

ELISA BOURGUIGNON DIAS DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO E PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE  
*STAPHYLOCOCCUS PSEUDINTERMEDIUS* ISOLADOS DE PIODERMITE  
CANINA**

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária, para obtenção  
do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2012

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586i  
2012

Silva, Elisa Bourguignon Dias da, 1981-

Identificação e perfil de resistência à antimicrobianos de  
*Staphylococcus pseudintermedius* isolados de piodermite  
canina / Elisa Bourguignon Dias da Silva. – Viçosa, MG,  
2012.

x, 56f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Lissandro Gonçalves Conceição.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Cão - Doenças. 2. Cão - Pele - Inflamação. 3. Drogas -  
Resistência em microorganismos.

4. *Staphylococcus intermedius*.

5. *Staphylococcus pseudintermedius*. I. Universidade Federal  
de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed. 636.7098651

ELISA BOURGUIGNON DIAS DA SILVA

**IDENTIFICAÇÃO E PERFIL DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS DE  
*Staphylococcus pseudintermedius* ISOLADOS DE PIODERMITE CANINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

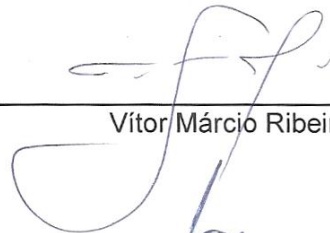
APROVADA: 15 de fevereiro de 2012.



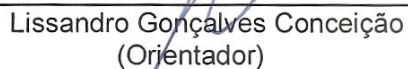
\_\_\_\_\_  
Maria Aparecida Scatamburlo Moreira



\_\_\_\_\_  
Luis Augusto Nero



\_\_\_\_\_  
Vítor Márcio Ribeiro



\_\_\_\_\_  
Lissandro Gonçalves Conceição  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha família pelo apoio durante o mestrado.

À Letícia, Luciana, Clara, Edna, Débora, Karen, Flávia e Cibely que participaram diretamente da minha formação como mestre me apoiando todos os dias, nas horas boas e nas horas difíceis. Aos mestrandos, doutorandos, residentes e estagiários, colegas que dividiram experiência e foram fundamentais para o dia a dia. A todos os amigos que participaram indiretamente da minha vida nesses anos. Gostaria de agradecer em especial à Camila e a Gabriela pela dedicação ao meu projeto e tempo de trabalho dedicado a me ajudar.

Ao meu orientador Professor Lissandro pela oportunidade de fazer mestrado, por toda a ajuda e conselhos. À professora Cidinha e ao professor Nero que adotaram o meu projeto e foram essenciais em todas as etapas do meu trabalho. Vocês são ótimos pais adotivos! Às professoras Andreia e Maria Cristina pelas conversas e ensinamentos.

À todos os funcionários, também meus grande amigos, que fizeram o meu trabalho mais agradável.

Ao pessoal da SOVIPA, principalmente Clotilde e Augusto, por realizarem um trabalho tão importante que eu tive oportunidade de participar. Continuem!!

Finalmente gostaria de agradecer aos animais que sempre foram minha força e inspiração, principalmente aos 25 cães que participaram do meu estudo.

## SUMÁRIO

Lista de ilustrações .....	v
Lista de tabelas.....	vi
Lista de quadros .....	vii
Resumo .....	viii
Abstract.....	ix
<b>Introdução geral.....</b>	<b>1</b>
<b>Capítulo I - <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> resistentes a meticilina – Revisão de literatura.....</b>	<b>2</b>
Resumo .....	3
Abstract .....	3
1. Introdução .....	4
2. Revisão bibliográfica .....	5
2.1 <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> .....	5
Microbiota da pele normal e infectada .....	5
Evolução da taxonomia do <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> .....	6
Métodos de identificação de <i>Staphylococcus</i> do SIG.....	7
2.2 Ocorrência mundial e no Brasil .....	7
2.3 Epidemiologia.....	9
2.4 Resistência e tratamento .....	11
Métodos para detecção da resistência a meticilina .....	11
Resistência a outras drogas.....	12
Opções de tratamento.....	13
Conclusão.....	14
Referências .....	15

<b>Capítulo II - <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> como principal agente etiológico da piodermite canina .....</b>	<b>20</b>
Resumo .....	21
Abstract .....	22
Introdução.....	23
Material e métodos .....	25
Seleção de animais e coleta de amostras clínicas .....	25
Processamento de amostras clínicas e identificação fenotípica .....	26
Análises genotípicas para identificação de espécies .....	26
Resultados .....	27
Discussão .....	32
Referências bibliográficas .....	34
Anexo .....	37
<b>Capítulo III - Susceptibilidade Antimicrobiana e Resistência a Meticilina em isolados de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> obtidos de piodermite canina .....</b>	<b>39</b>
Resumo .....	40
Abstract .....	41
Introdução.....	42
Material e métodos .....	44
Microrganismos.....	44
Perfil de resistência .....	44
Teste genotípico para identificação do gene <i>mecA</i> .....	45
Resultados .....	46
Discussão .....	49
Referências .....	52
<b>Conclusão geral.....</b>	<b>55</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### CAPÍTULO II

**Figura 1** - Eletroforese em gel de agarose da amplificação dos produtos de PCR do gene *pta* .....31

**Figura 2** - Eletroforese em gel de agarose da digestão pela *Mbol* do produto de PCR do gene *pta* .....32

**Figura 3** - Eletroforese em gel de agarose da digestão pela *Mbol* do produto de PCR do gene *pta* .....32

### CAPÍTULO III

**Figura 1** - Percentual de resistência de isolados de *S. pseudintermedius* a diferentes antimicrobianos .....46

**Figura 2** - Eletroforese em gel de agarose dos resultados de PCR para a detecção do gene *mecA* .....49

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 1</b> - Resultados das análises fenotípicas de 75 isolados bacterianos obtidos de lesões de piodemite em cães .....	30
---	----

### CAPÍTULO III

<b>Tabela 1</b> - Resistência simultânea aos antimicrobianos dos isolados de <i>S. pseudintermedius</i> .....	47
---	----

## LISTA DE QUADROS

### CAPÍTULO I

**Quadro 1** - Ocorrência de *Staphylococcus pseudintermedius* metilina resistentes em animais e humanos, incluindo afecções, local da colheita de amostras e método de identificação das amostras em diferentes países. ....8

### CAPÍTULO II

**Quadro 1** - Características clínicas observadas no exame dermatológico dos 25 cães selecionados para o estudo, atendidos no Hospital Veterinária da UFV, entre agosto e dezembro de 2010. ....29

### CAPÍTULO III

**Quadro 1** - Perfis de resistência dos 72 isolados de *S. pseudintermedius* frente aos 12 antimicrobianos estudados e a presença do gene *mecA*. ....48

## RESUMO

BOURGUIGNON, Elisa, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro, 2012. **Identificação e Perfil de Resistência a Antimicrobianos de *Staphylococcus pseudintermedius* Isolados de Piodermite Canina.** Orientador: Lissandro Gonçalves Conceição.

As piodermites são uma das afecções dermatológicas mais comumente encontradas nos cães sendo que o *Staphylococcus pseudintermedius* é a bactéria mais frequentemente isolada das lesões. Durante os últimos anos uma das maiores preocupações na dermatologia veterinária tem sido o crescente número de isolados de *Staphylococcus* spp. resistentes a metilina ou seja, resistentes a vários antimicrobianos utilizados na clínica dermatológica. As infecções por estas bactérias resistentes são uma causa importante de morbidade em animais de companhia e podem ser fonte de transmissão para humanos. Objetivou-se com este trabalho rever a literatura acerca de *Staphylococcus pseudintermedius* e sobre a resistência nestas bactérias. Também foram objetivos isolar e identificar através de testes bioquímicos e de biologia molecular as bactérias causadoras da piodermite canina, determinando o perfil de resistência aos antimicrobianos comumente utilizados para esta afecção através de antibiograma e da presença do gene de resistência, *mecA*. Dos 25 animais selecionados para o estudo foram obtidos 75 isolados bacterianos. Ao todo, 97,3% dos isolados avaliados pelos testes fenotípicos convencionais e pelo Kit API Staph e 96% dos avaliados pelo PCR Foram identificados como *Staphylococcus pseudintermedius*. Dos 72 isolados submetidos ao PCR para a identificação do gene *mecA* apenas quatro não apresentaram o gene de resistência. O presente estudo alerta para o alto número de *Staphylococcus pseudintermedius* resistentes no Brasil e para a necessidade de se realizar antibiogramas a fim de determinar a melhor abordagem terapêutica, evitando o aparecimento de bactérias multi resistentes.

## ABSTRACT

BOURGUIGNON, Elisa, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2012. **Identification and Antimicrobial Resistance profile of *Staphylococcus pseudintermedius* Isolated from Canine Pyoderma.** Adviser: Lissandro Gonçalves Conceição.

Pyoderma is one of the most common skin disorders in dogs and *Staphylococcus pseudintermedius* is the bacterium that is most often isolated from lesions. During recent years a major concern in veterinary dermatology has been the increasing number of methicillin resistant *Staphylococcus* spp. isolates, that are resistant to several antimicrobials used in dermatological clinic. Infections caused by these resistant bacteria are a major cause of morbidity in pets and can be a source of transmission to humans. The objectives of this work are to review the literature on *Staphylococcus pseudintermedius* and the resistance in these bacteria. It is also to isolate and identify through biochemical and molecular biology tests, bacteria that causes canine pyoderma, determining their resistance profile to antimicrobials commonly used for this condition by antimicrobial susceptibility test and by the presence of the resistance gene, *mecA*. Seventy five bacterial isolates were obtained from the 25 animals selected to this study. A total of 97.3% of the isolates submitted to conventional phenotypic tests and API Staph Kit and 96% of those submitted to PCR were identified as *Staphylococcus pseudintermedius*. Of the 72 isolates submitted to PCR for the identification of the *mecA* gene, only four did not have this resistance gene. This study alerts to the high number of resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Brazil, and to the need of performing antimicrobial susceptibility tests to determine the best therapeutic approach, preventing the emergence of multi-resistant bacteria.

## INTRODUÇÃO GERAL

O termo piodermite é usado para as infecções bacterianas da pele e está entre as causas mais frequentes de afecções dermatológicas nos cães. As lesões podem ser superficiais ou envolverem estruturas mais profundas. São comumente encontradas pápulas, pústulas, colaretes epidérmicos, nódulos, crostas, alopecia. É uma das causas mais frequentes de afecções dermatológicas nos cães (Ihrke, 1996). Geralmente está associada à bactéria *Staphylococcus pseudintermedius* e é uma das razões mais comuns do uso de antimicrobianos nos cães (Guardabassi et al., 2004). Um problema importante, tanto do ponto de vista da saúde animal como da saúde pública é o aparecimento de *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus aureus* resistentes a vários antimicrobianos utilizados frequentemente na clínica e a possível transmissão entre animais e humanos.

Vários países vêm realizando estudos para identificar a presença de *Staphylococcus* resistentes além de comparar as cepas bacterianas encontradas nos animais de estimação com aquelas encontradas nos seus proprietários ou pessoas que trabalham em hospitais. No Brasil pouco se sabe sobre a presença de bactérias resistentes isoladas de piodermite canina. Devido a frequência das piodermite caninas e o uso indiscriminado de antimicrobianos para o seu tratamento é importante que sejam realizados estudos que avaliem a presença de *Staphylococcus* spp. resistentes, para que o médico veterinário possa escolher a melhor abordagem terapêutica, diminuindo o risco da seleção de bactérias resistentes e alertando para a transmissão entre o animal e seu proprietário.

# Capítulo I

## ***Staphylococcus pseudintermedius* resistentes a meticilina – Revisão de literatura**

## ***Staphylococcus pseudintermedius* resistentes a meticilina – Revisão de literatura**

E. Bourguignon, M. A. S. Moreira, L.A. Nero, G. N. Viçosa, C. M. M. Corsini, L. G. Conceição\*

\* Autor para correspondência. Endereço: Departamento de veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Avenida Peter Henry Rolfs, s/n Campus Universitário 36570-000, Viçosa – MG, Brasil. Telefone/fax: (31) 38991457. E-mail: [lissandro@ufv.br](mailto:lissandro@ufv.br)

### **Resumo**

*Staphylococcus pseudintermedius* é a bactéria mais frequentemente isolada de pele de cães. O aparecimento de *S. pseudintermedius* resistentes a vários antimicrobianos utilizados frequentemente na clínica e a possível transmissão entre animais e humanos é importante, tanto do ponto de vista da saúde animal como da saúde pública. Este artigo revê a literatura tendo como foco a evolução taxonômica do *S. pseudintermedius*, sua identificação, detecção de resistência nestas bactérias, ocorrência e opções de tratamento. O aparecimento de bactérias resistentes é emergente em vários países do mundo fazendo-se necessária a instrução de médicos veterinários sobre o assunto, para que possam escolher a melhor terapia antimicrobiana para cada caso, evitando o aparecimento de isolados resistentes.

