

**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CHRISTINA RESENDE MARTINS**

**INFECÇÕES ESTAFILOCÓCICAS EM CAES: PREVALÊNCIA,  
RESISTÊNCIA ANTIBACTERIANA, FATORES DE RISCO E DE VIRULÊNCIA**

**UBERLÂNDIA**  
**2020**

CHRISTINA RESENDE MARTINS

**INFECÇÕES ESTAFILOCÓCICAS EM CAES: PREVALÊNCIA,  
RESISTÊNCIA ANTIBACTERIANA, FATORES DE RISCO E DE VIRULÊNCIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Saúde Animal  
Orientadora: Profa. Dra. Daise Aparecida Rossi

Uberlândia, 28 de fevereiro de 2020.

Profa. Dra. Daise Aparecida Rossi (Orientadora) – FAMEV-UFU

Profa. Dra. Roberta Torres de Melo – FAMEV-UFU

Profa. Dra. Eliane Pereira Mendonça – UNIUBE

Profa. Dra. Márcia Valéria Rizzo Scognamillo- Instituto Homeopático Jacqueline Paker

Profa. Dra. Carolina Franchi João – FAMEV – UFU

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

M386 2020	<p>Martins, Christina Resende, 1980- INFECÇÕES ESTAFILOCÓCICAS EM CAES: PREVALÊNCIA, RESISTÊNCIA ANTIBACTERIANA, FATORES DE RISCO E DE VIRULÊNCIA [recurso eletrônico] / Christina Resende Martins. - 2020.</p> <p>Orientador: Daise Aparecida Rossi. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós- graduação em Ciências Veterinárias. Modo de acesso: Internet. Disponível em: <a href="http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.199">http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.199</a> Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Veterinária. I. Rossi, Daise Aparecida, 1963-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.</p> <p>CDU: 619</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:  
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091  
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias  
BR 050, Km 78, Campus Glória, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
Telefone: (34) 2512-6811 - www.ppgcv.famev.ufu.br - mesvet@ufu.br



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	CIÊNCIAS VETERINÁRIAS				
Defesa de:	TESE DE DOUTORADO Nº PPGCV/003/2020				
Data:	28 de fevereiro de 2020	Hora de início:	14:10	Hora de encerramento:	17:00
Matrícula do Discente:	11513MEV002				
Nome do Discente:	<b>CHRISTINA RESENDE MARTINS</b>				
Título do Trabalho:	INFECÇÕES ESTAFILOCÓCICAS EM CÃES: PREVALÊNCIA, RESISTÊNCIA ANTIBACTERIANA, FATORES DE RISCO E DE VIRULÊNCIA				
Área de concentração:	SAÚDE ANIMAL				
Linha de pesquisa:	CLÍNICA MÉDICA E INVESTIGAÇÃO ETIOLÓGICA				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	EPIDEMIOLOGIA DE ZOONOSES				

Reuniu-se na Sala 54, bloco 2D, Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: Roberta Torres de Melo - UFU; Carolina Franchi João - UFU; Márcia Valéria Rizzo Scognamillo - Instituto Homeopático Jacqueline Peker; Eliane Pereira Mendonça - UNIUBE; Daise Aparecida Rossi orientadora da candidata.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr(a). Daise Aparecida Rossi, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(as) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Daise Aparecida Rossi, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/02/2020, às 17:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carolina Franchi João, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/02/2020, às 17:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eliane Pereira Mendonça, Usuário Externo**, em 28/02/2020, às 17:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Márcia Valéria Rizzo Scognamillo, Usuário Externo**, em 28/02/2020, às 17:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Roberta Torres de Melo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 28/02/2020, às 17:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

02/03/2020

SEI/UFU - 1867607 - Ata de Defesa - Pós-Graduação



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1867607** e o código CRC **DF2B2061**.

---

Referência: Processo nº 23117.009863/2020-92

SEI nº 1867607

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**CHRISTINA RESENDE MARTINS** - Nascida em Belo Horizonte, estado de Minas Gerais, em 13 de setembro de 1980, filha de Manoel Lopes Martins e Rozélia Resende Cunha Martins. Médica Veterinária, graduada em dezembro de 2002 pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia. Durante a graduação foi bolsista do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) por um período de dois anos 2000-2002. Em 2012, concluiu o mestrado pelo Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias na Universidade Federal de Uberlândia, área de concentração em Saúde Animal. Em 2013, finalizou a Pós- graduação *lato sensu* em Dermatologia de cães e gatos pela Faculdade Qualittas. Em 2015, iniciou o doutorado pelo Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias na Universidade Federal de Uberlândia, área de concentração em Saúde Animal. Em 2018, finalizou pós-graduação em Alergologia de cães e gatos pela Dermatovet Cursos. Possui experiência nas seguintes áreas: clínica de pequenos animais com enfoque em dermatologia de cães e gatos.

**“Não adianta vencer sem melhorar-nos.  
O lugar em que você vive é seu campo de ação.  
O seu setor de engajamento é seu próprio trabalho.  
As armas mais eficientes, e das mais importantes, são o amor e a  
humildade, o conhecimento e a paciência.  
Ordens a observar: trabalhar e servir.  
Sinal de promoção: dever cumprido.  
Marca da vitória: alegria com a bênção de Deus que nenhuma palavra do  
mundo consegue traduzir”.**

**(Vitória de André Luiz  
Livro Busca e acharás- Francisco Cândido Chavier)**

**Dedico este trabalho aos animais, razão  
de toda a minha vida profissional.**



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiro a Deus, Jesus e toda espiritualidade que me assiste, sem a qual nem aqui hoje eu estaria.

Aos meus pais, Rozélia e Manoel, por me aceitarem como filha, me apoiarem desde a infância a realizar meu sonho de ser “médica de bichos” e em toda a minha trajetória nessa profissão que amo.

Aos meus irmãos, Henrique e Romeu, que são meus melhores amigos, sempre com palavras encorajadoras e conversas descontraídas, não me deixando desistir nunca!

Ao meu marido, companheiro de vida, pai das minhas filhas, João Gabriel, que atura meu estresse diário, cuida de mim e me ama (mesmo assim).

Às minhas flores, Manuela, Gabriela e Marina, que são lenha na fogueira da minha vida, meus maiores projetos e desafios, amo vocês mais do que a mim mesma.

Aos meus sogros, Mariana e João Leopoldo, por toda dedicação com as minhas filhas, e amizade permitindo assim que eu tivesse mais tempo para estudar.

A todos os animais com os quais tive a honra de conviver como tutora, aos que ainda aqui estão e aos que já se foram, vocês me ensinam lições de amor, resiliência e fidelidade todos os dias. Aos cães que participaram deste estudo e seus tutores que tão gentilmente permitiram.

A minha querida orientadora profa. Dra. Daise Aparecida Rossi, que foi de uma amorosidade sem igual, ultrapassando os limites de ser apenas professora, sendo verdadeiramente amiga e companheira, você é um exemplo de pessoa e profissional.

A professora Dra. Roberta Torres Melo, que literalmente segurou nas minhas mãos e me conduziu nessa jornada, dedicando-se inclusive fora de seus horários, para viabilizar a parte laboratorial deste estudo, gratidão eterna.

A professora Dra. Ana Laura Graziottin que tanto me auxiliou na qualificação, aguentando meu desespero com tranquilidade e palavras amigas.

Aos professores Dr. Marcos Bryan (USP), Dra. Kátia Santos (UFRJ), Dra. Rosineide Ribas (UFU) e a Mariana Augusto (aluna doutorado - UFRJ) pelo auxílio com as cepas controle, atendendo à minha solicitação de pronto, gratidão!

As alunas de iniciação científica Clara, Rafaela e Amanda, e a aluna de mestrado Raquelline (Labio), que abraçaram essa causa junto comigo, sem vocês nada disso seria possível. Aos colegas do Labio pela amizade e presteza em todos os momentos que precisei.

A professora e amiga Bia Fonseca, que sem demora atendeu ao meu pedido de auxílio com a estatística e em um dia me entregou tudo arrumadinho, você é maravilhosa amiga!

À querida amiga Cíntia pelas tardes de café e bate papo descontraído que me ajudaram emocionalmente a manter meu foco nessa empreitada. As queridas veterinárias Lara e Cíntia (residente HVET-UFU), pelo suporte com vários tutores, me auxiliando na seleção dos cães.

As minhas sócias, amigas e companheiras de missão de vida junto aos animais, Márcia e Aline; amo vocês!

Este trabalho foi fruto de muita cooperação e dedicação, portanto, deixo aqui minha eterna gratidão a todos que de forma direta e indireta contribuíram para que fosse realizado.

**Muito obrigada a todos!**

## RESUMO

Apesar de considerada uma bactéria que compõe a microbiota natural da pele dos cães, *S. pseudintermedius* vêm sendo associado a infecções de pele e tecidos delicados em cães, bem como em alguns casos de infecções humanas. A tese foi fracionada em três capítulos, sendo o primeiro referente às considerações gerais dos tópicos abordados nos demais capítulos. O segundo capítulo objetivou avaliar a dinâmica do perfil de resistência a um painel de mais de 30 antimicrobianos, de bactérias isoladas de 698 amostras clínicas de cães entre os anos 2016 e 2018. Para a avaliação utilizou-se resultados de testes de difusão em discos realizados em laboratório particular entre os anos de 2016 a 2018. A análise dos resultados permitiu determinar os agentes etiológicos mais envolvidos nas infecções e a evolução temporal da resistência aos antibacterianos. O terceiro capítulo objetivou avaliar a presença de *S. pseudintermedius* em amostras clínicas de orelha e pele de cães e das narinas de seus tutores, bem como a presença dos genes de resistência *mecA*, *mecA1* e *mecA2*, que conferem resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, gene *msr*, que confere resistência aos macrolídeos e genes de virulência *fnbB* (invasão celular) e PVL (leucotoxina), utilizando a técnica de PCR. O desempenho *in vitro* dos antimicrobianos oxacilina, cefovecina e gentamicina foi determinado pelos métodos de difusão em discos e concentração inibitória mínima - CIM. Também determinou a associação de fatores relacionados a hábitos de vida do animal à infecção por *S. pseudintermedius*, associação entre a presença de genes e resistência antimicrobiana e os testes.

