dos cães com piodermite superficial incluídos no estudo de avaliação da prevalência de MRSP em caninos acometidos por tal enfermidade. Belo Horizonte (2013).

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado para participar da pesquisa Prevalência de *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticilina em cães com infecções bacterianas de pele. Você foi selecionado, pois seu cão foi diagnosticado com infecção bacteriana de pele e sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição. Os objetivos deste estudo são de avaliar a prevalência e microorganismos resistentes a antibióticos betalactâmicos, os mais comumente usados no tratamento das infecções bacterianas cutâneas na prática veterinária. Os animais portadores destes microorganismos na maioria das vezes são refratários aos tratamentos efetuados, provocando recorrência das infecções e fracasso do tratamento. Animais saudáveis podem também ser portadores destas bactérias, sendo estes suscetíveis a futuras infecções cutâneas recorrentes e possíveis transmissores para outros animais e até mesmo proprietários. Sua participação nesta pesquisa consistirá permitir a realização de coleta de amostras de lesões do seu animal através de *swab* de algodão para cultura bacteriana, exame citológico das lesões e coleta de sangue para exames laboratoriais relacionados. Os riscos relacionados com a participação do animal será mínimo e relacionado apenas a lesões de caráter leve caso ocorra alguma intercorrência na coleta das amostras. Os benefícios relacionados com participação do animal são de melhorar a efetividade do tratamento das infecções bacterianas de pele nos cães através do conhecimento da prevalência de patógenos resistentes aos tratamentos mais utilizados. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Os dados informados serão o nome do animal, idade e os dados gerados através da pesquisa. Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço institucional do pesquisador principal e do CEP, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho

Escola de Veterinária da UFMG – (31) 3409-2247

Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha

31270-901 - BELO HORIZONTE - MG

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Concordo na utilização das fotos do animal na apresentação da pesquisa e possíveis publicações.

Sujeito da pesquisa

Data: //

Escola de Veterinária – UFMG

Belo Horizonte - MG

ANEXO 2- Questionário apresentado aos proprietários dos cães com piodermite superficial incluídos no estudo de avaliação da prevalência de MRSP em caninos acometidos por tal enfermidade. Belo Horizonte (2013).

Questionário

Nome do animal:

Sexo:

Raça:

Idade:

Pelagem:

Nome do proprietário:

1- Qual a queixa principal?

2- Com que idade manifestou o quadro clínico pela primeira vez?

3- Como era quando começou?

4- Fez uso de algum antibiótico nos últimos seis meses? Qual?

5- Fez uso de algum medicamento imunossupressor nos últimos seis meses? Qual?

6- Quais tratamentos já realizou para a dermatopatia e qual foi a resposta destes?