**Palavras chave:** Cães, oxacilina, *mecA*, antimicrobianos.

### **Abstract**

*Staphylococcus pseudintermedius* is the most frequently isolated bacteria from canine skin. A major problem, both in terms of animal health and public health is the emergence of *Staphylococcus pseudintermedius* resistant to various

antimicrobial agents commonly used in medicine and its possible transmission between animals and humans This article reviews the literature focusing on the taxonomic evolution of *Staphylococcus pseudintermedius*, the identification, the detection of resistance in these bacteria, their occurrence and treatment options. The arising of resistant bacteria is an emerging problem in many countries, making necessary the education of veterinarians about the problem, so they can choose the best antimicrobial therapy for each case, avoiding the emergence of resistant isolates.

**Key Words:** Dogs, oxacillin, *mecA*, antimicrobials.

## 1. INTRODUÇÃO

*Staphylococcus pseudintermedius*, descrito por Devriese e colaboradores em 2005 é a bactéria mais comumente isolada de pele em cães (Devriese et al., 2009) e está entre os principais motivos do uso de antimicrobianos nestes animais (Guardabassi et al., 2004). Durante os últimos anos, uma das maiores preocupações na clínica de pequenos animais, principalmente na área da dermatologia, tem sido o crescente número de isolados de *Staphylococcus* spp. resistentes a metilina, ou seja, resistentes a vários antimicrobianos comumente utilizados na clínica. As infecções por estas bactérias resistentes são uma causa importante de morbidade em animais de companhia e podem ser fonte de transmissão para humanos.

Vários países vêm realizando estudos para identificar a presença desses *Staphylococcus* resistentes além de comparar as cepas bacterianas encontradas nos animais de estimação com aquelas encontradas nos seus proprietários ou pessoas que trabalham em hospitais veterinários. No Brasil existem poucos estudos publicados nessa área sendo que a maioria deles foram realizados na medicina humana e na área de alimentos.

Nesta revisão de literatura o termo *S. (pseud)intermedius* é utilizado para aquelas cepas que foram identificadas como *Staphylococcus intermedius* em estudos anteriores a descrição de *S. pseudintermedius*.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 *Staphylococcus pseudintermedius*

#### Microbiota da pele normal e infectada

A pele dos cães abriga várias espécies bacterianas que são consideradas habitantes normais. Bactérias como *Staphylococcus (pseud)intermedius*, *Micrococcus* spp., *S. epidermidis*, *S. xylosus*, *S. sciuri*, *Streptococcus*  $\alpha$ -hemolíticos, *Clostridium* spp., *Propionibacterium acnes*, *Acinetobacter* spp. e aeróbios Gram-negativos são classificadas como residentes por conseguirem se multiplicar em pele normal. Outras, consideradas transientes, são adquiridas do ambiente e não são capazes de se multiplicar em pele normal (Scott et al., 2001; May, 2006).

*Staphylococcus* são bactérias anaeróbias facultativas, Gram-positivas, pertencentes à família *Staphylococcaceae* que inclui 46 espécies e 24 subespécies (Euzéby, 1997).

*S. (pseud)intermedius* pode ser isolado das narinas, cavidade oral, anus, virilha e cabeça de cães saudáveis assim como naqueles com doenças inflamatórias da pele (Griffeth et al., 2008). A piodermite, infecção bacteriana piogênica de pele está entre as causas mais frequentes de afecções dermatológicas nos cães. As lesões podem ser superficiais e envolverem apenas a epiderme ou podem comprometer estruturas mais profundas na derme ou tecido subcutâneo, sendo portanto divididas em piodermite de superfície, superficial e profunda. São comumente encontradas pápulas, pústulas, colaretes epidérmicos, nódulos, crostas, alopecia, dentre outras.

Dentre as piodermites, a foliculite bacteriana superficial está entre as mais frequentes (Ihrke, 1996). Qualquer infecção de pele deve ser considerada sinal de alguma doença de base cutânea, metabólica ou imunológica, sendo tradicionalmente classificada como primária ou secundária, conforme ausência ou presença de causa de base. As infecções secundárias são as mais comuns. Quase todas as doenças de pele podem predispor a infecções, mas as doenças alérgicas, seborréicas e displásicas são as que mais causam infecções (Scott et al., 2001).

### **Evolução da taxonomia do *Staphylococcus pseudintermedius***

Em 1976, *S. intermedius* foi descrito como nova espécie proveniente de isolados de cães, pombos, cavalos e martas (Hajek, 1976). Antes dessa descrição todas as cepas de cocos gram-positivos com algumas características diagnósticas como coagulase em tubo, DNase ou produção de  $\beta$ -hemólise eram consideradas *S. aureus*. A descrição de *S. intermedius* foi importante porque separou esta espécie de *S. aureus* evitando uma grande confusão epidemiológica. Hajek (1976) já havia notado heterogeneidade entre as cepas que ele identificou como *S. intermedius*, mas essa definição taxonômica não foi questionada até recentemente (Devriese et al., 2009). Em 2005, foi descrita uma nova espécie, *S. pseudintermedius* (Devriese et al., 2005). Isolados fenotipicamente identificados como *S. intermedius* foram reclassificados através de técnicas moleculares como três espécies distintas, incluindo *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* e *S. delphini* que juntos representam o grupo do *S. intermedius* - SIG (Sasaki et al., 2007b). Concluiu-se que *S. pseudintermedius* e não *S. intermedius*, como acreditava-se até então, é o agente mais frequentemente isolado de pele canina. Foi proposto que todas as cepas provenientes de pele de cão pertencente ao grupo do *S. intermedius* fossem consideradas *S. pseudintermedius* até que o contrário fosse comprovado por meio de investigação genômica (Devriese et al., 2009).

## Métodos de identificação de *Staphylococcus* do SIG

*S. intermedius* pode ser distinguido entre as espécies do seu grupo usando propriedades fenotípicas como arginina dihidrolase positiva e produção de ácido pela  $\beta$ -gentiobiose e D-manitol. No entanto, não existem testes que possam diferenciar fenotipicamente com exatidão, *S. pseudintermedius* de *S. delphini*. Para discriminar entre essas duas espécies são necessários métodos moleculares (Sasaki et al., 2007b).

Análises moleculares filogenéticas da sequência parcial dos genes *sodA* e *hsp60* são necessárias para discriminar entre *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* e *S. delphini* (Sasaki et al., 2007a). Outros genes como o 16S *rRNA* (Devriese et al., 2005; Ghebremedhin et al., 2008), *argD* (Bannoehr et al., 2007), *gap*, *rpoB*, *tuf* (Ghebremedhin et al., 2008), *kat* (Blaiotta et al., 2010), também foram utilizados na identificação e classificação destas bactérias.

Bannoehr et al. (2009), descreveram teste de Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) utilizando a enzima de restrição *Mbol*, que permitiu diferenciar *S. pseudintermedius* do *S. delphini*. Um fragmento de 320bp pertencente ao gene *pta* que codifica a enzima fosfacetiltransferase foi amplificado e o produto do PCR de *S. pseudintermedius* apresentaram único sítio de restrição da enzima *Mbol*. Como resultados foram obtidos dois fragmentos de 213bp e 107bp contidos em todas as cepas de *S. pseudintermedius*. Outras espécies do grupo do SIG não contêm esse sítio de restrição, o que permite diferenciação.

### 2.2 Ocorrência mundial e no Brasil

A ocorrência de *S. pseudintermedius* metilina resistente (MRSP) tanto na colonização, como na infecção de animais e humanos, vem sendo descrita com frequência crescente, conforme apresentado no Quadro 1.

Quadro 1 : Ocorrência de *Staphylococcus pseudintermedius* metilina resistentes em animais e humanos, incluindo afecções, local da colheita de amostras e método de identificação das amostras em diferentes países.

País	Animais	Humanos	Afecções (animais)	Local de Coleta (Cães)	Testes de Identificação de MRSP	% de MRSP cães	%MRSP humano	Autor
EUA	Cães	-	Piodermite	Pele	Difusão em disco <i>mecA</i> e PBP	3,5%	-	Kania et al. (2004)
EUA	Cães	-	Saudáveis e doença de pele inflamatória	Cabeça, mucosa bucal e gengival, nasal, prega inguinal e anus.	PBP e <i>mecA</i>	8%	-	Griffeth et al. (2008)
Canadá	Cães	-	Diversas	Nasal, axilar e retal	Difusão em agar e PBP	2,1%	-	Hanselman et al. (2008)
Japão	Cães	Funcionários do hospital veterinário	Diversas	Nasal	MIC e <i>mecA</i>	32%	5%	Sasaki et al. (2007a)
China	Cães	-	Saudáveis	Nasal	Difusão em disco	16,7%	-	Epstein et al. (2009)
EUA	Cães	Proprietários	Piodermite	Lesões de pele	Difusão em disco <i>mecA</i>	60%	8%	Frank et al. (2009)
Alemanha	Cães Gatos Cavalos Jumentos	-	Diversas	-	Difusão em disco	0,8%	-	Ruscher et al. (2009)
EUA	Cães Gatos	Veterinários e estudantes	Saudáveis	Mucosa anal e oral, virilha e nasal	MIC e PBP	5%	5,3%	Morris et al. (2010)
Japão	Cães	-	Piodermite	Lesões de pele	<i>mecA</i>	66,5%	-	Kawakami et al. (2010)
Itália	Cães	-	Diversas	Diversos	<i>mecA</i>	21%	-	De Lucia et al. (2011)
Alemanha	Cães	-	Diversas	Nasal, faríngeo e perineal	MIC e <i>mecA</i>	7,4%	-	Nienhoff et al. (2011)

PBP: Proteína ligadora de penicilina. MIC: Concentração inibitória mínima.

Raros são os estudos que relatam MRS no Brasil. Um estudo avaliou o perfil de resistência antimicrobiana de amostras de *S.(pseud)intermedius* e *S. aureus* isoladas de infecções de vários sítios diferentes em humanos, amostras de otite canina e de mastite bovina. A resistência foi avaliada por meio do teste de difusão em disco, diluição em agar, micro diluição em caldo, difusão em disco modificada e através da presença do gene *mecA*. Das 30 amostras avaliadas de otite canina duas foram positivas para a presença do gene *mecA* (Coelho et al. 2007).

### **2.3 Epidemiologia**

Informações sobre a transmissão de MRSP entre as espécies e da contaminação ambiental são escassas. Devido a este fato foi realizado estudo com o objetivo de determinar a contaminação e ou colonização de humanos, animais de estimação e o ambiente compartilhado. Foram selecionados, 20 pacientes (18 cães e 2 gatos) de diferentes clínicas veterinárias, com diagnóstico confirmado de infecção por MRSP. Foram coletados swabs nasais dos proprietários e swabs nasais e perineais de todos os animais presentes no mesmo domicílio. Coletou-se material proveniente de cinco a oito ambientes diferentes da casa, incluindo aqueles de contato direto com os animais, como comedouros e camas e também de locais aos quais os animais não tinham acesso. Dentre os animais que tinham contato com os aqueles afetados, 36% apresentaram MRSP. Os swabs nasais de 4% dos humanos contactantes foram MRSP positivos, sendo estes pertencentes a duas pessoas de uma mesma residência. Swabs positivos para MRSP foram encontrados em 70% das casas. O fato de encontrar MRSP em locais onde ocorrem pouco ou nenhum contato físico com os animais indicam que partículas de poeira podem veicular esses agentes a locais distantes. O achado mais importante deste estudo é que o MRSP não foi frequentemente isolado de humanos mesmo estes vivendo no mesmo ambiente com animais infectados. No entanto, o MRSP foi mais frequentemente isolado de animais em contato com estes indivíduos afetados e

de ambientes da casa. Este estudo ainda sugere que o risco de seres humanos serem colonizados por um MRSP adquirido do ambiente é pequeno ou eles erradicam a colonização mais rapidamente do que os animais (Duijkeren et al., 2011a).

Estudo semelhante ao de Duijkeren et al. (2011a) foi realizado com 16 cães com diagnóstico de infecção por MRSP. Amostras dos animais acometidos, contactantes, proprietários e da residência foram coletadas uma vez por mês durante seis meses consecutivos. Em cinco das 12 casas isolou-se MRSP de modo intermitente. O ambiente e os animais em contato também foram MRSP positivos, na maioria das vezes, quando o cão afetado também era positivo. Em quatro casas as amostras ambientais foram positivas mesmo quando nenhum animal ou humano foi positivo, indicando a sobrevivência dos MRSP no ambiente por prolongados períodos. Concluiu-se que os cães infectados com MRSP podem ficar colonizados por prolongados períodos e que alguns animais podem ser MRSP positivos após vários testes negativos, ou após o desaparecimento de sinais clínicos. Estes resultados mostraram a importância dos veterinários ficarem alertas com pacientes que foram MRSP positivos e também da importância de serem realizadas novas culturas mesmo após o tratamento. O ambiente e os animais em contato podem agir como reservatórios para infecções recorrentes por MRSP. Colonização por longos períodos foi encontrada em cães, mas a transmissão para humanos é rara e humanos nunca foram MRSP positivos por vezes consecutivas, sugerindo contaminação transitória ao invés de colonização (Laarhoven et al., 2011).