**Palavras-chave:** Infecções estafilocócicas. *mecA*. MIC. Evolução temporal.

## ABSTRACT

Despite being considered a bacteria that is part of the natural microbiota of dogs' skin, *S. pseudintermedius* has been associated with infections in skin and delicate tissues in dogs, as well as some cases of infections in humans. The thesis was divided into three chapters, the first referring to the general considerations of topics covered in the other chapters. The second chapter aimed to evaluate the resistance profile to a panel of more than 30 antimicrobials, with bacteria isolated from 698 clinical samples of dogs between the years 2016 and 2018. For the evaluation, results from diffusion tests on discs performed in a private laboratory between the years 2016 to 2018 were used. The analysis of the results determined the etiological agents mostly involved in infections and the temporal evolution of antibacterial resistance. The third chapter aimed to evaluate the presence of *S. pseudintermedius* in clinical samples taken from dogs' skins and ears, and the nostrils of their guardians. As well as evaluate the presence of resistance genes *mecA*, *mecA1* and *mecA2*, which confer resistance to  $\beta$ -lactam antimicrobials, gene *msr* responsible for resistance to macrolides, and virulence genes *FnbB* (cell invasion) and *PVL* (leukotoxin), using PCR technique. The in vitro performance of antimicrobials oxacillin, cefovecin and gentamicin was determined by the methods of disk diffusion and minimum inhibitory concentration - MIC. It also determined the association of factors related to the animal's lifestyle with infection with *S. pseudintermedius*, an association between the presence of genes and antimicrobial resistance and the tests.

**Keywords:** Staphylococcal infections. *mecA*. MIC. Temporal evolution.

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO II

<b>Tabela 1.</b>	Análise de variação temporal da resistência aos antimicrobianos de 586 isolados de amostras clínicas de cães entre os anos de 2016 a 2018.	52
<b>Tabela 2.</b>	Análise de variação temporal da resistência antimicrobiana de 169 isolados de amostras do trato urinário inferior de cães entre os anos de 2016 a 2018.	53
<b>Tabela 3.</b>	Análise de variação temporal da resistência antimicrobiana de 238 isolados de amostras de orelha de cães entre os anos de 2016 a 2018.	54
<b>Tabela 4.</b>	Análise de variação temporal da resistência antimicrobiana de 76 isolados de amostras de pele de cães entre os anos de 2016 a 2018.	55
<b>Tabela 5.</b>	Análise de variação temporal da resistência antimicrobiana de 277 <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva isolados de cães entre os anos de 2016 a 2018	56

### CAPÍTULO III

<b>Tabela 1.</b>	Sequência e pares de bases dos genes pesquisados nos isolados de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> de cães e tutores.	86
<b>Tabela 2.</b>	Índices obtidos para o teste de difusão em discos em comparação ao padrão-ouro (MIC).	86

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO II

- Figura 1.** Bactérias identificadas em análises de 698 amostras clínicas de cães coletadas entre os anos de 2016 a 2018. 51

## LISTA DE ANEXOS

### CAPÍTULO III

<b>Anexo 1.</b>	Questionário respondido pelos tutores dos cães com piodermite superficial e/ou otites.	85
-----------------	---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<	Menor
>	Maior
≤	Menor ou igual
≥	Maior ou igual
μL	Microlitro (s)
V	Voltagem
mA	Miliamperagem
W	Watts (potencial)
BHI	Brain and Heart Infusion
BP	Baird Parker ágar
CEF	Cefovecina
CIM	Concentração inibitória mínima
<i>erm</i> (A) e (B)	<i>Erythromycin resistance gene</i> (A) e (B)
<i>fnbA</i>	<i>Fibronectin – binding A gene</i>
FnbA	Fibronectin – binding protein A
<i>fnbB</i>	<i>Fibronectin – binding B gene</i>
FnbB	Fibronectin – binding protein B
GEN	Gentamicina
<i>luk I</i>	Leucotoxina I
<i>luk S/F</i>	Leucotoxina S/F
<i>mec</i>	<i>Methicillin resistant gene</i>
<i>mrsA</i>	<i>Macrolide resistance gene</i>
MRSA	Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSP	Methicillin resistant <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
OXA	Oxacilina
PBP	Proteína Ligadora de Penicilina
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
PVL	Leucocidina de Panton- Valentine
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SP	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
SCCmec	Staphylococcal Cassette Chromosome mec



## Sumário

CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS .....	1
1 INTRODUÇÃO .....	2
2 OBJETIVOS .....	4
2.1 Objetivo geral .....	4
2.2 Objetivos Específicos .....	4
3 REVISÃO DE LITERATURA .....	5
3.1 Microbiota cutânea no cão .....	5
3.2 Histórico e caracterização de <i>S. pseudintermedius</i> .....	7
3.3 <i>S. pseudintermedius</i> e virulência .....	8
3.4 Resistência aos antimicrobianos .....	9
3.4.1. Resistência à meticilina (MRSP) .....	10
3.4.2. Resistência a outras drogas (multirresistência) .....	11
4. Implicações zoonóticas .....	12
5. Referências bibliográficas .....	14
CAPÍTULO II – Análise temporal (2016-2018) do perfil de resistência aos antimicrobianos de isolados clínicos de cães .....	23
RESUMO .....	24
ABSTRACT .....	25
INTRODUÇÃO .....	26
MATERIAL E MÉTODOS .....	27
RESULTADOS .....	29
DISCUSSÃO .....	33
CONCLUSÃO .....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	40
FIGURA E TABELAS .....	51
CAPÍTULO III – Ocorrência, fatores de patogenicidade e riscos associados a infecção por <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> em cães e seus tutores .....	58
ABSTRACT .....	59
RESUMO .....	60
MATERIAL E MÉTODOS .....	62
RESULTADOS .....	66
DISCUSSÃO .....	69

CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS.....	75
Anexo 1- .....	85

## **CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS**

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Staphylococcus* é composto por 38 espécies e 17 subespécies, sendo metade colonizadores nativos dos humanos. *Staphylococcus pseudintermedius* foi a mais recente espécie de *Staphylococcus* coagulase positiva identificada, e forma junto com outras duas espécies, *S. intermedius* e *S. delphini*, também capazes de produzir coagulase, o grupo conhecido como SIG (*Staphylococcus intermedius* group). Os membros desse grupo têm sido identificados em várias espécies animais como colonizadores naturais ou como causadores de doenças (SASAKI et al., 2007).

De modo geral, *S. pseudintermedius* está associado a infecções de pele e tecidos delicados em cães, porém alguns casos em humanos vem sendo reportados (CHUANG et al., 2010; STEGMANN et al., 2010; SAVINI et al., 2013) causando quadros semelhantes aos provocados por *S. aureus* (PAUL et al., 2012). Com o uso de testes fenotípicos, *S. pseudintermedius* pode ser erroneamente identificado como *S. intermedius* ou *S. aureus* (Van DUIJKEREN et al., 2004; SCHWARZ et al., 2008), entretanto, o emprego de técnica molecular com a identificação de sequências gênicas específicas pode ser utilizada para sua correta identificação (SASAKI et al., 2007; SASAKI et al., 2010).

Aproximadamente 90% dos cães são colonizados por *S. pseudintermedius*, possuindo como locais frequentes de isolamento a faringe, o reto, a narina e a pele. É considerada uma bactéria oportunista no cão, causando mais comumente, infecções de pele e orelhas (RUBIN; CHIRINO-TREJO, 2011; Van DUIJKEREN et al., 2011). Desta forma, geralmente só causará doença caso a resistência do hospedeiro diminua, como no caso de doenças imunossupressoras, ou haja alteração na barreira cutânea, como na dermatite atópica, como exemplos. A própria colonização é considerada um fator de risco para que a infecção ocorra, assim como acontece com *S. aureus* em humanos, e os cães acabam infectados pelas próprias colônias residentes em seu corpo (FAZAKERLEY et al., 2010).

A patogênese da infecção cutânea em cães por *S. pseudintermedius* ainda não está totalmente elucidada, mas acredita-se que fatores inerentes ao hospedeiro e ao agente infeccioso, como possuir genes de virulência e outros

fatores de patogenicidade, sejam os mais relevantes. A quebra das defesas cutâneas naturais, promoverão a colonização e favorecerão a infecção por esse agente (BANNOEHR et al, 2011).

*S. pseudintermedius* produz uma variedade de fatores de virulência, incluindo as enzimas coagulases, termonucleases e proteases, proteínas de superfície, tal como fatores de fragmentação e proteína A, além de toxinas como citotoxinas, toxinas esfoliativas e enterotoxinas (WLADYKA et al., 2008). Além disso, é uma bactéria que tem a capacidade de formar biofilmes (FUTAGAWA-SAITO et al., 2006).

O crescente interesse em se estudar *S. pseudintermedius* aconteceu pela maior identificação de amostras clínicas contendo cepas *Staphylococcus pseudintermedius* meticilina resistente (MRSP), que podem ser a causa de graves infecções em várias espécies, incluindo cães, gatos, cavalos, pombos, jumentos e também humanos (RUSCHER et al., 2009). Vários casos de infecções humana causadas por esse patógeno vêm sendo relatadas ao longo dos anos (KEMPKER et al., 2009; STEGMANN et al., 2010; SOMAYAJI et al., 2016).