## 2.4 Resistência e tratamento

### Métodos para a detecção da resistência a meticilina

A resistência a antimicrobianos é causada pela evolução das bactérias, ou seja, pela mutação espontânea e recombinação de genes, que criam variabilidade genética sobre a qual atua a seleção natural aos mais aptos. As drogas atuam como agentes seletivos, favorecendo as bactérias resistentes, presentes na população. O desenvolvimento de resistência pode se dar por resistência cromossomal como resultado de mutação espontânea, ou por mecanismos de transferência de material genético e plasmídeos, entre bactérias. O esforço para descobrir e sintetizar novas drogas pode levar anos, portanto, é necessário uso racional dos antimicrobianos para evitar resistências (Andrade, 2002).

Historicamente, a resistência às penicilinas penicilinase-estáveis (meticilina, nafcilina e oxacilina) são referidas como “resistência a meticilina”, mesmo a meticilina não sendo o agente de escolha para realizar os antibiogramas e sim, a oxacilina. A resistência a meticilina é de relevância particular porque é conferida pela presença de um gene *mecA* que codifica a produção de alteração nas proteínas ligadoras de penicilina (PBP ou PBP2a), o que leva a baixa afinidade por todos antimicrobianos beta-lactâmicos. Essa proteína pode ser expressa homogeneamente ou heterogeneamente, sendo a primeira detectada com métodos convencionais de detecção de resistência e a segunda é mais difícil de ser detectada devido ao fato que somente uma fração da população expressa o fenótipo de resistência (CLSI, 2008). Portanto, *Staphylococcus* meticilina resistentes (MRS) são resistentes a vários antimicrobianos (Enright et al., 2002; Weese e Duijkeren, 2010), como a ampicilina, amoxicilina, ácido clavulânico, cefalexina, ceftiofur e cefaclor (Andrade, 2002), que são comumente utilizados no tratamento da piodermite canina. As cepas resistentes a meticilina muitas vezes apresentam múltipla resistência que inclui não só antimicrobianos beta-lactâmicos, mas também, aminoglicosídeos, macrolídeos, clindamicina e tetraciclina (Quinn et al., 1994).

A maioria dos laboratórios veterinários usa métodos fenotípicos para a detecção de MRS. Tanto o teste de micro diluição em caldo quanto o teste de difusão em disco são comumente utilizados (Duijkeren et al., 2011b). O teste de difusão em disco é simples e menos oneroso para determinar a presença de MRS (Bemis et al., 2009).

O teste de difusão em disco para oxacilina e o Etest (teste comercial para determinar a concentração inibitória mínima de um antimicrobiano para inibir o crescimento bacteriano) têm alta sensibilidade e especificidade para detectar resistência à oxacilina mediada pelo *mecA* em isolados de *S. (pseud)intermedius*, existindo alta correlação com os resultados apresentados pelo teste de aglutinação em látex para detecção da PBP2a (Bemis et al., 2006).

Os critérios de interpretação do “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI) de 2008 e 2004 foram comparados para identificar o fenótipo de amostras de *S. pseudintermedius* oxacilina resistentes confirmadas pela presença do *mecA*. Segundo o CLSI de 2008, valores de interpretação de  $\leq 10$  mm do método de disco-difusão resultaram em sensibilidade de 70% no diagnóstico para amostras *mecA* positivas. Se os isolados intermediários forem considerados resistentes (zona de inibição de 11 ou 12 mm) a sensibilidade aumenta para 93%. Já quando considerado o critério de interpretação do CLSI de 2004 de  $\leq 17$  mm a sensibilidade seria de 100% (Schissler et al., 2009).

O teste mais confiável para a detecção da resistência a metilina é a PCR do gene *mecA*, no entanto, poucos laboratórios realizam este teste para diagnóstico de rotina (Schissler et al., 2009).

### **Resistência a outras drogas**

Estudo multicêntrico internacional que avaliou o perfil de resistência de MRSP na Europa e nos Estados Unidos, identificou cepas multi resistentes a todos os antimicrobianos orais utilizados para tratamento na clínica de pequenos animais. As drogas as quais estas cepas eram susceptíveis não são

autorizadas para uso animal nestes países (Perreten et al., 2010). Além do *mecA*, os MRSP isolados também continham vários outros genes de resistência como os relacionados a eritromicina (*ermB*), clindamicina (*ermB* e *InuA*), trimetoprim (*dfrG*), gentamicina (*aac6'-Ie-aph2'-Ia*), kanamicina (*aph3'-III*), estreptomicina (*ant6'-Ia*), tetraciclina (*tetM* e *tetK*) e cloramfenicol (*cat<sub>pC221</sub>*) também foram encontrados (Perreten et al., 2010; Duijkeren et al., 2011b).

Estudos apontam o uso prévio de antibacterianos como um fator de risco para a infecção com os MRSP (Sasaki et al., 2007a; Duijkeren et al., 2011). Estudo avaliou o perfil de resistência de MRSP isolados de cães e 30% destes animais eram resistentes a eritromicina, clindamicina, sulfametoxazol-trimetoprim, gentamicina e levofloxacina. A maioria destes animais havia recebido antimicrobianos nos últimos seis meses (Sasaki et al., 2007a)

### **Opções de tratamento**

Informações da eficácia de antimicrobianos no tratamento de animais infectados com MRSP são escassas. As poucas informações sobre tratamentos de animais com MRSP são baseadas em estudos com poucos pacientes (Loeffler et al., 2007).

Muitas infecções causadas pelos MRSP ocorrem em feridas pós-cirúrgicas e uma boa abordagem terapêutica inclui melhor debridamento e limpeza destas feridas. Antissépticos tópicos utilizados para tratamento de feridas cirúrgicas incluem a clorexidina e o iodo povidine. A terapia tópica pode ser uma boa opção no tratamento de lesões superficiais, mas provavelmente não atua nas lesões mais profundas. Como as manifestações clínicas do MRSP são variáveis, não existe um único protocolo de tratamento disponível para todas as infecções e o tratamento deve ser diferenciado de acordo com as necessidades individuais dos pacientes. Quando se escolhe o antimicrobiano para o tratamento de um animal, o risco do desenvolvimento de resistência deve ser levado em conta. Além disso, o perfil de resistência da cepa de MRSP isolada do animal, a severidade e localização das lesões e a presença de causa

de base também devem ser consideradas. A terapia tópica pode ser uma opção em alguns casos, no entanto em muitos casos é necessária terapia antimicrobiana sistêmica (Duijkeren et al., 2011b).

MRSP multi resistentes representam desafio para terapia antimicrobiana na medicina veterinária pelas poucas opções de tratamento. Esta dificuldade em encontrar drogas eficazes pressionam os veterinários a utilizarem antimicrobianos usados para o tratamento de infecções sérias em humanos, o que levanta questões éticas (Weese e Duijkeren, 2010). O uso em medicina veterinária de drogas como a vancomicina e linezolida que são a única escolha para tratamento de MRS em humanos é questionável, devido ao fato da transferência de genes de resistência poder ocorrer entre cepas e espécies diferentes de estafilococos (Perreten et al., 2010).

### **3. CONCLUSÃO**

Nos últimos anos MRSP emergiu como preocupação em vários hospitais e clínicas veterinárias de todo o mundo. Porcentagens crescentes de bactérias multi resistentes isoladas dos mais diversos casos de infecções são risco a saúde animal e pública. MRSP pode afetar os mais diversos sistemas, no entanto, a piodermite canina é de grande importância devido aos cursos prolongados de antimicrobianos exigidos para alcançar tratamento eficaz. A educação dos médicos veterinários quanto a presença de *Staphylococcus* resistentes é de grande importância para a melhor abordagem terapêutica, diminuindo o risco de seleção de bactérias resistentes e alertando para a transmissão entre o animal e seu proprietário.

## REFERÊNCIAS

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

BANNOEHR, J., et al. Molecular Diagnostic Identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, n.2, p.469-471, 2009.

BANNOEHR, J. et al. Population Genetic Structure of the *Staphylococcus intermedius* Group: Insights into *agr* Diversification and the Emergence of Methicillin-Resistant Strains. **Journal of Bacteriology**, v.189, n.23, p.8685-8692, 2007.

BEMIS, D.A. et al. Comparison of Tests To Detect Oxacillin Resistance in *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus schleiferi*, and *Staphylococcus aureus* Isolates from Canine Hosts. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.9, p.3374-3376, 2006.

BEMIS, D.A. et al. Evaluation of Susceptibility Test Breakpoints Used to Predict *mecA*-mediated Resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* Isolated from Dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic**, v.21, p.53-58, 2009.

BLAIOTTA, G. et al. Diversity of *Staphylococcus* Species Strains Based on Partial *kat* (catalase) Gene Sequences and Design of a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay for Identification and Differentiation of Coagulase-Positive Species (*S. aureus*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S.intermedius*, *S. pseudintermedius*, and *S. schleiferi* subsp. *coagulans*). **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.1, p.192-201, 2010.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), Ed.3, Wayne, 2008.

COELHO, S.M.O. et al. Mapeamento do Perfil de Resistência e Detecção do Gene *mecA* em *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* oxacilina-Resistentes Isolados de Espécies Humanas e Animais. **Ciência Rural**, v.37, n.1, p.195-200, 2007.

DE LUCIA, M. et al. Prevalence of Canine Methicillin Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a Veterinary Diagnostic Laboratory in Italy. **Research in Veterinary Science**, v.91, p.346-348, 2011.

DEVRIESE, L.A. et al. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a Coagulase-Positive Species from Animals. **International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p. 1569-1573, 2005.

DEVRIESE, L.A. et al. *Staphylococcus pseudintermedius* Versus *Staphylococcus intermedius*. **Veterinary Microbiology**, v.133, p.206-207, 2009.

DUIJKEREN, L.A. et al. Transmission of Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* Between Infected Dogs and Cats and Contact Pets, Humans and the Environment in Households and Veterinary Clinics. **Veterinary Microbiology**, v.150, p. 338-343, 2011a.

DUIJKEREN, E.V. et al. Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.66, p.2705-2714, 2011b.

ENRIGHT, M.C. et al. The Evolutionary History of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **PNAS**, v.99, n.11, p.7687-7692, 2002.

EPSTEIN, C.R. et al. Methicillin-resistant Commensal staphylococci in Health Dogs as a Potential Zoonotic Reservoir for Community-acquired Antibiotic Resistance. **Infection, Genetics and Evolution**, v.9, p.283-285, 2009.

EUZÉBY, J.P. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a Folder Available on the Internet. **International Journal of Systematic Bacteriology** ,

v.47, p.590-592, 1997. (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. <http://www.bacterio.net>).

FRANK, L.A. et al. Risk of Colonization or Gene Transfer to Owners of Dogs with Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **Veterinary Dermatology**, v.20, p.496-501, 2009.

GHEBREMEDHIN, B. et al. Genetic Classification and Distinguishing of *Staphylococcus* Species Based on Different *gap*, *16S rRNA*, *hsp60*, *rpoB*, *sodA*, and *tuf* Genes Sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.3, p.1019-1025, 2008.

GRIFFETH, G.C. et al. Screening for Skin Carriage of Methicillin-resistant Coagulase-positive Staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in Dogs with Healthy and Inflamed Skin. **Veterinary Dermatology**, v. 18, p. 181, 2008.

GUARDABASSI, L. et al. Transmission of Multiple Antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* Between Dogs Affected by Deep Pyoderma and their Owners. **Veterinary Microbiology**, v.98, p.23-27, 2004.

HÁJEK, V. *Staphylococcus intermedius*, a New Species Isolated from Animals. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.26, n.4, p. 401-408, 1976.

HANSELMAN, B.A. et al. Methicillin-resistant Staphylococcal Colonization in Dogs Entering a Veterinary Teaching Hospital. **Veterinary Microbiology**, v.126, p.277-281, 2008.

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

KANIA, S.A. et al. Methicillin Resistance of Staphylococci Isolated from the Skin of Dogs with Pyoderma. **American Journal of Veterinary Research**, v.65, p.1265–8, 2004.

KAWAKAMI, T. et al. Antimicrobial Susceptibility and Methicillin Resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp. *Coagulans* Isolated from Dogs with Pyoderma in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.72, p.1615-1619, 2010.

LAARHOVEN, L.M. et al. Longitudinal Study on Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Households. **PLoS ONE**, v.6, p.e27788, 2011.

LOEFFLER, A. et al. First Report of Multiresistant *mecA*-positive *Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 Cases from a Veterinary Dermatology Referral Clinic in Germany. **Veterinary Dermatology**, v.18, p.412-421, 2007.

MAY, E.R. Bacterial Skin Diseases: **Current Thoughts on Pathogenesis and Management**. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v.36, p.185-202, 2006.

MORRIS, D.O. et al. The Prevalence of Carriage of Methicillin-resistant Staphylococci by Veterinary Dermatology Practice Staff and their Respective Pets. **Veterinary Dermatology**, v.21, p.400-407, 2010.