Devido à proximidade cada vez maior dos homens com os cães há uma crescente preocupação em se determinar qual o real risco da transmissão e infecção por *S. pseudintermedius*, principalmente por cepas resistentes e/ou multirresistentes. Também é necessário monitorar nesta espécie, genes de resistência aos antimicrobianos e aqueles que conferem maior virulência à espécie, verificando a circulação dessas cepas entre os cães e seus tutores, além da sua associação com fatores de risco para ocorrência do microorganismo nestes dois grupos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Determinar o perfil de resistência aos antimicrobianos de bactérias isoladas de infecções clínicas de cães entre os anos 2016 a 2018 para avaliar a dinâmica dos padrões de resistência ao longo do período estudado.

Isolar *S. pseudintermedius* em amostras clínicas de cães com piodermite superficial e/ou otite crônica/recidivante e identificar nas cepas, a resistência a oxacilina, cefovecina e gentamicina, genes que conferem resistência aos antimicrobianos e outros relacionados à virulência, associando os resultados a fatores de risco para a infecção pelo agente.

### 2.2 Objetivos Específicos

Avaliar sob uma perspectiva temporal, a resistência aos antimicrobianos dos agentes etiológicos mais envolvidos em infecções caninas entre os anos de 2016 e 2018.

Determinar a prevalência de *S. pseudintermedius* em cães com piodermite superficial crônica/recidivante ou otite externa crônica/recidivante e de seus tutores e verificar nos isolados:

- a presença de espécies MRSP;
- a frequência de genes de resistência aos beta-lactâmicos: *mecA*, *mecA1* e *mecA2* e resistência aos macrolídeos: *msrA*;
- a frequência dos genes de virulência *fnbB* (invasão celular) e PVL (leucotoxina);
- a susceptibilidade a oxacilina, gentamicina e cefovecina em testes de difusão em discos;
- a concentração inibitória mínima (CIM) para a oxacilina, gentamicina e cefovecina;

- se há associação entre os resultados obtidos no teste de difusão em discos com os resultados da CIM;
- se há semelhança fenotípica (resistência) e genotípica (genes) entre as cepas isoladas dos cães e seus tutores;
- os fatores de risco que favorecem a infecção dos cães por *S. pseudintermedius*;
- os fatores de risco que favorecem a transmissão de *S. pseudintermedius* entre cães e tutores.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Microbiota cutânea no cão

O termo microbiota engloba uma série de micro-organismos, como bactérias, fungos, vírus, parasitas e seus metabólitos, além das condições do ambiente que habitam (MARCHESEI; RAVEL, 2015). À microbiota comensal pode-se atribuir diferentes atividades de proteção, como a competição com patógenos por nutrientes, produção de inúmeros metabólitos e modulação do sistema imune, trazendo benefícios tanto ao organismo animal como para o humano (HOFFMAN, 2017).

Parte da microbiota transita entre os humanos e animais, e diferenças filogenéticas podem ser observadas dependendo da técnica de identificação utilizada e da área do corpo coletada (CLAESSON et al., 2010; MEISEL et al., 2016). Estudos sobre co-habitação mostram que indivíduos que vivem em um mesmo ambiente tendem a ter microbiota similar (SONG et al., 2013; MEISEL et al., 2016). Song et al. (2013) demonstraram que tutores em idade adulta têm sua microbiota influenciada pelo cão. Outro estudo avaliou a microbiota de narinas e cavidade oral de humanos, cães e gatos e demonstrou que humanos que convivem com *pets* possuem uma microbiota mais diversificada do que aqueles que não convivem com esses animais (CLEMENTE et al., 2015). Portanto, os estudos apontam que, os cães e gatos que coabitam com humanos podem

influenciar na variabilidade da microbiota dos seus tutores, isso ocorrerá, principalmente pelo convívio com os cães.

A microbiota da pele dos cães possui uma diversidade de bactérias ainda maior que a do homem, sendo os filos mais encontrados: Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes e Fusobacteria. Isso se deve à estrutura natural da pele, onde as glândulas apócrinas e sebáceas são distribuídas de forma mais homogênea ao longo do corpo, enquanto as glândulas écrinas produtoras de suor estão presentes apenas nas patas (WEESE, 2013; MEISEL et al., 2016; HOFFMAN, 2017).

De modo geral, a microbiota bacteriana cutânea pode ser dividida em residente, sendo essa adquirida pelo contato com a mãe no período neonatal, que persiste por toda a vida, e a transitória, composta por bactérias isoladas da pele saudável, mas que não possui importância clínica a não ser quando já existe uma doença infecciosa estabelecida na pele. As bactérias residentes mais comumente encontradas no cão são: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus xylosus*, *Streptococcus* spp, *Clostridium* spp, *Propionibacterium acnes*, *Acinetobacter* spp, *Bacillus* spp, *Micrococcus* spp e *Staphylococcus pseudintermedius*. Já as bactérias transitórias mais comuns são: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Corynebacterium* spp e *Pseudomonas* spp (MILLER et al., 2013).

Em cães saudáveis, *S. pseudintermedius* faz parte da microbiota cutânea, colonizando a pele, folículos pilosos, e em particular, regiões mucocutâneas, como nariz, boca e ânus (FAZAKERLEY et al., 2010). A concentração dessa bactéria pode variar de acordo com a área avaliada no cão e sua raça (PAUL et al., 2011), e também dependente do estado de saúde do cão, que deve ser considerado na avaliação da concentração pelas várias áreas do corpo. Em cães com dermatite atópica, a quantidade desse micro-organismo na pele é muito mais alta do que em cães saudáveis. Fazakerley et al. (2010) relataram que 87% dos cães atópicos são colonizados por *S. pseudintermedius*, enquanto somente 37% dos cães saudáveis apresentaram essa condição.

Importante associação entre infecção e colonização vem sendo observada em cães com piodermite superficial e otite externa (PINCHBECK et al., 2006). Observou-se que 69% dos isolados de lesões infectadas demonstraram estar intimamente relacionados ou serem idênticos a um isolado



residente na mucosa do mesmo cão (FAZAKERLEY et al., 2010). Esse mesmo risco de migração de bactérias também foi observado em humanos em relação ao *S. aureus*, onde 80% dos pacientes com infecções de pele apresentaram carreamento dessa bactéria para a mucosa nasal, sendo que dessas, 65% foram geneticamente idênticas. Este dado torna-se importante porque, em humanos, a presença de *S. aureus* em mucosa nasal é fator de risco para instalação de infecções pós- cirúrgicas (WERTHEIM et al., 2005).

### 3.2 Histórico e caracterização de *S. pseudintermedius*

O gênero *Staphylococcus* compreende uma variedade de patógenos oportunistas de relevância variável na Medicina Veterinária, sendo a espécie mais importante em cães, *S. pseudintermedius*, que anteriormente era classificado como *S. intermedius* (DREVRIESE et al., 2005; KWON et al., 2006). *S. pseudointermedius* pertencente à Família *Micrococcaceae*, são cocos Gram positivos que se agrupam na forma de cachos de uva, com colônias de tamanho médio, coloração esbranquiçada e opaca (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012). Foi assim denominado pela sua semelhança fenotípica com o *S. intermedius*, e por isso, acrescentou-se o prefixo *pseudos*, que significa “falso” em Latim (DREVRIESE et al., 2005). Forma junto com outras duas espécies, *S. intermedius* e *S. delphini*, também *Staphylococcus* coagulase positivas, o grupo conhecido como SIG (*Staphylococcus intermedius* group). *S. delphini* tem sido associado a infecções cutâneas purulentas em golfinhos e *S. intermedius* é mais comumente encontrado em isolados de pombos (DREVRIESE et al., 2005; BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012; MILLER et al., 2013).

Assim como *S. aureus*, *S. pseudintermedius* produz uma variedade de fatores de virulência, incluindo as enzimas coagulase, termonuclease e protease, proteínas de superfície, tais como fatores de fragmentação e proteína A, além de citotoxinas, toxinas esfoliativas e enterotoxinas (FUTAGAWA-SAITO, et al., 2006; WLADYKA et al., 2008). Somado a isso, *S. pseudintermedius* tem a capacidade de formar biofilmes, o que pode tornar os tratamentos ainda mais difíceis (FUTAGAWA-SAITO et al., 2006). O agrupamento nessas comunidades fornece à bactéria marcante alteração metabólica, melhorando a comunicação célula-célula, tornando-a mais eficiente em escapar da resposta imune do

hospedeiro e dos efeitos dos antimicrobianos, tanto pelo seu metabolismo isolado como pela proteção física e química dada pela matriz de biofilme (MONTANARO et al., 2002; COSTERTON, 2005).

*S. pseudintermedius* é a bactéria mais isolada nos casos de piodermite nos cães, sendo frequentemente identificada nas orelhas e feridas infeccionadas, podendo ser um complicador na resposta imunomoduladora (BREATHNACH et al., 2005; RUSCHER et al., 2009). Adicionalmente, também é a espécie de *Staphylococcus* mais isolada em infecções do trato urinário de cães (RUBIN; GAUNT, 2011). Em trabalho realizado por Botoni et al. (2016), 91% das bactérias isoladas de pele e narinas de cães com piodermite eram *S. pseudintermedius* e Scherer et al. (2018) trabalhando com isolados de secreção de orelhas de cães com infecção clínica determinaram *S. pseudintermedius* como agente mais prevalente, totalizando 63% dos casos.

### **3.3 *S. pseudintermedius* e virulência**

Semelhante ao que acontece com *S. aureus* em humanos, a própria colonização pode ser um fator de risco para que a infecção ocorra, e cães acabam infectados pelas próprias colônias residentes em seu corpo. Assim sendo, infecções causadas por *S. pseudintermedius* geralmente não são transmitidas por contato direto entre cães doentes e saudáveis (FAZAKERLEY et al., 2010).

A participação de proteínas ligadoras de superfície, vem sendo descrita com muita relevância em amostras clínicas de MRSA, dentre elas, estão as proteínas ligadoras de fibronectina dos tipos A e B (MCCOURT et al., 2014). Essas proteínas expressas pelas bactérias são reconhecidas como importantes fatores de adesão e sua ação é essencial como primeiro e decisivo passo no estabelecimento de um biofilme bacteriano (COSTERTON et al., 1999). Em geral, esses fatores são denominados componentes de superfície microbiana reconhedores de moléculas de matriz adesiva (MSCRAMMs), tendo a capacidade de aderir à matriz proteica extracelular do hospedeiro, incluindo fibrinogênio, fibronectina, colágeno, vitronectina e laminina (COSTERTON et al., 1999; GRANGER, 2005).

Os genes *fnbA* e *fnbB* codificam proteínas de ligação à fibronectina (HEILMANN et al., 1996; ARCIOLA et al., 2015), sendo esses genes já identificados em várias espécies de bactérias do gênero *Staphylococcus* (VENGADESAN; STHANAM, 2011). A proteína FnbA é essencial para a internalização das bactérias na célula hospedeira, enquanto FnbB estimula a fagocitose bacteriana; essas proteínas são codificadas a partir dos genes *fnbA* e *fnbB*, respectivamente (DOWD et al., 2008). Estudo realizado por Yousef et al. (2016) constatou que comparado ao *S. aureus*, *S. pseudintermedius* foi a única espécie que aderiu significativamente à fibronectina humana, estando também associado a alta (até superior ao *S. aureus*) capacidade de internalização, persistência intracelular e citotoxicidade.

Outro fator que interfere na virulência é a leucotoxina conhecida como *Luk-I* que é codificada por dois genes *luk S/F*, que são frequentemente identificados em *S. pseudintermedius*. Essa leucotoxina é bastante similar a leucotoxina Pantón-Valentine leucocidina (PVL) produzida por *S. aureus*, que é uma leucotoxina biocompetente que determinará a formação de poros nos leucócitos causando sua destruição e necrose tecidual. A transmissão de PVL via *S. aureus* entre humanos e cães já foi reportado em uma família (VAN DUIJKEREN et al., 2005). Em humanos, infecções por *S. aureus* PVL positivos tendem a ser bem mais severas do que aquelas PVL negativos, porém tal fato ainda não foi totalmente elucidado para *S. pseudintermedius*, pois estudos com cães doentes realizados na Suíça (DESCLOUX et al., 2008) e na Bélgica (BARDIAU et al., 2013), mostraram que nenhuma amostra foi positiva para PVL. Em contrapartida, GHARSA et al. (2013) encontraram elevado percentual de cepas de *S. pseudintermedius* PVL positivas (98,2%), em cães doentes, mas não correlacionaram a gravidade da doença com a presença do PVL.

### **3.4 Resistência aos antimicrobianos**

O uso de agentes antimicrobianos tem por função diminuir as taxas de morbidade e mortalidade, aliviar os sinais clínicos e prevenir que a infecção se espalhe. A deterioração clínica e a morte podem ocorrer caso o tratamento seja incorreto ou inadequado. A rápida e completa morte da bactéria tem importância

clínica, principalmente em pacientes com infecção moderada a grave, e assim, busca-se tempo mais reduzido de terapia e diminuição da probabilidade de recaída ou recorrência da infecção no intuito de minimizar a ocorrência de resistência (BLONDEAU, 2013).

O uso responsável dos antimicrobianos em animais de companhia deve ser uma prática rotineira, pois pode ser o único meio de cura para determinadas doenças. O uso excessivo dessas medicações pode trazer implicações graves, e portanto, o uso de antimicrobianos deve ocorrer apenas quando estritamente necessário (PANKEY; SABATH, 2004; BLONDEAU et al., 2012). A prática da administração excessiva e/ou de maneira incorreta desses fármacos é um dos motivos da crescente ocorrência de resistência antimicrobiana havendo a necessidade de conscientização para o uso mais adequado e racional, com avaliação da droga correta, da dose e do tempo de administração (HERATH; BLONDEAU, 2012).

Os antimicrobianos mais utilizados para tratamento de infecções de pele em cães e gatos incluem as penicilinas, cefalosporinas, fluorquinolonas, lincosaminas e tetraciclina. As cefalosporinas de primeira e terceira geração são geralmente as primeiras opções ao tratamento, e a doxicilina (ou minociclina) e as fluorquinolonas são considerados como segunda opção. Como antimicrobianos de terceira escolha estão a linezolida, teicoplanina e vancomicina, porém o uso desses deve ficar reservado aos humanos (HILLIER et al., 2014).

### **3.4.1 Resistência à meticilina (MRSP)**

*Staphylococcus pseudintermedius* meticilina resistente (MRSP) emergiu como um grande desafio para veterinários de pequenos animais, em especial veterinários dermatologistas, devido a sua extensa resistência às drogas e a sua capacidade de causar infecções nosocomiais (FRANK; LOEFFLER, 2012). Essa espécie é isolada de cães com frequência cada vez maior e também é apontada como causadora de infecções em humanos (FITZGERALD, 2009; KADLEC et al., 2010; van DUIJKEREN et al., 2011; SOMAYAJI et al., 2016). Alguns fatores de risco têm sido propostos para a infecção e disseminação do MRSP, incluindo hospitalização e antibioticoterapia, fatores típicos para outros patógenos

adquirirem multirresistência a drogas (HUERTA et al., 2011; NIENHOFF et al., 2011).

A presença do gene *mecA* mostrou ser fator de resistência de *S. aureus* para a meticilina e todos os outros antibióticos do grupo  $\beta$ -lactâmicos, incluindo as cefalosporinas e carbapenêmicos (CHAMBERS, 1997). O reconhecimento da ampla resistência aos  $\beta$ -lactâmicos mediado pelo gene *mecA*, tem grande importância para a medicina humana pois essa classe de antimicrobianos é muito utilizada e eficaz em infecções por *S. aureus* susceptíveis à meticilina (MSSA) e também, por MRSA frequentemente adquirir resistência adicional múltipla com relevância clínica, dificultando e prolongando o tratamento de infecções em humanos (HARBARTH et al., 2008).

O gene *mecA* decodifica a proteína alternativa de ligação à penicilina PBP2a (ZDOVC et al., 2004; DESCLOUX et al., 2008) e está localizado em um elemento genético móvel no cassete cromossomal *mec* (SCCmec) dos *Staphylococcus*, porém os tipos de SCCmec presentes no MRSP são diferentes dos identificados no MRSA. Assim, a resistência de *S. pseudintermedius* a meticilina pode acontecer independente da presença deste gene (KANIA et al., 2004; EPSTEIN et al., 2009), situação incomum em MRSA, e acontece por uma superprodução de  $\beta$ -lactamase ou pela modificação dos PBPs nativos nos isolados *mecA*-negativos. Assim sendo, a presença de *mecA* ou PBP2a algumas vezes requer confirmação laboratorial, como por exemplo, nos casos de investigações epidemiológicas (FRANK; LOEFFLER, 2012).

#### **3.4.2 Resistência à outras drogas (multirresistência)**

Estudo realizado em 103 isolados de MRSP na América do Norte e Europa, mostrou que 90% das cepas possuía resistência adicional, além dos  $\beta$ -lactâmicos, a outras drogas como a ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, kanamicina, estreptomicina e trimetopim, sendo observada também resistência a gentamicina e tetraciclina em 70% dos casos e ao cloranfenicol em 57% (PERRETEN et al., 2010). Uma coletânea de 72 isolados de diferentes regiões da Alemanha mostrou taxas cada vez mais altas de resistência, sendo 97,8% das amostras resistentes a fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e macrolídeos (RUSCHER et al., 2009). Em estudo realizado no Brasil, BOTONI et al. (2016)

observaram que 28% das cepas de *S. pseudintermedius* coletadas de cães com piodermite apresentaram resistência simultânea a seis ou mais drogas e Scherer et al. (2018) determinaram que 59,1% das cepas de *S. pseudintermedius* eram multirresistentes.

Com relação a resistência aos macrolídeos e a lincosamina, cinco diferentes genes foram identificados em *S. pseudintermedius* e grupo SIG, entre eles estão o gene *Inu(A)*, que decodifica lincosamina nucleotídeo-transferase, o gene *mrs(A)* que decodifica o “transportador ABC” que pode exportar os antimicrobianos estreptogramina B e macrolídeos, e os genes *erm(A)*, *erm(B)* e *erm(C)*, que decodificam rRNA metilases, que combinadas, conferem resistência aos macrolídeos, lincosaminas e estreptogramina B (BOERLIN et al., 2001; LUTHJE; SCHWARZ, 2007). Na Europa e na América do Norte, o *erm(B)* têm sido o único gene de resistência a macrolídeos-lincosamina identificados em cepas MRSP isoladas de cães e gatos (PERRETEN et al., 2010).

#### **4. Implicações zoonóticas**

Estudos sobre aderência e colonização tem indicado que *S. pseudintermedius* preferencialmente coloniza a pele dos cães (DEVRIESE et al., 2005), enquanto *S. aureus* se instala na pele do homem (PEACOCK et al., 2001). Contudo, o potencial zoonótico do *S. pseudintermedius* ganhou destaque há mais de 50 anos, quando *Staphylococcus* sp isolados de caninos e felinos revelaram-se idênticos aos dos humanos (MANN, 1959; ADEKEYE, 1981). Desde então, os relatos de infecções em humanos causadas por MRSP vêm aumentando em todo o mundo, sendo relatadas em feridas causadas por mordidas, por outras infecções de pele, além de otite externa, sinusite, bacteremia relacionada ao uso de cateter, pneumonia e abscesso cerebral (TALAN et al., 1989; BARNHAM; HOLMES, 1992; KEMPKER et al., 2009).