NIENHOFF, U. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* Among Dogs Admitted to a Small Animal Hospital. **Veterinary Microbiology**, v.150, p.191-197, 2011.

PERRETEN, V. et al. Clonal Spread of Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an International Multicenter Study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.65, p.1145-1154, 2010.

QUINN, P. J. et al. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe, 1994. 648 p

RUSCHER, C. et al. Prevalence of Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* Isolated from Clinical Samples of Companion Animals and Equidae, **Veterinary Microbiology**, v.136, p.197-201, 2009.

SASAKI, T. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a Veterinary Teaching Hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.4, p.1118-1125, 2007a.

SASAKI, T., et al. Reclassification of Phenotypically Identified *Staphylococcus intermedius* Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p., n. 9, p. 2770-2778, 2007b.

SCHISLER, J.R. et al. Evaluation of Clinical Laboratory Standards Institute Interpretative Criteria for Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* Isolated from Dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.21, p. 684-688, 2009.

SCOTT, D.W. et al. Small Animal Dermatology. 6.ed. Philadelphia: Saunders,2001.

WEESE, J.S.; DUIJKEREN, E.V. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in Veterinary Medicine. **Veterinary Microbiology**, v.140, p.418-429, 2010.

## **Capítulo II**

***Staphylococcus pseudintermedius* como  
principal agente etiológico da piodermite canina**

## ***Staphylococcus pseudintermedius* como principal agente etiológico da piodermite canina**

E. Bourguignon, M. A. S. Moreira, L.A. Nero, G. N. Viçosa,

C. M. M. Corsini, L. G. Conceição\*

\* Autor para correspondência. Endereço: Departamento de veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Avenida Peter Henry Rolfs, s/n Campus Universitário 36570-000, Viçosa – MG, Brasil. Telefone/fax: (31) 38991457. E-mail: [lissandro@ufv.br](mailto:lissandro@ufv.br)

### **Resumo**

Objetivou-se através deste estudo a identificação das bactérias causadoras de piodermite canina, visando a detecção de *Staphylococcus pseudintermedius*. Foram coletadas amostras das lesões de 25 cães com sinais clínicos de piodermite. Os 75 isolados obtidos foram submetidos a testes fenotípicos de identificação preliminar e ao kit para identificação de *Staphylococcus* API Staph. Os resultados dos testes fenotípicos foram confirmados através de PCR-RFLP. A avaliação dermatológica indicou predomínio de piodermite superficial dentre os animais avaliados e o diagnóstico conclusivo da causa de base foi possível em 13 destes. A idade dos cães variou de 3 meses a 13 anos, sendo a maior parte, composta por fêmeas (64%). Um isolado apresentou perfil bioquímico compatível com *Staphylococcus* sp. coagulase negativo e outro com *Micrococcus* sp. e foram identificados pelo API Staph como *S. auricularis* e *S. sciuri*, respectivamente. Dos 75 isolados, 72 foram identificados como *S. pseudintermedius* e os outros três como *Staphylococcus* sp. pela técnica de PCR. O presente estudo confirmou a ocorrência de *S. pseudintermedius* como principal agente etiológico de piodermite superficiais e profundas em cães

atendidos no Hospital Veterinário da UFV, localizado na região de Viçosa, MG, Brasil.

**Palavras chave:** Piodermite, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus intermedius*, cães.

### **Abstract**

The objective of this study was to identify the bacteria that cause canine pyoderma, aiming to detect *Staphylococcus pseudintermedius*. Samples of the lesions were collected from 25 dogs with clinical signs of pyoderma. The 75 isolates were subjected to phenotypic tests of preliminary identification and to API Staph a *Staphylococcus* identification kit. The phenotypic tests results were confirmed by PCR-RFLP. A dermatologic evaluation indicated a predominance of superficial pyoderma among the animals evaluated and conclusive diagnosis of the underlying cause was possible in 12 of these animals. The dogs age ranged from 3 months to 13 years, and they were mostly composed of females (64%). One isolate presented a biochemical profile compatible with *Staphylococcus* sp. coagulase-negative and the other with *Micrococcus* sp. and were identified by API Staph as *S. auricularis* and *S. sciuri*, respectively. Of the 75 isolates, 72 were identified by PCR as *S. pseudintermedius* and the other three as *Staphylococcus* sp.. The present study confirmed the occurrence of *S. pseudintermedius* as the main etiologic agent in superficial and deep pyoderma in dogs presented to the UFV Veterinary Hospital located in the region of Viçosa, MG, Brazil.

**Key words:** Pyoderma, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus intermedius*, dogs.

## Introdução

O termo piodermite é usado para as infecções bacterianas da pele, e é uma das causas mais frequentes de afecções dermatológicas nos cães. As lesões podem ser superficiais e envolverem apenas a epiderme ou os infundíbulos foliculares, ou comprometer estruturas mais profundas da derme ou tecido subcutâneo. Considerando a sua localização, as piodermites podem ser classificadas como de superfície, superficial ou profunda. As lesões usualmente observadas são pápulas, pústulas, colaretes epidérmicos, nódulos, crostas e alopecia (Ihrke, 1996).

Qualquer infecção de pele deve ser considerada sinal de alguma doença de base cutânea, metabólica ou imunológica. Etiologicamente as infecções de pele são classificadas como primárias ou secundárias, referindo-se a ausência ou presença de causa de base identificável. As infecções secundárias são as mais comuns. Quase todas as doenças de pele podem predispor a infecções, mas as doenças alérgicas, seborréicas e foliculares são as desordens que mais comumente causam infecções (Scott et al., 2001).

*Staphylococcus intermedius* foi descrito em 1976 como nova espécie proveniente de isolados de cães, pombos, cavalos e martas (Hajek, 1976). Antes dessa descrição, todos os isolados caracterizados como cocos Gram-positivos, produtores de coagulase em tubo, DNase ou produção de  $\beta$  hemólise eram identificados como *S. aureus* (Devriese et al., 2009). Em 2005, a espécie *S. pseudintermedius* foi descrita (Devriese et al., 2005). Isolados fenotipicamente caracterizados como *S. intermedius* foram reclassificados através de técnicas moleculares como três espécies distintas, incluindo *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* e *S. delphini*, que juntos representam o grupo *S. intermedius* - SIG (Sasaki et al., 2007). Baseado nessa classificação, *S. pseudintermedius* foi definido como o agente mais frequentemente isolado de pele canina. Considerando essa nova evidência, foi proposto que todas as cepas provenientes de pele de cão pertencentes ao SIG fossem consideradas

*S. pseudintermedius* até que o contrário seja comprovado por meio de investigação genômica (Devriese et al., 2009).

*S. intermedius* pode ser diferenciado entre as espécies de SIG pelas suas características fenotípicas. No entanto, não existem testes que possam diferenciar fenotipicamente com exatidão as espécies *S. pseudintermedius* de *S. delphini*, o que demanda a utilização de métodos moleculares (Sasaki et al., 2007). Vários estudos utilizando diferentes técnicas de biologia molecular procuraram diferenciar as espécies do SIG (Sasaki et al., 2007; Bannoehr et al., 2007; Ghebremedhin et al., 2008; Blaiotta et al., 2010), sendo que recentemente foi descrita técnica simples utilizando Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição (PCR-RFLP), que permite diferenciar o *S. pseudintermedius* de outras espécies de *Staphylococcus*. Segundo essa técnica, a enzima de restrição *Mbol* permite a diferenciação entre *S. pseudintermedius* e *S. delphini*: um fragmento de 320 bp pertencente ao gene *pta*, que codifica a enzima fosfacetiltransferase, é amplificado e o produto do PCR de *S. pseudintermedius* apresentaram único sítio de restrição. Como resultado, isolados pertencentes a espécie *S. pseudintermedius* apresentam dois fragmentos, com 213 e 107 bp, como característica típica no gel de agarose após eletroforese convencional. Outras espécies do SIG não contém esse sítio de restrição o que permite a diferenciação entre as espécies. *S. aureus* também contém único sítio de restrição da *Mbol*, que resulta em dois fragmentos, com 156 e 164 pb, que aparecem praticamente como única banda quando submetido a eletroforese convencional (Bannoehr et al., 2009).

O objetivo desse estudo foi identificar a participação de *S. pseudintermedius* como causador de piodermite em cães atendidos no Hospital Veterinário do Departamento de Veterinária da Universidade Federal de Viçosa (UFV).

## **Material e métodos**

### **Seleção de animais e coleta de amostras clínicas**

Vinte e cinco cães provenientes do atendimento clínico do Serviço de Dermatologia do Hospital Veterinário da UFV foram selecionados para o presente estudo. Todos os animais foram avaliados clinicamente e o critério para inclusão no estudo foi a apresentação de sinais clínicos de piodermite superficial como eritema, pápulas, pústulas, alopecia, escoriações, descamação, crostas, hiperpigmentação e hiperqueratose, ou sinais de piodermite profunda, como pústulas, fístulas, nódulos, úlceras, crostas, celulite e paniculite (Scott et al., 2001). A piodermite foi confirmada por diagnóstico clínico e/ou citológico. Os proprietários dos animais foram consultados sobre a possibilidade de inclusão no estudo, e apenas os que permitiram foram considerados para as análises descritas a seguir. O período de seleção de animais e coleta de amostras ocorreu entre agosto e dezembro de 2010. Este estudo foi realizado mediante autorização da Comissão de ética para uso de animais da UFV.

De todos os animais selecionados, amostras clínicas de lesões significativas foram coletadas utilizando-se swab estéril (Labor Swab ). Quando pústulas intactas estavam presentes, os pêlos periféricos foram aparados e a região foi limpa com álcool 70% (v/v), para evitar contaminação da amostra. A pústula foi rompida com o auxílio de agulha fina, para coleta do material purulento (Ihrke, 1996). Em colaretas epidérmicas, o swab foi esfregado vigorosamente na superfície interna das escamas e crostas (White et al., 2005). Em casos de piodermite profunda, se furúnculos cheios de secreções e intactos estavam presentes o material foi colhido de forma semelhante aquele descrito para pústulas superficiais. Na presença de tratos drenantes, a secreção purulenta foi coletada da maior profundidade possível, para evitar a contaminação da amostra com bactérias da superfície (Ihrke, 1996).

## **Processamento de amostras clínicas e identificação fenotípica**

As amostras obtidas foram processadas imediatamente nos laboratórios de Microbiologia e de Doenças Bacterianas do Setor de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública do Departamento de Veterinária da UFV. Os swabs foram imersos em 1 mL de NaCl 0.85% (m/v) e agitados vigorosamente. Em seguida, alíquotas de 200 µL da solução obtida foram estriadas com alça de Drigalski, simultaneamente em agar sangue de carneiro a 5% (v/v) e Agar MacConkey (Oxoid) e incubadas a 37 °C por 24 horas. Em seguida, pelo menos três colônias isoladas das amostras obtidas de cada animal foram reativadas e depois armazenadas em caldo de infusão de cérebro e coração (BHI, Oxoid) adicionado de 20% de glicerol (v/v) e mantido a -80 °C, formando bacterioteca com 75 isolados. Ao final do período de colheita, todos os isolados foram estriados em Agar sangue de carneiro a 5%, com incubação a 37 °C por 24 h, e classificados quanto à formação de hemólise e morfológicamente pela coloração de Gram. As colônias isoladas foram submetidas aos testes de catalase, oxidase, coagulase, crescimento em Agar Baird-Parker suplementado com acriflavina, manitol e maltose, o que permitiu identificação preliminar dos isolados em gênero e espécie (Quinn et al., 1994). A cepa padrão de *S. aureus* ATCC 29213 foi utilizada como controle dos testes fenotípicos.

Pelo menos um isolado obtido por animal, ou isolados de um mesmo animal que apresentaram características fenotípicas diferentes, foram submetidos a identificação de espécie utilizando-se o kit de identificação API Staph (BioMérieux SA, Marcy l'Etoile, France).

## **Análises genotípicas para identificação de espécies**

Os 75 isolados obtidos foram submetidos à reação de Polimorfismo do Tamanho do Fragmento de Restrição (PCR-RFLP), conforme descrito por Bannoehr et al. (2009). Essa reação tem como alvo uma sequência do gene *pta*, cujo produto amplificado é clivado pela enzima de restrição *Mbol*, visando a identificação de *S. pseudintermedius*. Uma alíquota da amostra armazenada foi

suspensa em 3 mL de caldo de BHI (Oxoid), com incubação a 37°C overnight. A cultura obtida foi submetida à extração do DNA genômico utilizando-se Wizard genomic DNA purification kit (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA), conforme as instruções para bactérias Gram-positivas. Os oligonucleotídeos utilizados foram F1 (AAA GAC AAA CTT TCA GGT AA) e R1(GCA TAA ACA AGC ATT GTA CCG), sendo as amplificações realizadas em volume total de 50 µL, contendo 2 µL de DNA, 25µL do GoTaq green Master Mix (Promega, Wisconsin, USA), 21 µL de água livre de nucleases e 1 µL de cada oligonucleotídeo (0.4 µM). O programa do termociclador para o gene *pta* consistiu em incubação a 95°C por dois minutos, seguido por 30 ciclos de 95°C por um minuto, 53°C por um minuto, 72°C por um minuto e uma incubação final a 72°C por sete minutos. Após a amplificação, 5 µL do produto de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% usando marcador de peso molecular de 100 bp (Promega, Wisconsin, USA) e analisada em transiluminador UV. Vinte e cinco microlitros do produto de PCR foram incubados a 37°C com 5 U da enzima *Mbol* e 5 µL do tampão de digestão 5X por duas horas. Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%. *S. pseudintermedius* MRSP 3279 e *S. aureus* USA 100 foram utilizados como controles positivos em todas as reações de PCR, e água Milli-Q estéril como controle negativo.