Outros autores descreveram infecções severas por *S. pseudintermedius* em pacientes idosos que utilizavam dispositivos cardíacos e em uma criança hemofílica que utilizava cateter (KEMPKER et al., 2009; STEGMANN et al., 2010). Em todos os casos foi confirmado o contato próximo dos infectados com cães. Em outro caso, *S. pseudintermedius* foi isolado de um abscesso de uma

pessoa que fazia uso de droga imunossupressora e que não teve contato algum com cães, sugerindo então, que ele mesmo seria o carreador da bactéria (KELESIDIS; TSIODRAS, 2010).

Somayaji et al. (2016) relataram 24 casos de infecções em humanos por *S. pseudintermedius* que aconteceram entre os anos de 2013 e 2015, onde 92,1% dos envolvidos haviam tido contato com cães durante o aparecimento das lesões. A maior parte dos casos estavam relacionados com lesões de pele ou de tecidos moles (70%) e os demais foram contaminações de próteses e infecção na corrente sanguínea. Baseados nesses achados, os autores concluíram que a transmissão de *S. pseudintermedius* para o homem acontece principalmente pelo contato com o cão.

Estudo conduzido por Guardabassi et al. (2004) determinou por meio de análises por PFGE, que proprietários de cães que apresentaram piodermite profunda, frequentemente carregavam o mesmo *S. pseudintermedius* que seus cães. Outros estudos sugerem fortemente a transmissão de MRSP de cães para seus proprietários (VINCZE et al., 2010; SOEDARMANTO et al., 2011) e para equipe de hospitais veterinários (PAUL et al., 2011).

Outro estudo também empregou técnicas filogenéticas (PFGE) e determinou que *S. pseudintermedius* isolados de humanos tinham a mesma origem, ou pelo menos, eram muito próximas, sugerindo uma transmissão zoonótica do cão para o homem (BANNOEHR et al, 2007). Contudo, acredita-se que os humanos não são permanentemente colonizados por *S. pseudintermedius*, e este micro-organismo não faz parte naturalmente da microbiota nasofaríngea. Apesar disso, humanos podem tornar-se carreadores caso mantenham contato direto com cães infectados (HANSELMAN et al., 2009; De MARTINO et al., 2010; Van DUIJKEREN et al., 2011).

A ocorrência de *S. pseudintermedius* em humanos é provavelmente subestimada, pois na maioria dos laboratórios os isolados com capacidade de produzir a enzima coagulase são identificados erroneamente como *S. aureus* (POTTUMARTHY et al., 2004).

## 5. Referências bibliográficas

ADEKEYE, J.D. Studies on possible cross transmission of mercuric chloride resistant *Staphylococcus aureus* between dogs and kennel attendants. **The International Journal of Zoonoses**, v.8, p.72–76, 1981.

ARCIOLA, C. et al. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. **Frontiers in Cellular and Infectation Microbiology**, v.5, p.7, 2015.

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, p.8685–8692, 2007.

BANNOEHR, J. et al. Genomic and surface proteomic analysis of the canine pathogen *Staphylococcus pseudintermedius* reveals proteins that mediate adherence to the extracellular matrix. **Infection and Immunity**, v.79, p.3074–3086, 2011.

BANNOEHR, J.; GUARDABASSI, L. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. **Veterinary Dermatology**, v.23, p.253–66, 2012.

BARDIAU, M. et al. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs and cats. **Microbiology and Immunology**, v.57, n.7, p.496–501, 2013.

BARNHAM, M.; HOLMES, B. Isolation of CDC group M-5 and *Staphylococcus intermedius* from infected dog bites. **Journal of Infection**, v.25, p.332–334, 1992.

BLONDEAU, J.M. et al. In vitro killing of *Escherichia coli*, *Staphylococcus pseudintermedius* and *Pseudomonas aeruginosa* by enrofloxacin in combination with its active metabolite ciprofloxacin using clinically relevant drug concentrations in the dog and cat. **Veterinary Microbiology**, v.155, p.284–290, 2012.



BLONDEAU, J.M. Gram-negative superbugs: inappropriate antimicrobial therapy and mortality. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v.6, p.347–349, 2013.

BOERLIN, P. et al. Molecular epidemiology and genetic linkage of macrolide and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus intermedius* of canine origin. **Veterinary Microbiology**, v.79, p.155–169, 2001.

BOTONI, L. S. et al. Prevalence and *in vitro* susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) from skin and nostrils of dogs with superficial pyoderma. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.36, n.12, p.1178-1180, 2016.

BREATHNACH, R.M. et al. Clinical, immunological and histopathological findings in a subpopulation of dogs with pododermatitis. **Veterinary Dermatology**, v.16, p.364–372, 2005.

CHAMBERS, H.F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical Microbiology Review**, v.10, p.781–791, 1997.

CHUANG C. et al. Catheter-related bacteremia caused by *Staphylococcus pseudintermedius* refractory to antibiotic-lock therapy in a hemophilic child with dog exposure. **Journal of Clinical Medicine**, v.48, p.1497–8, 2010.

CLAESSON M.J. et al. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16SrRNA gene regions. **Nucleic Acids Research**, v.38, e200, 2010.

CLEMENTE J.C. et al. The microbiome of uncontacted Amerindians. **Science Advances**, v.1: e1500183, 2015.

COSTERTON, J.; STEWART, P.; GREENBERG, E. Bacterial Biofilms: a common cause of persistent infection. **Science**, v.284, p.1318- 1322, 1999.

COSTERTON, J.W. Biofilm theory can guide the treatment of device-related orthopedic infections. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v.437, p.7–11, 2005.

DE MARTINO, L. et al. Methicillin-resistant staphylococci isolated from healthy horses and horse personnel in Italy. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.22, p.77–82, 2010.

DESCLOUX, S.; ROSSANO, A.; PERRETEN, V. Characterization of new staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) and topoisomerase genes in fluoroquinolone- and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, p.1818–1823, 2008.

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

DOWD, S. et al. Survey of bacterial diversity in chronic wounds using pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. **BMC Microbiology**, v.8, n.1, p.43, 2008.

EPSTEIN, C.R. et al. Methicillin-resistant comensal staphylococci in healthy dogs as a potential zoonotic reservoir for community-acquired antibiotic resistance. **Infection, Genetics and Evolution**, v.9, p.283–285, 2009.

FAZAKERLEY, J. et al. Heterogeneity of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from atopic and healthy dogs. **Veterinary Dermatology**, v.21, p.578–585, 2010.

FITZGERALD, J. The *Staphylococcus intermedius* group of bacterial pathogens: species reclassification, pathogenesis and the emergence of methicillin resistance. **Veterinary Dermatology**, v. 5–6, p.490–5, 2009.

FRANK, L.A.; LOEFFLER, A. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: clinical challenge and treatment options **Veterinary Dermatology**, v.23, p.283–e56, 2012.

FUTAGAWA-SAITO, K. et al. Prevalence of virulence factors in *Staphylococcus intermedius* isolates from dogs and pigeons. **BMC Veterinary Research**, v.2, p.4, 2006.

GHARSA, H. et al. Antimicrobial resistance, virulence genes, and genetic lineages of *Staphylococcus pseudintermedius* in healthy dogs in Tunisia. **Microbial Ecology**, v.66, p.363–368, 2013.

GRANGER, J. La placa dental como biofilm ¿cómo eliminarla? **Revista del ilustre Consejo general de Odontólogos y Estomatólogos de España**, v.10, p.431-439, 2005.

GUARDABASSI, L.; LOEBER, M.E.; JACOBSON, A. Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. **Veterinary Microbiology**, v.98, p.23–27, 2004.

HAJEK, V. *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from animals. **International Journal of Systematic and Bacteriology**, v.26, p.401–408, 1976.

HANSELMAN B.A. et al. Coagulase positive staphylococcal colonization of humans and their household pets. **Canadian Veterinary Journal**, v.50, p.954–958, 2009.

HARBARTH, S. et al. Risk factors for methicillin resistant *Staphylococcus aureus* surgical site infection. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.29; p.890–893, 2008.

HEILMANN, C. et al. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. **Molecular Microbiology**, v.20, p.1083-1091, 1996.

HERATH, C.; BLONDEAU, J.M. Do we really understand what we want or need out of antimicrobial stewardship programs? **Clinical Practice**, v.10, p.5–9, 2012.

HILLIER, A. et al. Guidelines for the diagnosis and antimicrobial therapy of canine superficial bacterial folliculitis (Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases). **Veterinary Dermatology**, v.25, p.163–175, 2014.

HOFFMAN, AR. The cutaneous ecosystem: the roles of the skin microbiome in health and its association with inflammatory skin conditions in humans and animals. **Veterinary Dermatology**, v.28, p.60–e15, 2017.

HUERTA, B. et al. Risk factors associated with the antimicrobial resistance of staphylococci in canine pyoderma. **Veterinary Microbiology**, v.150, p.302–308, 2011.

KADLEC, K. et al. Molecular analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* of feline origin from different European countries and North America. **Journal of Antimicrobial Chemother**, v.65, p.1826–1828, 2010.

KANIA, A.S. et al. Methicillin resistance of staphylococci isolated from the skin of dogs with pyoderma. **American Journal of Veterinary Research**, v.65, p.1265–1268, 2004.

KELESIDIS, T.; TSIODRAS, S. *Staphylococcus intermedius* is not only a zoonotic pathogen, but may also cause skin abscesses in humans after exposure to saliva. **International Journal of Infection Disiases**, v.14, e838–e841, 2010.

KEMPKER, R. et al. Beware of the pet dog: a case of *Staphylococcus intermedius* infection. **The American Journal of Medical Science**, v.338, p. 425–427, 2009.

KWON, N. et al. Characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from chicken meat and hospitalized dogs in Korea and their epidemiological relatedness. **Veterinary Microbiology**. v.117, p.304–312, 2006.

LUTHJE, P.; SCHWARZ, S. Molecular basis of resistance to macrolides and lincosamides among *staphylococci* and *streptococci* from various animal sources collected in the resistance monitoring program BfT-GermVet. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.29, p. 528–535, 2007.