## Resultados

No Quadro 1 são apresentadas as informações obtidas na análise clínica dos 25 animais selecionados para o estudo. A avaliação dermatológica indicou predomínio de piodermite superficial dentre os animais avaliados e o diagnóstico conclusivo da causa de base foi possível em 13 destes. A idade dos animais variou entre 3 meses e 13 anos, sendo a maior parte, composta por fêmeas (64%).

Considerando os resultados fenotípicos, 73 dos 75 isolados foram identificados como *S. pseudintermedius*, resultado confirmado pelo kit API Staph. Dois isolados apresentaram perfil bioquímico convencional compatível

com *Staphylococcus* sp. coagulase negativo e *Micrococcus* sp. e foram identificados pelo API Staph como *S. auricularis* e *S. sciuri*, respectivamente. Foram identificados sete perfis fenotípicos diferentes dentre os 75 isolados, sendo que a bactéria *S. pseudintermedius* apresentou cinco perfis diferentes quanto ao teste do manitol e maltose. Os diferentes perfis de resultados fenotípicos apresentados pelos isolados estão representados na Tabela 1.

Quadro 1. Características clínicas observadas no exame dermatológico dos 25 cães selecionados para o estudo, atendidos no Hospital Veterinária da UFV, entre agosto e dezembro de 2010.

n.	Raça	Lesões*	Lesões coletadas	Localização anatômica das lesões (região)	Tipo	Doença de base
1	Lhasa Apso	1/6	Eritema	axilar, virilha, focinho, interdigital	Superficial	Atopia. **
2	SRD	1/2	Pápulas	dorsal, axilar, virilha, face interna da coxa,	Superficial	DAPP, seborréia seca.
3	SRD	2/3/7	Colarete	ventral, virilha	Superficial	Atopia, DAPP, alergia alimentar.
4	SRD	2/9/10	Pápulas	borda de pavilhão auricular, virilha	Superficial	Escabiose.**
5	Cocker Spaniel	1/8	Crosta	ventral, periocular	Profunda	Dermatose do alimento genérico.**
6	Cocker Spaniel	1/6/8/9/10/11	Crosta	Generalizada	Profunda	Demodicose. **
7	Yorkshire Terrier	3/6	Pústula	dorsal, ventral	Superficial	DAPP. **
8	Cocker Spaniel	1/2/4/10	Eritema	ventral, base da cauda	Superficial	DAPP. **
9	Pastor alemão	2/3/7/9/12	Pústula	ventral, dorsal, membros posteriores	Superficial	Demodicose, DAPP, hipotireoidismo.
10	SRD	1/3/9	Pústula	ventral, periocular	Superficial	Demodicose, dermatofitose.
11	Yorkshire Terrier	2/3/8	Pústula	ventral, dorsal, mentoniana	Superficial	DAPP. **
12	SRD	7	Colarete	Dorsal	Superficial	DAPP, Escabiose.
13	SRD	2/3/6/8/9	Pústula	borda de pavilhão auricular, axilar, ventral, jarretes	Superficial	Escabiose. **
14	Bulldog Campeiro	1/2/8	Crosta	cervical, focinho	Superficial	Intertrigo. **
15	SRD	3/6/7/9	Pústula	axilar, ventral, membro posterior direito	Superficial	Escabiose, hipersensibilidade à parasitas intestinais.
16	Fox Hound	11	Secreção	flanco, base da cauda	Profunda	Pseudomicetoma fúngico, pitiose, furunculose.
17	Lhasa Apso	1/3/8	Pústula	Dorsal	Superficial	DAPP, atopia, alergia alimentar.
18	Shar-pei	6/8/9	Crosta	generalizada	Profunda	Demodicose. **
19	SRD	4/5/8/9/10	Crosta	dorso ventral, base da cauda, ventral	Superficial	DAPP. **
20	Cocker Spaniel	2/6/8/9	Crosta	dorso ventral, ventral	Superficial	DAPP, escabiose dermatofitose.
21	Shih-Tzu	1/6/8	Crosta	periocular, interdigital	Profunda	Demodicose. **
22	Golden Retriever	1/8	Crosta	dorso ventral, face interna dos membros posteriores	Superficial	DAPP, demodicose dermatite úmida.
23	Poodle	8/9/11	Crosta	interdigital, ventral, dorso ventral	Profunda	Demodicose. **
24	Rottweiler	6/7/9	Colarete	Dorsal	Superficial	Hipotireoidismo, DAPP, atopia, alergia alimentar
25	Lhasa Apso	2/3/8	Pústula	dorsal, ventral	Superficial	DAPP, atopia, alergia alimentar.

\* 1. Eritema, 2. Pápulas, 3. Pústulas, 4. Hiperpigmentação, 5. Liqueficação, 6. Descamação, 7.

Colaretes, 8. Crostas melicéricas, 9. Alopecia, 10. Hipotricose, 11. Tratos fistulosos, 12. Lesão em placa.

\*\*Diagnóstico definitivo. SRD: sem raça definida. DAPP: dermatite alérgica à picada de pulga.

Tabela 1. Resultados das análises fenotípicas de 75 isolados bacterianos obtidos de lesões de piodermite em cães atendidos no Hospital Veterinária da UFV, entre agosto e dezembro de 2010.

Perfil	n	Características fenotípicas							Identificação preliminar		Identificação API
		Hemólise	Catalase	Oxidase	Gram	Coagulase	BP	Maltose	Mantol	Staph	
I	39	α,β	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
II	30	α,β	+	-	+	+	-	+	+	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
III	1	α,β	+	-	+	-	-	-	+	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
IV	1	α,β	+	-	+	-	+	+	+	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
V	1	α,β	+	-	+	+	+	-	-	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
VI	1	α	+	-	+	-	-	-	-	<i>S. pseudintermedius</i>	<i>S. pseudintermedius</i>
VII	1	α	+	-	+	-	-	-	-	<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>S. auricularis</i>
VIII	1	Ausente	+	+	+	-	-	-	+	<i>Micrococcus</i> sp.	<i>S. sciuri</i>

+: positivo, -: negativo, +/-: resultado fracamente positivo.

BP: Agar Baird Parker

Dos 75 isolados analisadas pelo PCR-RFLP, todos amplificaram um produto de PCR do gene *pta* de 320 bp (Figura 1). Setenta e duas apresentaram dois fragmentos de 213bp e 107bp quando submetidas a restrição pela enzima *Mbol*, sendo identificadas como *S. pseudintermedius* e três isolados de um mesmo animal não apresentaram o sítio de restrição, sendo identificados como *Staphylococcus* sp. (Figura 2). As cepas controle estão representadas na Figura 3.

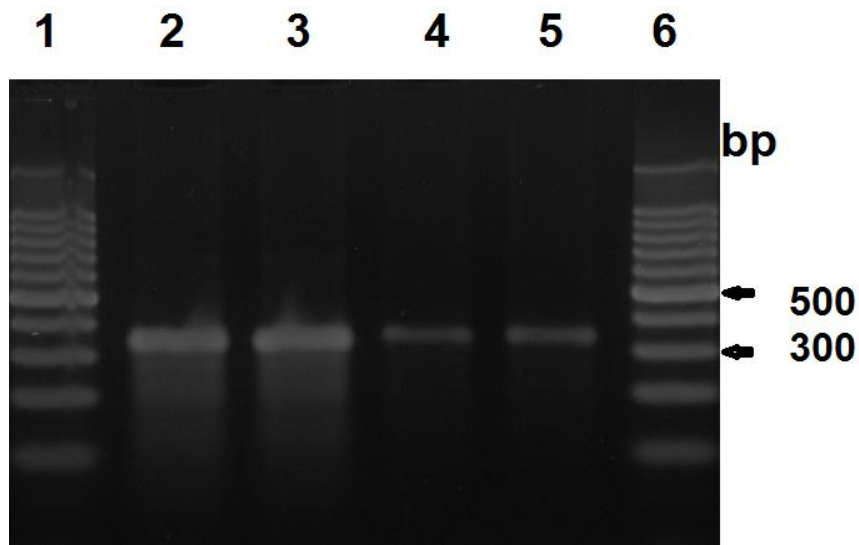


Figura 1: Eletroforese em gel de agarose da amplificação dos produtos de PCR do gene *pta*. Linha 1 e 6, marcador de peso molecular; linha 2, cepa controle (*S. pseudintermedius* 3279); linha 3, isolado n. 4 (*S. pseudintermedius*); linha 4, isolado n.7 (*Staphylococcus* sp.); linha 5, isolado n. 47 (*Staphylococcus sciuri*).

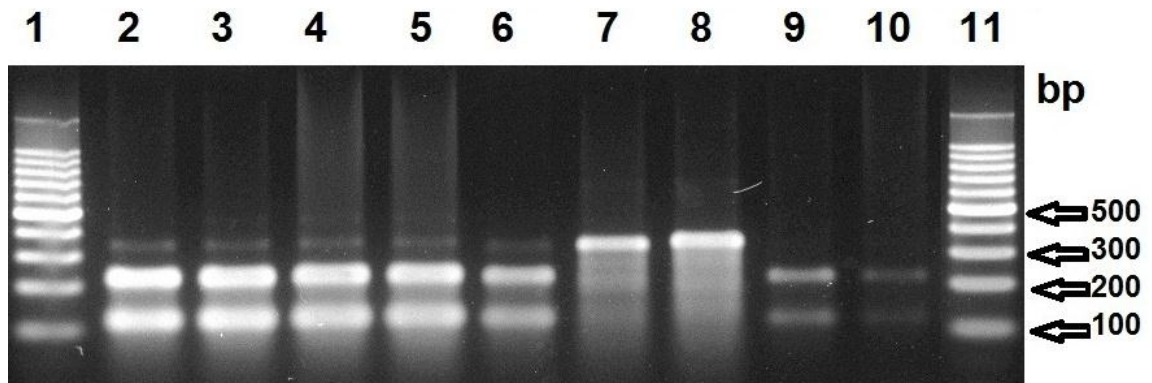


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose da digestão pela *Mbol* do produto de PCR do gene pta. Linha 1 e 11, marcador de peso molecular; linha 2, cepa controle (*S. pseudintermedius* 3279); linha 3, isolado n. 49 (*S. pseudintermedius*); linha 4, isolado n. 52 (*S. pseudintermedius*); linha 5, isolado n. 55 (*S. pseudintermedius*); linha 6, isolado n. 4 (*S. pseudintermedius*); linha 7, isolado n. 16 (*Staphylococcus* sp.); linha 8, isolado n. 17 (*Staphylococcus* sp.); linha 9, isolado n. 47 (*Staphylococcus sciuri*); linha 10, isolado n. 7 (*Staphylococcus auricularis*).

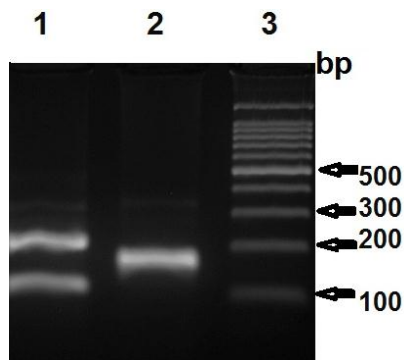


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose da digestão pela *Mbol* do produto de PCR do gene pta. Linha 1, cepa controle (*S. pseudintermedius* 3279); linha 2, cepa controle (*S. aureus* USA 100); linha 3, marcador de peso molecular.

## Discussão

Embora a piodermite afete cães de todas as raças (Ihrke, 1996), a maior frequência de cães sem raça definida (8/25, Quadro 1) pode ser explicada pela maior ocorrência desses animais no atendimento geral do Hospital Veterinário onde o estudo foi realizado. Dezenove animais apresentaram piodermite superficial e apenas seis, piodermite profunda o que está de acordo com a literatura, sendo as piodermites superficiais a segunda causa mais comum de

afecções dermatológicas em cães (Ihrke, 1996). Dentre os 13 animais que tiveram o diagnóstico fechado a causa base mais frequente da piodermite superficial foi a DAPP e a da piodermite profunda foi a demodicose.

A comparação entre estudos que avaliaram a ocorrência de *S. pseudintermedius* é controversa devido ao fato destes utilizarem amostras coletadas de diferentes locais e realizarem as identificações destas amostras utilizando diferentes testes fenotípicos e Kits comerciais. Estudos que avaliaram amostras provenientes de cães com dermatites encontraram ocorrência de 63 a 76% de *S. pseudintermedius* (Kania et al., 2004; Hauschild et al., 2007; Vanni et al., 2009; Onuma, Tanabe e Sato, 2011). De acordo com a identificação fenotípica do presente estudo, 97.3% dos isolados foram considerados *S. pseudintermedius*, 1.3% *Staphylococcus* sp. e 1.3% *Micrococcus* sp. (Tabela 1).

No Brasil existem raros estudos de identificação dos agentes causadores de piodermite canina e todos os estudos encontrados utilizaram somente a identificação fenotípica. Conceição (1995) obteve frequência de 73% de isolados obtidos de piodermite canina identificados como *S. intermedius* (provavelmente *S. pseudintermedius*). Outro estudo brasileiro de piodermite superficiais em cães, identificou através do Kit API Staph, 65% dos seus isolados como sendo *S. intermedius* (provavelmente *S. pseudintermedius*) (Larsson, 2008). No entanto, esse estudo não descreve o método utilizado para colheita de amostras o que pode influenciar na obtenção de culturas com bactérias que não estejam realmente envolvidas no processo patológico.

A comparação entre os resultados dos testes fenotípicos do isolado identificado como *S. auricularis* (Tabela 1) e a sua confirmação genotípica apresentaram divergência. A confiabilidade da identificação pelo API Staph foi relativamente baixa (35.7%), e a espécie identificada não é usualmente associada à piodermite ou pele de cães (Scott et al., 2001). Divergência similar ocorreu com o isolado identificado como *S. sciuri* (Tabela 1), que pelo API apresentou confiabilidade de 82%. Ambos isolados foram identificados como *S. pseudintermedius* pelos testes moleculares. Estes resultados sugerem que o

protocolo de PCR-RFLP empregado no presente estudo (Bannoehr et al., 2009) pode não ser específico para a espécie *S. pseudintermedius*, demandando novos estudos para a confirmação desses dados.

Até o momento, esse é o primeiro estudo brasileiro de identificação de isolados de piodermite canina por técnicas de biologia molecular. Dos isolados identificados pelo PCR-RFLP, 96% foram classificados como *S. pseudintermedius*. Três isolados de um mesmo animal identificados pelos testes fenotípicos e pelo API como *S. pseudintermedius* (Tabela 1) foram identificados como *Staphylococcus* sp. pelo PCR-RFLP. Como foi excluída pela técnica molecular a possibilidade desses isolados serem *S. pseudintermedius* ou *S. aureus*, provavelmente tratam-se de *S. intermedius* ou mesmo *S. delphini*, que são fenotipicamente semelhantes ao *S. pseudintermedius* (Sasaki, et al. 2007).

O presente estudo confirmou a ocorrência de *S. pseudintermedius* como principal agente etiológico de piodermite superficial e profunda em cães atendidos no Hospital Veterinário da UFV, localizado na região de Viçosa, MG, Brasil, resultado confirmado por PCR-RFLP.

## REFERÊNCIAS

BANNOEHR, J. et al. Population Genetic Structure of the *Staphylococcus intermedius* Group: Insights into *agr* Diversification and the Emergence of Methicillin-Resistant Strains. **Journal of Bacteriology**, v.189, n.23, p.8685-8692, 2007.

BANNOEHR, J., et al. Molecular Diagnostic Identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, n.2, p.469-471, 2009.

BLAIOTTA, G. et al. Diversity of *Staphylococcus* Species Strains Based on Partial *kat* (catalase) Gene Sequences and Design of a PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Assay for Identification and Differentiation of Coagulase-Positive Species (*S. aureus*, *S. delphini*, *S. hyicus*, *S. intermedius*, *S. pseudintermedius*, and *S. schleiferi* subsp. *coagulans*). **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.1, p.192-201, 2010.

CONCEIÇÃO, L.G. **Piodermites em cães: Isolamento e identificação da flora bacteriana e sensibilidade estafilocócica antimicrobiana; Análise dos padrões histopatológicos**, 1995, 92p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo.

DEVRIESE, L.A. et al. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. **International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p. 1569-1573, 2005.

DEVRIESE, L.A. et al. *Staphylococcus pseudintermedius* versus *Staphylococcus intermedius*. **Veterinary Microbiology**, v.133, p.206-207, 2009.

GHEBREMEDHIN, B. et al. Genetic Classification and Distinguishing of *Staphylococcus* Species Based on Different *gap*, 16S rRNA, *hsp60*, *rpoB*, *sodA*, and *tuf* Genes Sequences. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.3, p.1019-1025, 2008.

HÁJEK, V. *Staphylococcus intermedius*, a New species isolated from Animals. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.26, n.4, p. 401-408, 1976.

HAUSCHILD, T.; WÓJCIK, A. Species distribution and properties of staphylococci from canine dermatitis. **Research in Veterinary Science**, v.82, p.1-6, 2007.

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

KANIA, S.A. et al. Methicillin resistance of staphylococci isolated from the skin of dogs with pyoderma. **American Journal of Veterinary Research**, v.65, p.1265–8, 2004.

LARSSON, C.E.Jr. **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.

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

QUINN, P. J. et al. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe, 1994. 648 p

SASAKI, T., et al. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n. 9, p. 2770-2778, 2007.

SCOTT, D.W. et al. **Small animal dermatology**. 6.ed. Philadelphia: Saunders,2001.

VANNI, M. et al. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi* isolated from dogs. **Research in Veterinary Science**, v.87, p. 192-195, 2009.

WHITE, S.D., et al. Evaluation of aerobic bacteriologic culture of epidermal collarette specimens in dogs with superficial pyoderma. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.226, n.6, p.904-908, 2005.

## ANEXO

Anexo 1. Resultado das análises fenotípicas dos 75 isolados pelos testes convencionais e pelo Kit API Staph.

Animal	Isolado	Hemólise	Catalase	Oxidase	Gram	Coagulase	Baird Parker	Maltose	Manitol	Perfil	API
1	1	Dupla	+	-	+	+	-	-	+-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	2	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	3	Dupla	+	-	+	+	-	-	+-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
2	4	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	5	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	6	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
3	7	Completa	+	-	+	-	-	-	-	<i>Staph. sp.</i>	<i>S. auricularis</i>
	8	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	9	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
4	10	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	11	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	12	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
5	13	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	14	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	15	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
6	16	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	17	Dupla	+	-	+	+	-	-	+	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	18	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
7	19	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	20	Dupla	+	-	+	+	-	-	+-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	21	Dupla	+	-	+	+	-	-	+-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
8	22	Dupla	+	-	+	+	-	-	+-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	23	Dupla	+	-	+	+	-	-	+-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	24	Dupla	+	-	+	+	-	-	+-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
9	25	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	26	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	27	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
10	28	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	29	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	30	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
11	31	Dupla	+	-	+	+	-	-	+-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	32	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	33	Dupla	+	-	+	+	-	-	+-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>

12	34	Dupla	+	-	+	+	-	-	+-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	35	Dupla	+	-	+	+	-	-	+-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	36	Dupla	+	-	+	+	-	-	+-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
13	37	Dupla	+	-	+	+	-	-	+-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	38	Dupla	+	-	+	+	-	-	+-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
14	39	Dupla	+	-	+	+	-	-	+-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	40	Dupla	+	-	+	+	-	-	+-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	41	Dupla	+	-	+	+	-	-	+-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
15	42	Dupla	+	-	+	+	-	-	+-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	43	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	44	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
16	45	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	46	Dupla	+	-	+	+	-	+	+-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	47	Ausente	+	+	+	-	-	-	+-	<i>Micrococcus</i> sp.	<i>S. sciuri</i>
17	48	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	49	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	50	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
18	51	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	52	Dupla	+	-	+	+	-	-	+-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	53	Dupla	+	-	+	+	-	-	+-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
19	54	Dupla	+	-	+	+	-	-	+-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	55	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	56	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
20	57	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	58	Dupla	+	-	+	+	-	-	+-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	59	Dupla	+	-	+	+	-	-	+-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
21	60	Dupla	+	-	+	+	-	-	+-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	61	Dupla	+	-	+	+	-	-	+-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	62	Dupla	+	-	+	+	-	-	+-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
22	63	Dupla	+	-	+	+	-	-	+-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	64	Dupla	+	-	+	+	-	-	+-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	65	Dupla	+	-	+	+	-	-	+-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
23	66	Dupla	+	-	+	+	-	-	+-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	67	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	68	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
24	69	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	70	Dupla	+	-	+	+	-	+	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	71	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
25	72	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	73	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	74	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
	75	Dupla	+	-	+	+	-	-	-	<i>S. intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>

Positivo: +. Negativo: -. Fracamente positivo: +

## Capítulo III

**Susceptibilidade Antimicrobiana e Resistência a  
Meticilina em isolados de *Staphylococcus  
pseudintermedius* obtidos de piodermite canina**

## Susceptibilidade Antimicrobiana e Resistência a Meticilina em isolados de *Staphylococcus pseudintermedius* obtidos de piodermite canina

E. Bourguignon, M. A. S. Moreira, L.A. Nero, G. N. Viçosa,

C. M. M. Corsini, L. G. Conceição\*

\* Autor para correspondência. Endereço: Departamento de veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Avenida Peter Henry Rolfs, s/n Campus Universitário 36570-000, Viçosa – MG, Brasil. Telefone/fax: (31) 38991457. E-mail: [lissandro@ufv.br](mailto:lissandro@ufv.br)

### Resumo

Objetivou-se através deste trabalho, a identificação do perfil de resistência de isolados de *S. pseudintermedius*, provenientes de piodermite canina, à antimicrobianos comumente utilizados na clínica de pequenos animais e da presença de *Staphylococcus* meticilina resistentes através da detecção do gene *mecA*. Setenta e dois isolados previamente identificados como *S. pseudintermedius*, provenientes de 24 cães foram analisados. Os isolados apresentaram variados perfis de resistência, sendo que 23,6% foram susceptíveis a todos os antimicrobianos testados e 8,3% resistentes a 10 antimicrobianos. Dos 72 isolados apenas quatro não apresentaram o gene de resistência *mecA*. Quando consideramos os isolados separadamente, 94,4% apresentaram o gene de resistência e, se considerarmos os animais individualmente, todos apresentaram pelo menos uma cepa de MRSP. A alta ocorrência de *Staphylococcus* meticilina resistentes isolados de cães neste estudo alertam para a importância de se realizar antibiograma ou mesmo PCR

para determinar o melhor tratamento e prevenir o aparecimento de cepas multi resistentes.

**Palavras chave:** *Staphylococcus pseudintermedius*, cães, oxacilina, *mecA*, antimicrobianos.

### **Abstract**

The aims of this study were to identify the resistance profile of isolates of *S. pseudintermedius*, from canine pyoderma to antimicrobials commonly used in small animal medicine and to identify the presence of methicillin-resistant *Staphylococcus* through the detection of *mecA* gene. Seventy two isolates previously identified as *S. pseudintermedius*, from 24 dogs were analyzed. Isolates had different resistance profiles, 23.6% were susceptible to all antimicrobials tested and 8.3% resistant to 10 antimicrobials. In only four of 72 isolates the resistance gene *mecA* was not present. When separate isolates are considered, 94.4% had the resistance gene and, if we consider the individual animals, all animals had at least one MRSP strain. The high occurrence of MRSP isolated from dogs in this study alerts to the importance of conducting an antimicrobial susceptibility test or PCR to determine the best treatment and prevent the emergence of multi-resistant strains.

**Key words:** *Staphylococcus pseudintermedius*, dogs, oxacillin, *mecA*, antimicrobials.

## Introdução

A piodermite é uma infecção bacteriana da pele e uma das principais causas de afecções dermatológicas nos cães (Ihrke, 1996). Um importante agente etiológico dessa afecção é *Staphylococcus pseudintermedius* (Devriese et al., 2009), espécie bacteriana descrita por Devriese et al. (2005). Até o ano de 2005 a bactéria *S. intermedius* era considerado o agente mais frequentemente isolado de pele canina (Devriese et al., 2009). Isolados fenotipicamente identificados como *S. intermedius* foram reclassificados através de técnicas moleculares como três espécies distintas; *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* e *S. delphini* que juntos representam o grupo do *S. intermedius* – SIG (Sasaki et al., 2007b). Posteriormente, foi proposto que todos os isolados do SIG obtidos de pele de cão fossem identificados como *S. pseudintermedius*, exceto nos casos em que análises moleculares detalhadas determinassem outras espécies (Devriese et al., 2009). A piodermite é uma das razões mais comuns do uso de antimicrobianos nos cães (Guardabassi et al., 2004) e o gênero *Staphylococcus* possui como característica a facilidade de desenvolvimento de resistência a antimicrobianos (Weese e Duijkeren, 2010).