MANN, P.H. Antibiotic sensitivity testing and bacteriophage typing of *staphylococci* found in the nostrils of dogs and cats. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.134, p.469–470, 1959.

MARCHESI, J.R.; RAVEL, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. **Microbiome**, v.3, p.31, 2015.

MCCOURT, J. et al. Fibronectin-binding proteins are required for biofilm formation by community- associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain LAC. **FEMS Microbiology letters**, v. 353, n.2, p.157-64,2014.

MEISEL, J.S. et al. Skin microbiome surveys are strongly influenced by experimental design. **Journal of Investigative Dermatology**, v.136, p. 947–956, 2016.

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

MONTANARO, L. et al: Scenery of *Staphylococcus* implant infections in orthopedics. **Future Microbiology**, v.6, p.1329–1349, 2002.

NIENHOFF, U. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* among dogs admitted to a small animal hospital. **Veterinary Microbiology**, v.150, p.191–197, 2011.

OSLAND, A.M. et al: Clonal diversity and biofilmforming ability of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **Journal of Antimicrobial Chemother**, v.67, p.841–848, 2012.

PANKEY, G.A.; SABATH, L.D. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. **Clinical Infection Diseases**, v.38, p.864–870, 2004.

PAUL, N.C. et al. Lack of MRSP detection in healthy dogs attending a Danish referral hospital, in Poster Abstract 44. 2nd ASM-ESCMID Conference on Methicillin-resistant Staphylococci in Animals. **Veterinary and Public Health Implications**, v.61, 2011.

PAUL, N. et al. *Staphylococcus pseudintermedius* colonization patterns and strain diversity in healthy dogs: A cross-sectional and longitudinal study. **Veterinary Microbiology**, v.160, 2012.

PAUL, N.C. et al. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in small animal veterinarians: indirect evidence of zoonotic transmission. **Zoonoses and Public Health**, v.58, p.533–539, 2011.

PEACOCK, S.J.; DE SILVA, I.; LOWY, F.D. What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? **Trends in Microbiology**, v.9, p.605–610, 2011.

PERRETEN, V. et al. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. **Journal of Antimicrobial Chemother**, v.65, p.1145–1154, 2010.

PINCHBECK, L.R. et al. Genotypic relatedness of *Staphylococcal* strains isolated from pustules and carriage sites in dogs with superficial bacterial folliculitis. **American Journal of Veterinary Research**, v.67, p.1337–1346, 2006.

POTTUMARTHY, S. et al. Clinical isolates of *Staphylococcus intermedius* masquerading as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p.5881–4, 2004.

RUBIN, J.; CHIRINO-TREJO, M. Prevalence, sites of colonization, and antimicrobial resistance among *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from healthy dogs in Saskatoon, Canada. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.23, p.351–4, 2011.

RUBIN, J.E.; GAUNT, M.C. Urinary tract infection caused by methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a dog. **Canadian Veterinary Journal**, v.52, p.162–164, 2011.

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. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. **Journal of Clinical Medicine**, v.45, p.2770–8, 2007.

SASAKI, T. et al. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v.48, n.3, p.765-769, 2010

SAVINI, V. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a bone marrow transplant recipient. **Journal of Clinical Microbiology**, v.51, p.1636, 2013.

SCHERER, C.B. et al. Frequency and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus pseudintermedius* in dogs with otitis externa. **Ciência Rural**, v.48, p.04, 2018.

SCHWARZ, S.; KADLEC, K.; STROMMINGER, B. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* detected in the BfT-GermVet monitoring programme 2004–2006 in Germany. **Journal of Antimicrobial Chemother**, v.61, p.282–5, 2008.

SOEDARMANTO, I. et al. Genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) isolated from a dog and the dog owner. **Research in Veterinary Science**, v.91, e25–e27, 2011.

SOMAYAJI, R.; PRIYANTHA, M.A.R.; RUBIN, J.E.D. Human infections due to *Staphylococcus pseudintermedius*, an emerging zoonosis of canine origin: report of 24 cases. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.85, p.471–476, 2016.

SONG, S.J. et al. Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. **Elife** 2013; v.2, e00458..

STEGMANN, R.B.A.; MARANTA, C.A.; PERRETEN, V. Human infection associated with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71. **Journal of Antimicrobial Chemother**, v.65, p.2047–8, 2010.

TALAN, D.A. et al. *Staphylococcus intermedius*: clinical presentation of a new human dog bite pathogen. **Annals of Emergency Medicine**, v.18, p.410–413, 1989.

VAN DUIJKEREN, E. et al. Methicillin-resistant staphylococci isolated from animals. **Veterinary Microbiology**, v.103, p.91–7, 2004.

VAN DUIJKEREN, E. 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, 2011.

VAN DUIJKEREN, E. et al. Transmission of a Panton–Valentine Leucocidin positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain between humans and a dog. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.6209-6211, 2005.

VENGADESAN, K.; STHANAM, N. Structural biology of Gram- positive bacterial adhesins. **Protein Science**, v.20, p.759-772, 2011.

VINCZE, S. et al. Multidrug- and methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* as a cause of canine pyoderma: a case report. **Berl Much Tieraztl Wochenschr**, v.123, p. 353–358, 2010.

WEESE, J.S. The canine and feline skin microbiome in health and disease. **Veterinary Dermatology**, v.24, p.137–145, 2013.

WERTHEIM, H.F. et al. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v.5, p.751–762, 2005.

WLADYKA, B. et al. A novel member of the thermolysin family, cloning and biochemical characterization of metalloprotease from *Staphylococcus pseudintermedius*. **Acta Biochimica Polonica**, v.55, p.525–536, 2008.

ZDOVC, I. et al. Microbiological features of *Staphylococcus schleiferi* subsp. coagulans, isolated from dogs and possible misidentification with other canine coagulase-positive staphylococci. **Journal of Veterinary Medicine Series B**, v.51, p.449–454, 2004.



**CAPÍTULO II – Análise temporal (2016-2018) do perfil de resistência aos  
antimicrobianos de isolados clínicos de cães**

Artigo a ser publicado na revista **Plos One**

## **Análise temporal (2016-2018) do perfil de resistência aos antimicrobianos de isolados clínicos de cães**

**Christina Resende Martins<sup>1\*</sup>, Newton Medeiros Vidal<sup>2</sup>, Edmar Donizete Mundim<sup>3</sup>, Thaís Karine Silva<sup>3</sup>, Daise A. Rossi<sup>1</sup>, Ana Laura Grazziotin<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Laboratório de Biotecnologia Animal Aplicada, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil

<sup>2</sup>Pesquisador independente, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil

<sup>3</sup>Laboratório Laborvetri, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil

\*Correspondência encaminhada para Prof. Dra. Ana Laura Grazziotin (analaugrazziotin@gmail.com) e/ou para a MSc. Christina Resende Martins (chrisresende@hotmail.com)

### **RESUMO**

Estudos de vigilância bacteriológica precisam ser realizados continuamente devido à capacidade das bactérias desenvolverem mecanismos de resistência aos antimicrobianos. A vigilância em ambientes veterinários permite a investigação da incidência de linhagens multirresistentes e antever a possibilidade de transmissão cruzada entre seres humanos e animais domésticos. Objetivou-se avaliar a prevalência de espécies bacterianas isoladas de amostras clínicas de cães e seu perfil de resistência aos antimicrobianos sob uma perspectiva temporal. Um total de 698 amostras clínicas de cães enviadas a um laboratório privado de 2016 a 2018 foram analisadas por métodos de cultura, identificação bioquímica e por um painel de mais de 30 antimicrobianos distintos no antibiograma. Dentre as 586 amostras positivas, 29 espécies foram identificadas, sendo *Staphylococcus* coagulase positiva (47,26%) a mais prevalente. As amostras mais frequentes (>80%) foram secreção de orelha, urina e pele, sendo *Staphylococcus* coagulase positiva as mais predominantemente

isoladas em orelha e pele; e *Escherichia coli* em urina. Ao longo dos três anos consecutivos foi observado um aumento significativo ( $p < 0.05$ ) no número de isolamentos de *Staphylococcus* coagulase positiva resistentes à ceftiofur, ceftriaxona, enrofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin, marbofloxacin, associação amoxicilina-clavulanato e polimixina B, enquanto uma tendência oposta ( $p < 0.05$ ) foi observada para azitromicina e tobramicina. O perfil de multirresistência predominante entre os isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva (26 isolados) compreendeu macrolídeos (azitromicina), quinolonas (ciprofloxacin, enrofloxacin, marbofloxacin) e penicilinas (ampicilina, penicilina G). Em face ao perfil de resistência observado ao longo dos anos, a realização de testes de sensibilidade mostra-se necessária para guiar a escolha do tratamento veterinário mais adequado. Estudos prospectivos como este permitem avaliar a progressão da resistência em uma determinada localidade a fim de contribuir para as medidas de controle mais efetivas.

**Palavras-chave:**

*Escherichia coli*, pele, resistência bacteriana, *Staphylococcus* coagulase positiva, otite

**ABSTRACT**

Bacteriological surveillance studies need to be carried out continuously due to the bacteria's ability to develop resistance mechanisms to antimicrobials. Surveillance in veterinary environments allow investigation of the incidence of multidrug-resistant strains and foreseeing the possibility of cross-transmission between humans and domestic animals. The objective was to evaluate the prevalence of bacterial species isolated from clinical samples of dogs, and their resistance profile to antimicrobials from a temporal perspective. A total of 698 clinical samples of dogs sent to a private laboratory from 2016 to 2018 were analyzed by culture methods, biochemical identification and by a panel of more than 30 different antibiotics in the antibiogram. Among the 586 positive samples, 29 species were identified, with coagulase positive staphylococci (47.26%) being the most prevalent. The most frequent samples (> 80%) were ear, urine and skin secretion, with coagulase positive staphylococci being the most predominantly

isolated in ear and skin, and *Escherichia coli* in urine. Over the three consecutive years, a significant increase ( $p < 0.05$ ) was observed in the number of coagulase-positive staphylococcus isolates resistant to ceftiofur, ceftriaxone, enrofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin, marbofloxacin, amoxicillin-clavulanate and polymyxin B association, while a opposite tendency ( $p < 0.05$ ), was observed for azithromycin and tobramycin. The predominant multiresistance profile among coagulase positive staphylococcus isolates (26 isolates) comprised macrolides (azithromycin), quinolones (ciprofloxacin, enrofloxacin, marbofloxacin) and penicillins (ampicillin, penicillin G). In view of the resistance profile observed over the years, the performance of sensitivity tests is necessary to guide the choice of appropriate veterinary treatment. Prospective studies like this one allow evaluations on the progression of resistance in each location, in order to contribute to the most effective control measures.