A resistência a antimicrobianos é causada pela evolução das bactérias, ou seja, pela mutação espontânea e recombinação de genes, que criam variabilidade genética sobre a qual atua a seleção natural aos mais aptos. As drogas atuam como agentes seletivos, favorecendo as bactérias resistentes, presentes na população. O desenvolvimento de resistência pode se dar por resistência cromossomal como resultado de mutação espontânea, ou por mecanismos de transferência de material genético e plasmídeos, de uma bactéria para outra. O esforço para descobrir e sintetizar novas drogas pode levar anos, portanto, é necessário uso racional dos antimicrobianos para evitar resistências (Andrade, 2002).

A identificação de cepas resistentes é realizada por ensaios laboratoriais onde as mesmas são avaliadas frente a diversos antimicrobianos. A resistência às penicilinas, penicilinase-estáveis, (metilina, nafcilina e oxacilina) são

referidas como “resistência a meticilina” (CLSI, 2008), no entanto, essa resistência é confirmada pelo uso da oxacilina, devido ao fato desta apresentar maior estabilidade em estoque e maior capacidade de detectar resistência cruzada do que a meticilina (Quinn et al., 1994). A resistência a meticilina possui relevância pois é conferida pela presença do gene *mecA*, responsável por alterações nas proteínas ligadoras de penicilina (PBP), determinando baixa susceptibilidade a antimicrobianos beta-lactâmicos. Portanto, *Staphylococcus* meticilina resistentes (MRS) não são sensíveis a vários antimicrobianos (Enright et al., 2002; Weese e Duijkeren, 2010), como a ampicilina, amoxicilina, ácido clavulânico, cefalexina, ceftiofur e cefaclor (Andrade, 2002), que são usualmente utilizados no tratamento da piodermite canina. As cepas resistentes a meticilina muitas vezes apresentam múltipla resistência que incluem antimicrobianos beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos, clindamicina e tetraciclina (Quinn et al., 1994). O teste mais confiável para a detecção da resistência a meticilina é a PCR do gene *mecA*, no entanto, poucos laboratórios realizam a PCR para diagnóstico de rotina (Schissler et al., 2009).

Assim, *S. aureus* meticilina resistente (MRSA) e *S. pseudintermedius* meticilina resistente (MRSP) emergiram como problemas significantes em medicina veterinária, saúde animal e saúde pública (Weese e Duijkeren, 2010). A prevalência e ocorrência de MRSP foram determinadas em diferentes populações caninas e em diferentes países, com variação entre 0 e 4.5%, avaliada tanto em cães saudáveis como naqueles admitidos em hospitais veterinários (Griffeth et al., 2008; Hanselman et al., 2008; Murphy et al., 2009). Em cães com piodermite, a ocorrência de MRSP variou entre 0 e 66 % (Griffeth et al., 2008; Mendleau et al., 1986; Kania et al., 2004; Sasaki et al., 2007b; Kawakami et al., 2010). No Brasil não existem relatos ou estudos de MRS como causadores de piodermite em cães; porém, considerando o uso abusivo de antimicrobianos na clínica veterinária, acredita-se que essa frequência seja relativamente alta.

Esse estudo teve como objetivo determinar o perfil de resistência da bactéria *S. pseudintermedius* a diferentes antimicrobianos e detectar a presença do gene *mecA* em isolados obtidos de amostras clínicas de piodermites em cães.

## **Material e métodos**

### **Microrganismos**

Um total de 72 isolados bacterianos obtidos de amostras clínicas de piodermites superficiais e profundas de 24 cães atendidos no Hospital Veterinário da UFV foi utilizado no presente estudo. Informações sobre os pacientes como o uso prévio de antimicrobianos foram obtidas através das fichas clínicas arquivadas no hospital veterinário. Todos os isolados foram identificados previamente como *S. pseudintermedius* por meio de PCR-RFLP, segundo metodologia descrita por Bannoehr et al. (2009).

Os isolados foram estocados a -80 °C em infusão de cérebro e coração (BHI, Oxoid Ltd., Basingstoke, England) adicionado de glicerol a 20% (v/v). Para utilização, uma alíquota de cada cultura estocada foi transferida para BHI (Oxoid) e incubada a 37 °C overnight, quando foi estriada em ágar sangue de carneiro desfibrinado a 5% (v/v) com incubação a 37 °C overnight. Após confirmação da pureza das culturas, colônias isoladas foram novamente transferidas para BHI (Oxoid) e incubadas a 37 °C overnight, para execução de análises laboratoriais.

### **Perfil de resistência**

Foram realizados testes de sensibilidade a 12 antimicrobianos pelo método de difusão em disco. Cinco colônias de cada isolado foram transferidas para um tubo contendo BHI (Oxoid) com incubação por 18 horas a 37 °C. A turbidez deste caldo foi ajustada para o padrão de 0.5 na escala de McFarland. Um swab estéril (Labor Swab) foi mergulhado no caldo após o ajuste da

turbidez e em seguida semeado em toda a extensão de uma placa de petri com aproximadamente 4 mm de ágar Mueller-Hinton (Oxoid). Em seguida foram posicionados os discos contendo os antimicrobianos em distâncias equivalentes (no máximo 5 por placa). As placas foram então incubadas a 37 °C com exceção daquelas contendo oxacilina que foram incubadas a 35 °C, por 24 horas. As leituras dos halos de inibição foram feitas por meio de paquímetro milimetrado (CLSI, 2008). Foram utilizados os seguintes antimicrobianos: amoxicilina (10 mcg), amoxicilina + ácido clavulânico (30 mcg), azitromicina (15mcg), cefaclor (30 mcg), cefalexina (30 mcg), ciprofloxacina (5mcg), clindamicina (2mcg), doxiciclina (30 mcg), enrofloxacina (30mcg), imipenem (10 mcg), oxaciclina (1 mcg) e sulfadiazina + trimetoprim (25 mcg) (Cefar Diagnóstica Ltda). O tamanho dos halos de inibição foi avaliado segundo CLSI (2008) e recomendações do fabricante (Cefar Diagnóstica Ltda). A cepa padrão de *S. aureus* ATCC 29213 foi utilizada como controle.

### **Teste genotípico para identificação do gene *mecA***

A presença do gene *mecA* foi detectada por PCR, segundo Bannoehr et al. (2007). Uma alíquota de cada isolado foi adicionada a 3 ml de BHI (Oxoid), e incubada a 37 °C overnight. A cultura obtida foi submetida à extração do DNA genômico utilizando-se o Wizard genomic DNA purification kit (Promega Corp., Madison, Wisconsin, USA), conforme as instruções para bactérias gram-positivas.

As amplificações foram realizadas em volume total de 25 µl, contendo 2 µl de DNA, 12,5 µl do GoTaq green Master Mix (Promega, Wisconsin, USA), 8,5 µl de água livre de nucleases e 1 µl (0.4µM) de cada primer (F1- GTA GAA ATG ACT GAA CGT CCG ATAA e R1- CCA ATT CCA CAT TGT TTC GGT CTA, ambos a 10 pMol/µl). O programa do termociclador para o gene *mecA* consistiu em desnaturação inicial de 5 min a 95°C, seguida de 30 ciclos de desnaturação por 45 segundos a 95°C, anelamento por 45 segundos a 52°C, uma extensão por 1 minuto a 72°C e uma extensão final por 5 minutos a 72°C. Após a amplificação, 5 µl do produto de PCR foram submetidos a eletroforese em gel

de agarose a 1,5% usando marcador de peso molecular de 100 bp (Promega Corp.) e analisada em transiluminador UV. *Staphylococcus pseudintermedius* MRSP 3279 e *S. aureus* USA 100 foram utilizados como controles positivos, e água MilliQ estéril como controle negativo.

## Resultados

Segundo a ficha clínica, dos 24 cães que participaram do estudo nove fizeram uso prévio de antimicrobianos, sendo a cefalexina o mais utilizado (sete cães). Também foram relatados o uso de norfloxacin, enrofloxacin, doxiciclina e clindamicina. As porcentagens de isolados resistentes e com resistência intermediária estão representadas na Figura 1.

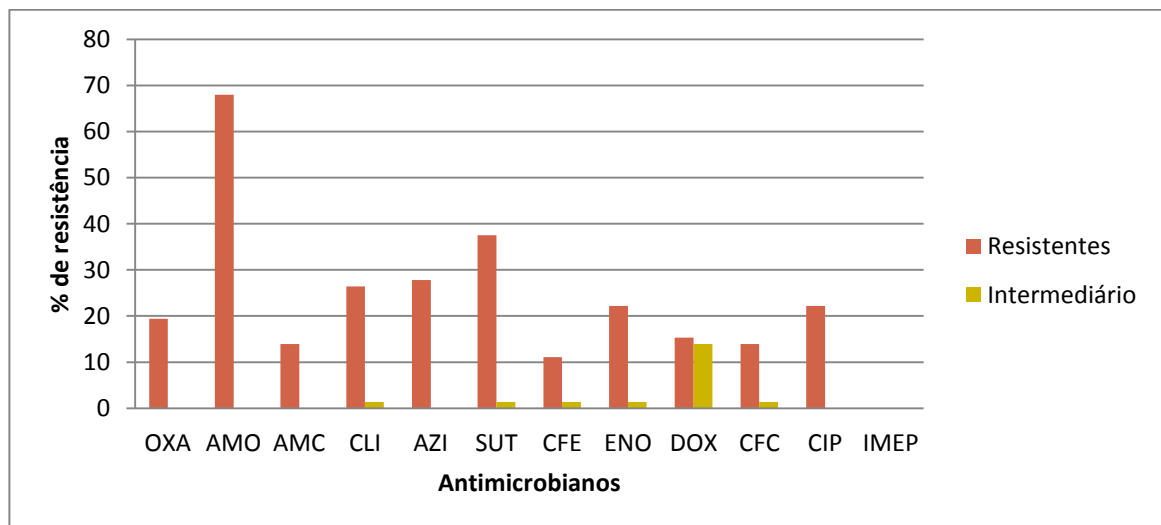


Figura 1: Percentual de resistência de isolados de *S. pseudintermedius* a diferentes antimicrobianos. Legenda: oxacilina (OXA), amoxicilina (AMO), amoxicilina+ácido clavulânico (AMC), clindamicina (CLI), azitromicina (AZI), sulfametoxazol (SUT), cefalexina(CFE), enrofloxacin (ENO), doxiciclina (DOX), cefaclor (CFC), ciprofloxacina (CIP) e imipenem (IMEP).

Os isolados apresentam variados perfis de resistência aos antimicrobianos avaliados: 17 (23,6%) foram susceptíveis a todos os

antimicrobianos testados, 20 (27,8%) foram resistentes a um antimicrobiano, e 6 (8,3%) resistentes a 10 antimicrobianos (Tabela 1).

Tabela 1: Resistência simultânea aos antimicrobianos dos isolados de *S. pseudintermedius*.

No. de antimicrobianos	No. de isolados resistentes	Isolados resistentes
1	20	1A; 4B; 6B; 7A; 7B; 7C; 9A; 9B; 9C; 12A; 12B; 12C; 14A; 14B; 14C; 15A; 16C; 17C; 21A; 21C
2	5	1C; 8A; 8B; 15B; 17B
3	5	8C; 21B; 23A; 23B; 23C
4	8	5A; 5B; 5C; 6A; 10B; 11A; 11B; 11C
5	4	3A; 22A; 22B; 22C
7	2	24A; 24B
8	1	24C
9	4	2A; 20A; 20B; 20C
10	6	1A; 2B; 2C; 13A; 13B; 13C

Os isolados intermediários foram considerados resistentes nesta tabela.

Todos os isolados foram submetidos à PCR para identificação do gene *mecA* e dos 72 isolados apenas quatro não apresentaram este gene. Dos isolados, 68 apresentaram um fragmento de 310 bp referentes ao gene *mecA* conforme representado na Figura 2. Os perfis de resistência de cada isolado separadamente estão representados no Quadro 1. Quando consideramos os isolados separadamente, 94,4% apresentaram o gene de resistência, no entanto, se considerarmos os animais individualmente, todos os animais apresentaram pelo menos uma cepa MRSP.



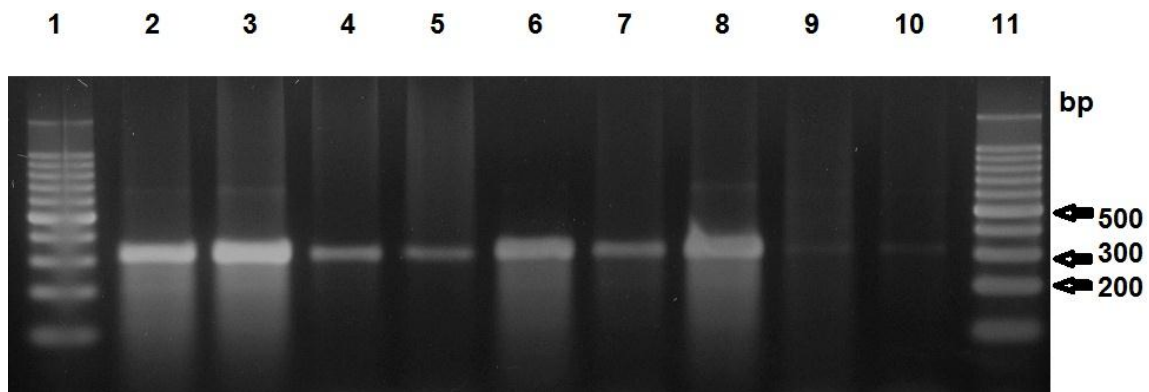


Figura 2: Eletroforese em gel de agarose dos resultados de PCR para a detecção do gene *mecA*.