**Keywords:** *Escherichia coli*, skin, bacterial resistance, coagulase positive staphylococci, otitis.

## INTRODUÇÃO

Os estudos de vigilância bacteriológica são de grande utilidade para determinar as tendências de sensibilidade ou resistência antimicrobiana. Tais estudos precisam ser realizados continuamente devido à capacidade dos micro-organismos desenvolverem variados mecanismos de resistência aos antimicrobianos como resultado da pressão seletiva ao longo do tempo [1].

A resistência bacteriana tem sido uma preocupação na comunidade médica humana e veterinária por se tratar de um problema complexo, envolvendo várias espécies de bactérias patogênicas, não patogênicas, nosocomiais, ambientais, e os mais variados mecanismos de resistência aos antimicrobianos [1,2]. Desse modo, a seleção empírica de um antimicrobiano para ser utilizado na rotina do tratamento clínico deve ser evitada [3], pois poderá ser ineficaz se o agente infeccioso já apresentar resistência ao antimicrobiano escolhido, ou ainda, poderá levar a seleção de cepas resistentes.

Os animais portadores de bactérias resistentes podem atuar como reservatórios na transmissão desses agentes para os humanos [4,5,6,7,2]. Em particular, os cães e os gatos representam uma fonte potencial para a difusão de bactérias resistentes devido ao amplo uso dos antimicrobianos na rotina veterinária, assim como, pelo contato próximo entre os animais de companhia e humanos. A transmissão de bactérias multirresistentes entre animais de estimação e seus tutores foi demonstrada previamente [8,9,10]. Além disso, indivíduos que compartilham um mesmo ambiente tendem a apresentar microbiotas similares e por isso, cães e tutores influenciam na microbiota um do outro [11,12,13]. Devido ao contato próximo entre cães e tutores, e justamente por já ter sido demonstrada a possibilidade de modulação entre suas microbiotas, a investigação do perfil de resistência das bactérias que acometem os cães serve como uma ferramenta de vigilância para: i) a identificação de novos padrões de resistência bacteriana em animais domésticos ao longo do tempo e ii) a potencial circulação e disseminação das cepas resistentes no ambiente e na comunidade.

Objetivou-se determinar o perfil de resistência aos antimicrobianos de bactérias isoladas de cães com infecções clínicas, analisados ao longo de um período de aproximadamente três anos consecutivos, bem como, avaliar a dinâmica dos padrões de resistência ao longo do período estudado.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### *Amostras e local do estudo*

De janeiro de 2016 a novembro de 2018, um total de 698 amostras consecutivas provenientes de cães foram enviadas a um laboratório veterinário particular para realização de cultura e teste de susceptibilidade aos antimicrobianos. Destas, 586 (83,9%) foram positivas para algum tipo de bactéria. As análises de rotina compreendiam amostras de osso (2), pele (76), urina (169), orelhas (238), fezes (6), olho (32), líquido prostático (3), lavado traqueal (1), líquido abdominal (4) secreção nasal (23), boca (1) secreção vaginal (6), secreção peniana (1), ferida cirúrgica (22) e líquido torácico (2), que foram

coletadas por veterinários seguindo as orientações do laboratório para cada local de coleta e enviadas no mesmo dia para serem processadas. O laboratório veterinário escolhido para o estudo é um dos maiores laboratórios privados na cidade de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil e recebe amostras de cerca de 80 clínicas veterinárias da região.

### *Processamento das amostras*

Amostras líquidas (urina, líquido, líquido torácico e líquido prostático) eram imediatamente semeadas em ágar Cled (K25-610012, Kasvi®, Paraná, Brasil) a 37°C por 24-48 horas para diferenciação entre fermentadores e não fermentadores de lactose. As colônias obtidas eram submetidas a coloração de Gram.

Bactérias Gram-positivas eram ressemeada em (i) ágar Sal Manitol (K25-610029, Kasvi®, Paraná, Brasil) para o isolamento de estafilococos patogênicos e em (ii) ágar Bile Esculina (K25-610210, Kasvi®, Paraná, Brasil), que é um meio diferencial para isolamento de estreptococos do grupo D. Colônias características de *Streptococcus* spp. eram repicada em ágar sangue (Kasvi®) para identificar hemólise alfa, beta ou gama.

Bactérias Gram-negativas eram identificadas pelo Sistema Bactray I e II (Laborclin®, Paraná, Brasil).

As amostras de secreções (pele, orelhas, fezes, vaginal, nasal e ocular) coletadas com swab estéril e armazenadas em meio de Stuart (Absorve®, São Paulo, Brasil) eram diretamente semeadas em ágar sangue (Kasvi®) e após incubação, as colônias eram submetidas a coloração de Gram.

Cocos Gram-positivos eram ressemeados em agar Baird Parker - BP (CM1127, Oxoid™, Basingstoke, Reino Unido) para isolamento de *Staphylococcus* spp (Yang et al., 2017). Colônias típicas (cor negra com halo) eram submetidas aos testes de coagulase, novobiocina, catalase e manitol salgado.

Colônias na forma de bacilos Gram-negativos eram identificados pelo sistema de identificação Bactray I e II (Laborclin®).

### *Cultura e antibiograma*

Após a identificação, uma colônia da bactéria isolada era enriquecida em BHI (Oxoid®) a 37°C por 24 horas, e em seguida ressemeada em ágar Muller Hinton (Oxoid®) no qual distribuía-se os discos de antibióticos. O laboratório utilizou discos da marca DME® (São Paulo, Brasil) para antibióticos de uso humano e da marca Cefar® (São Paulo, Brasil) para os de uso exclusivo veterinário. A escolha dos antimicrobianos testados foi baseada em dados de sensibilidade da espécie bacteriana de acordo com a literatura e também de acordo com a solicitação do médico veterinário. A leitura dos halos para classificação de resistência ou sensibilidade foi realizada com base em tabela fornecida pelos fabricantes dos discos, que por sua vez, eram baseadas nos padrões estabelecidos pelo CLSI (2016). Após 24 horas de incubação em estufa a 37 °C, a leitura do diâmetro dos halos era realizada e o laudo confeccionado.

#### *Análise estatística*

Após a análise laboratorial das amostras, os seguintes dados foram tabulados para análise descritiva e estatística: ano de coleta da amostra, sexo do animal, idade do animal, clínica de origem, tipo de amostra coletada, espécie de bactéria isolada e identificada e perfil de resistência ou suscetibilidade para cada um dos antimicrobianos testados.

A análise descritiva foi realizada em ambiente estatístico R (<https://www.r-project.org/>). Os isolados que apresentaram resistência a drogas pertencentes a três classes distintas de antibióticos, simultaneamente, foram considerados isolados multirresistentes aos antibióticos.

A análise de variação temporal da resistência aos antibióticos foi realizada por meio do teste de Cochran-Armitage para tendência de proporções binomiais para os três períodos compreendidos no estudo (2016 a 2018). A análise de Cochran-Armitage foi realizada utilizando-se o pacote "DescTools" em ambiente estatístico RStudio [15]. O resultado foi considerado significativo quando  $p \leq 0.05$ .

## **RESULTADOS**

#### *Aspectos gerais*

Ao longo dos três anos avaliados foi observado um aumento de 90% no número de requisições para cultura e antibiograma pelos veterinários. Em 2016 foram requisitadas 143 análises, em 2017 foram 170 e em 2018 foram 273. As amostras de secreção de orelha (40,07%), amostras de urina (28,45%) e amostras de pele (12,79%) foram as mais solicitadas, correspondendo a mais de 80% dos exames de cultura e antibiograma realizados entre 2016 e 2018.

Das 689 amostras encaminhadas para cultura e antibiograma, 586 (83,9%) apresentaram crescimento e foram analisadas para a identificação da espécie e resistência aos antibióticos. No total, 29 espécies diferentes de bactérias foram isoladas e identificadas (Figura 1). *Estafilococos* coagulase positiva e *Escherichia coli* compreenderam mais de 50% dos isolados identificados, independentemente do tipo de material coletado.

O teste de susceptibilidade mostrou que mais de 50% dos isolados apresentaram resistência para 9, 10 e 18 antimicrobianos distintos em 2016, 2017 e 2018, respectivamente, sendo que esta frequência (mais de 50% dos isolados) foi sustentada ao longo dos três anos para os seguintes antibióticos: eritromicina, azitromicina, ampicilina, tetraciclina, clindamicina, associação sulfametoxazol com trimetoprim e cefadroxila.

A análise de tendência temporal foi realizada para os 25 antimicrobianos testados ao longo dos três anos (Tabela 1). Para oito antimicrobianos (cefadroxil, ceftiofur, ceftriaxona, enrofloxacin, ciprofloxacina, marbofloxacina, associação amoxicilina-clavulanato e polimixina B), foi observada tendência para o aumento ( $p < 0.05$ ) do número de isolados resistentes ao longo do tempo. Em contraste, para dois antibióticos (tobramicina e azitromicina) foi observada tendência oposta, ou seja, de diminuição do número de amostras resistentes ( $p < 0.05$ ).