Linha 1 e 11, marcador de peso molecular; linha 2, MRSP 3279; linha 3, isolado n. 2A; linha 4, isolado n. 3A; linha 5, isolado n. 4A; linha 6; isolado n.5A; linha 7, isolado n.6A, linha 8, isolado 2B; linha 9, isolado 7A; linha 10, isolado 12B.

## Discussão

Os antimicrobianos utilizados neste estudo foram escolhidos devido a sua grande utilização na clínica de pequenos animais, com exceção do imipenem que apesar de ser um  $\beta$ -lactâmico injetável pouco utilizado em medicina veterinária foi selecionado devido a sua grande atividade antibacteriana. Possui atividade contra quase todos os aeróbios e anaeróbios gram-positivos ou negativos, cocos ou bastonetes de importância clínica, sendo considerado como terapia alternativa em infecções graves e resistentes a múltiplos antimicrobianos. No entanto, *Staphylococcus* resistentes a meticilina também podem ser resistentes ao imipenem (Maddison et al., 2008). No presente estudo, os 72 isolados foram susceptíveis ao imipenem, mesmo aqueles resistentes a oxacilina, confirmando sua atividade antimicrobiana. Ruscher et al. (2009) obtiveram resultado similar de antibiograma confirmando a eficácia do imipenem sob *S. pseudintermedius*.

A cefalexina é considerada a primeira escolha no tratamento de piodermites superficiais por ser segura e eficiente (Toma et al., 2008). Drogas como a cefalexina e a amoxicilina / ácido clavulânico são escolhas excelentes como primeiro tratamento porque a resistência a essas drogas ocorre com

baixa frequência, exceto quando agentes resistentes a meticilina estão envolvidos (May, 2006). A cefalexina foi utilizada em sete dos nove animais que fizeram uso prévio de antimicrobianos, no entanto, ela foi a segunda droga com menor porcentagem de resistência (10,7%), seguida pela amoxicilina+ácido clavulânico (13,3%) (Figura 1). Esses resultados evidenciam que essas drogas ainda devem ser consideradas como primeira escolha no tratamento das piodermites.

O antibacteriano com maior índice de resistência foi a amoxicilina (65,3%) (Figura 1). A amoxicilina quando não potencializada, não possui ação contra os estafilococos produtores de penicilinas. A alta prevalência de resistência adquirida tem limitado o papel das aminopenicilinas não potencializadas na clínica de pequenos animais (Maddison et al., 2008).

Um estudo avaliou os critérios de interpretação do CLSI de 2008 e de 2004, comparando os resultados de testes de difusão em disco com oxacilina com a presença do gene *mecA* para amostras de *S. pseudintermedius*. Segundo o CLSI de 2008, valores de interpretação de  $\leq 10$  mm para o halo de inibição da oxacilina no método de difusão em disco resultaram em uma sensibilidade de 70% no diagnóstico quando comparada a amostras *mecA* positivas. Se considerado o critério de interpretação do CLSI de 2004 de  $\leq 17$  mm a sensibilidade é de 100% (Schissler et al., 2009). Mesmo considerando como  $\leq 17$  mm o tamanho do halo de inibição, o presente estudo observou grandes divergências entre os resultados do teste de difusão em disco (19,4%) e a detecção do gene *mecA* (94,4%). A discordância entre a presença do *mecA* e a ausência de fenótipo oxacilina resistente correspondente já foi previamente reconhecida em outros estudos (Bemis et al., 2006; Schissler et al., 2009). Este resultado nos leva a inferir que apesar dos isolados apresentarem o gene para resistência à meticilina, esses isolados provavelmente não estão expressando esse gene ou estão expressando em quantidades mínimas não detectadas pelo teste de difusão em disco. A hipótese dos isolados não estarem expressando o gene pode ser suportada pelo fato de que em geral não são observadas falhas

no tratamento clínico dessas piодermites no HVT/DVT. Um estudo avaliando a recorrência de casos de piодermites seria necessário para elucidar esses resultados. Vários estudos procuraram avaliar a presença de isolados de MRSP entre as populações caninas. Os isolados destes estudos foram provenientes de diversos locais, tanto de animais saudáveis como de animais com lesões de pele, e vários métodos diferentes de identificação de resistência foram utilizados, como a difusão em disco de oxacilina, a detecção da proteína PBP, a detecção do gene *mecA*, o que dificulta a comparação adequada entre eles (Sasaki et al., 2007b; Griffeth et al., 2008; Hanselman et al., 2008; Ruscher et al., 2009; Morris et al., 2010; Kawakami et al., 2010; De Lucia et al., 2011; Nienhoff et al., 2011). A frequência de MRSP detectados no presente estudo (94,4%) foi muito superior àquelas observadas por esses autores, sendo este resultado preocupante.

Kawakami et al. (2010) obteve alta porcentagem de isolados de MRSP (66,5%), sendo que este estudo também avaliou isolados de piодermites caninas através da presença do gene *mecA*. Outros estudos que apresentaram porcentagens menores, geralmente avaliaram isolados de pele hígida (Griffeth et al., 2008; Epstein et al., 2009; Morris et al., 2010) o que pode explicar as divergências entre os resultados obtidos. Uma outra possível explicação para o número elevado de MRSP é o uso indiscriminado de antimicrobianos no Brasil. Somente em 2011 foi implementada uma lei que obriga farmácias a reterem as receitas médicas de antimicrobianos, o que dificulta a automedicação ou medicação de animais sem indicação veterinária (Mello, 2010). Estudos apontam o uso prévio de antibacterianos como um fator de risco para a infecção com os MRSP (Sasaki et al., 2007a; Duijkeren et al., 2011), o que justificaria a alta ocorrência de MRSP nas amostras avaliadas.

São necessários mais estudos que acompanhem o resultado das terapias antimicrobianas por tempo prolongado para avaliar as recorrências das piодermites caninas e comparar a susceptibilidade antimicrobiana *in vitro* ao tratamento com essas drogas nos pacientes. Os resultados do presente estudo

apontam para a importância de se realizar antibiograma ou mesmo técnicas moleculares para determinar o melhor tratamento e prevenir o aparecimento de cepas multi resistentes.

## REFERÊNCIAS

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

BANNOEHR, J. et al. Population Genetic Structure of the *Staphylococcus intermedius* Group: Insights into *agr* Diversification and the Emergence of Methicillin-Resistant Strains. **Journal of Bacteriology**, v.189, n.23, p.8685-8692, 2007.

BANNOEHR, J., et al. Molecular Diagnostic Identification of *Staphylococcus pseudintermedius*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, n.2, p.469-471, 2009.

BEMIS, D.A. et al. Comparison of Tests to Detect Oxacillin Resistance in *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus schleiferi*, and *Staphylococcus aureus* Isolates from Canine Hosts. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.9, p.3374-3376, 2006.

**Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)**, Ed.3, Wayne, 2008.

DE LUCIA, M. et al. Prevalence of Canine Methicillin Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a Veterinary Diagnostic Laboratory in Italy. **Research in Veterinary Science**, v.91, p.346-348, 2011.

DEVRIESE, L.A. et al. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a Coagulase-positive Species from Animals. **International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p. 1569-1573, 2005.

DEVRIESE, L.A. et al. *Staphylococcus pseudintermedius* versus *Staphylococcus intermedius*. **Veterinary Microbiology**, v.133, p.206-207, 2009.

DUIJKEREN, E.V. et al. Review on Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.66, p.2705-2714, 2011.

ENRIGHT, M.C. et al. The Evolutionary History of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **PNAS**, v.99, n.11, p.7687-7692, 2002.

EPSTEIN, C.R. et al. Methicillin-resistant Commensal staphylococci in Health Dogs as a Potential Zoonotic Reservoir for Community-acquired Antibiotic Resistance. **Infection, Genetics and Evolution**, v.9, p.283-285, 2009.

GUARDABASSI, L. et al. Transmission of Multiple Antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* Between Dogs Affected by Deep Pyoderma and Their Owners. **Veterinary Microbiology**, v.98, p.23-27, 2004.

GRIFFETH, G.C. et al. Screening for Skin Carriage of Methicillin-resistant Coagulase-Positive Staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in Dogs with Healthy and Inflamed Skin. **Veterinary Dermatology**, v. 18, p. 181, 2008.

HANSELMAN, B.A. et al. Methicillin-resistant Staphylococcal Colonization in Dogs Entering a Veterinary Teaching Hospital. **Veterinary Microbiology**, v.126, p.277-281, 2008.

IHRKE, P.J. **Bacterial Skin Disease in the Dog a Guide to Canine Pyoderma**. U.S.A: Bayer AG, 1996. 98 p

KANIA, S.A. et al. Methicillin Resistance of Staphylococci Isolated from the Skin of Dogs with Pyoderma. **American Journal of Veterinary Research**, v.65, p.1265–8, 2004.

KAWAKAMI, T. et al. Antimicrobial Susceptibility and Methicillin Resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp.

coagulans Isolated from Dogs with Pyoderma in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.72, p.1615-1619, 2010.

MADDISON, J.E.; PAGE, S.W.; CHURCH, D.B. **Small Animal Clinical Pharmacology**. 2ed. Philadelphia: Saunders, 2008.

MAY, E.R. Bacterial Skin Diseases: Current Thoughts on Pathogenesis and Management. **Veterinary Clinics Small Animal Practice**, v.36, p.185-202, 2006.

MEDLEAU, L. et al. Frequency and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus* species Isolated from Canine Pyodermas. **American Journal of Veterinary Research**, v. 47, p.229–31, 1986.

MELLO, D.R. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 44**, 2010. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/>. Acesso em: 15/01/2011.

MORRIS, D.O. et al. The Prevalence of Carriage of Methicillin-resistant Staphylococci by Veterinary Dermatology Practice Staff and Their Respective Pets. **Veterinary Dermatology**, v.21, p.400-407, 2010.

MURPHY C. et al. Occurrence of Antimicrobial Resistant Bacteria in Healthy Dogs and Cats Presented to Private Veterinary Hospitals in Southern Ontario: a Preliminary Study. **Canadian Veterinary Journal**, v.50, p.1047–53, 2009.

NIENHOFF, U. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* Among Dogs Admitted to a Small Animal Hospital. **Veterinary Microbiology**, v.150, p.191-197, 2011.

QUINN, P. J. et al. **Clinical Veterinary Microbiology**. London: Wolfe, 1994. 648 p

RUSCHER, C. et al. Prevalence of Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* Isolated from Clinical Samples of Companion Animals and Equidae. **Veterinary Microbiology**, v.136, p.197-201, 2009.

SASAKI, T. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a Veterinary Teaching Hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, n.4, p.1118-1125, 2007a.

SASAKI, T., et al. Reclassification of Phenotypically Identified *Staphylococcus intermedius* Strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p., n. 9, p. 2770-2778, 2007b.

SCHISLER, J.R. et al. Evaluation of Clinical Laboratory Standards Institute Interpretative Criteria for Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* Isolated from Dogs. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.21, p. 684-688, 2009.

TOMA, S. et al. Efficacy and Tolerability of Once-daily Cephalexin in Canine Superficial Pyoderma: an Open Controlled Study. **Journal of Small Animal Practice**, v.49, p.384-391, 2008.

WEESE, J.S.; DUIJKEREN, E.V. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in Veterinary Medicine. **Veterinary Microbiology**, v.140, p.418-429, 2010.

## CONCLUSÃO GERAL

Nos últimos anos o MRSP emergiu como preocupação em vários hospitais e clínicas veterinárias em todo o mundo. Porcentagens crescentes de bactérias multi resistentes isoladas dos mais diversos casos de infecções são risco a saúde animal e pública. A educação dos médicos veterinários quanto a presença de estafilococos resistentes é de grande importância para que este possa escolher a melhor abordagem terapêutica, diminuindo o risco de seleção de bactérias resistentes e alertando para a transmissão entre o animal e seu proprietário.

Os resultados do presente estudo apontam para a importância de se realizar antibiogramas ou mesmo técnicas moleculares para determinar o melhor tratamento e prevenir o aparecimento de cepas multi resistentes. Os resultados confirmaram a ocorrência de *S. pseudintermedius* como agente etiológico de piodermites superficiais e profundas em cães atendidos no Hospital Veterinário da UFV localizado na região de Viçosa, MG, Brasil, além de determinar alta ocorrência de MRSP nestes animais. São necessários mais estudos que determinem a ocorrência de MRSP em outras regiões do país e que acompanhem o resultado das terapias antimicrobianas por tempo prolongado para avaliar as recorrências das piodermites caninas, determinando a resistência bacteriana *in vivo*.