Dos 586 isolados, 404 (68,94%) apresentaram perfil de multirresistência. Dentre estes, *Staphylococcus* coagulase positiva (43,81%) apresentaram o maior número de isolados multirresistentes.

#### *Amostras de urina*

Das 169 amostras de urina analisadas, foram identificadas 23 espécies bacterianas, com *Escherichia coli* (26,62%), *estafilococos* coagulase positiva



(17,75%) e *Proteus mirabilis* (12,42%) somando mais de 50% dos isolados identificados. Onze antibióticos foram testados nesses isolados no período de três anos. Para nove antibióticos foi observado perfil de resistência em mais de 50% dos isolados testados em, pelo menos, um dos três anos avaliados. A análise temporal de resistência apresentou tendência para o aumento ( $p<0.05$ ) do número de isolados resistentes apenas à enrofloxacinina ao longo do período de três anos (Tabela 2). Para nenhum antibiótico foi observada tendência temporal para a diminuição do número de isolados resistentes.

#### *Amostras de secreção de orelha e de pele*

As amostras de secreção de orelha corresponderam a maioria das amostras recebidas no laboratório (238 amostras ou 40% do total). Foram identificadas 17 espécies bacterianas diferentes, sendo que somente o gênero *Staphylococcus* representou 71,42% dos isolados identificados. Um total de 13 antibióticos foram testados para amostras de orelha, sendo que para seis drogas, o número de isolados resistentes foi superior a 50%. Dentre os antibióticos testados, apenas para tetraciclina, 66% a 75% dos isolados foram resistentes em cada um dos três anos avaliados, mas não foi observada tendência de aumento ( $p>0.05$ ) ao longo dos anos. A análise temporal revelou um aumento significativo ( $p<0.05$ ) para o número de isolados resistentes a polimixina B (Tabela 3).

As amostras de secreção de pele (piodermites) representaram o terceiro material mais enviado ao laboratório (76 amostras - 12,79%). Onze espécies bacterianas foram isoladas nas amostras de lesões cutâneas e novamente estafilococos coagulase positiva (73,91%) foram as predominantemente identificadas. Dentre os 10 antibióticos testados ao longo dos três anos em isolados de lesão de pele, para oito, o número de isolados resistentes foi superior a 50% em, pelo menos, um dos três anos. A enrofloxacinina foi o único antibiótico para o qual a análise temporal revelou aumento significativo ( $p<0.01$ ) no número de isolados resistentes (Tabela 4).

#### *Estafilococos coagulase positiva (ECP)*

Considerando todos os isolados identificados de todas as amostras analisadas, o gênero *Staphylococcus* foi o micro-organismo mais prevalente (301/586 - 51,44%), sendo 277 (92,02%) classificados como coagulase positiva (ECP).

O isolamento ECP foi predominante em amostras de pele (51/277- 18,41%), seguido por amostras de orelha (154/277- 55,59%) e de urina (30/277- 10,88%), que correspondem também aos materiais mais enviados para análise laboratorial. Um total de 40 antibióticos foram testados para os isolados dessas espécies ao longo dos três anos. Foi observado um aumento significativo ( $p < 0.05$ ) no número de isolados coagulase positiva resistentes a oito drogas (ceftiofur, ceftriaxona, enrofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin, marbofloxacin, associação amoxicilina-clavulanato e polimixina B) e diminuição significativa ( $p < 0.05$ ) no número de isolados resistentes para tobramicina e azitromicina (tabela 5). A comparação entre a análise temporal realizada considerando todos os isolados (tabela 1) e a análise realizada para os ECPs (tabela 5), revela apenas duas diferenças: i) a presença de norfloxacin dentre os antibióticos com tendência de aumento de resistência no grupo dos isolados ECPs, e ii) a presença de cefadroxil dentre os antibióticos com tendência ao aumento de resistência no grupo que incluía todos os isolados de *Staphylococcus*, coagulase positiva ou negativa.

Os antibióticos mais solicitados para o teste de antibiograma e para os quais mais de 50% dos isolados de ECPs apresentaram resistência foram: macrolídeo (azitromicina), quinolonas (marbofloxacin, ciprofloxacin e enrofloxacin) e penicilinas (penicilina G e ampicilina). Em contrapartida, dentre os antibióticos mais solicitados e para os quais foi observada susceptibilidade para mais de 50% desses isolados, encontram-se: tetraciclina (doxiciclina), aminoglicosídeos (tobramicina, neomicina e gentamicina), cefalosporina (cefovecina e cefalexina) e a associação amoxicilina-clavulanato.

Considerando o perfil de resistência a múltiplos antibióticos, 177/277 (63,89%) dos ECP foram considerados multirresistentes. O percentual foi mantido praticamente constante ao longo dos três anos (65,15% em 2016; 59,21% em 2017 e 65,93% em 2018). Por este motivo, embora a maior parte (>50%) dos isolados seja multirresistente, não foi observada tendência temporal

significativa para mudanças de aumento ou diminuição da resistência ( $p>0.05$ ). Por fim, o perfil de multirresistência mais prevalente, encontrado em 26/177 (14,69%) dos isolados multirresistentes, foi azitromicina, marbofloxacin, ciprofloxacina, enrofloxacin, penicilina G e ampicilina.

## DISCUSSÃO

### *Aspectos gerais*

Houve um crescimento gradual no número de exames requisitados pelos médicos veterinários quando comparamos os anos de 2016, 2017 e 2018. Entre os anos de 2016 e 2018 esse aumento foi de 90%. Tal situação pode ter ocorrido pela dificuldade de se instituir terapêutica antimicrobiana de forma empírica na clínica veterinária [4], uma vez que a incidência de resistência e multirresistência aos fármacos antimicrobianos vêm aumentando de forma importante. Esta situação é exemplificada pela identificação cada vez mais frequente de *S. pseudintermedius* metilina resistente – MRSP [16,17,18,19], *S. aureus* metilina resistente – MRSA [20] e *E. coli* resistente [1,21].

O uso frequente das drogas antimicrobianas tem sido apontado como um dos principais fatores para o surgimento e crescente aumento da resistência das bactérias a esses fármacos [2,6,7,22,23]. Neste estudo, as tendências temporais para o aumento do número de isolados resistentes foram apresentadas justamente para aqueles fármacos utilizados como de primeira ( $\beta$ -lactâmicos) e segunda escolha (quinolonas) para o tratamento de otites, piodermites e infecções do trato urinário (ITUs) em cães [24,25], que compreendem o grupo de amostras mais frequentes neste estudo.

Em contrapartida, surpreendentemente, observamos uma tendência temporal à diminuição do número de isolados resistentes a azitromicina e tobramicina. Nossos resultados contrastam com as observações de outros estudos. A circulação de clones resistentes e o desenvolvimento de resistência à azitromicina por isolados obtidos a partir de amostras de otites, infecções de pele, e principalmente, de infecções do trato urinário (ITUs) de cães e gatos, tem sido demonstrado *in vitro* [26]. Além disso, isolados obtidos de amostras veterinárias têm apresentado expressivos percentuais (de até 100%) de

resistência à azitromicina [27]. Por isso, a realização de testes de suscetibilidade previamente à indicação do uso de azitromicina como opção terapêutica veterinária tem sido recomendada [26]. É possível que a circulação de isolados resistentes e a baixa eficácia clínica da azitromicina no tratamento das infecções possam ter estimulado uma redução no uso deste fármaco pelos veterinários na região de estudo ao longo dos anos e, como consequência, levado à diminuição da pressão de seleção de cepas resistentes, contribuindo para a observação dos resultados apontados. Do mesmo modo, a redução do número de isolados resistentes à tobramicina foi um resultado inesperado. A tobramicina está presente em formulações otológicas, sendo frequentemente utilizado de forma empírica. Outros estudos também têm observado sensibilidade dos isolados à tobramicina *in vitro* [15,28,29].

#### *Amostras de urina*

Os gêneros bacterianos comumente identificados no trato urinário de cães incluem *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Proteus* spp. e *Klebsiella* spp. e a espécie *Escherichia coli* [5,21]. Nossos achados reforçam as observações de que a maior parte dos casos de Infecções do trato urinário (ITUs) em cães é causada por bactérias Gram-negativas [5,21,30], sendo *E. coli* a mais prevalente seguida por *P. mirabilis*. Entre as bactérias Gram-positivas, o gênero *Staphylococcus*, como observado, apresenta maior prevalência [5,21].

Corroborando com nossos resultados, pesquisa também demonstrou que dentre as (fluoro)quinolonas, a enrofloxacin foi a droga a que *Staphylococcus* coagulase positivas mostraram maior resistência [21]. Em 2017 na Nova Zelândia, cepas de *E. coli* isoladas de urina de cães demonstraram aumento de resistência a enrofloxacin, juntamente com a associação amoxicilina-clavulanato e a cefalotina [30]. Observamos que ao longo dos três anos avaliados, o número de bactérias resistentes aos antimicrobianos mais comumente utilizados nos casos de ITUs vem aumentando, o que dificulta o tratamento dessas patologias.

#### *Amostras de secreção das orelhas e da pele*

Bactérias do gênero *Staphylococcus* compõe a microbiota normal da pele e orelha de cães [31]. Entretanto, essas bactérias parecem ter um papel oportunista, uma vez que têm sido identificadas em casos de otite externa, piodermites, infecções do trato urinário, assim como o observado neste estudo, além de complicações pós-cirúrgicas [27,29,32].

Ao longo do período avaliado, observamos um aumento de isolados resistentes a dois antimicrobianos, a polimixina B e a enrofloxacina, para os casos de infecções de orelha e pele, respectivamente. A polimixina B é um fármaco que desestabiliza a estrutura lipopolissacarídica das bactérias [33], sendo mais eficaz contra bactérias Gram-negativas. Em contrapartida, observa-se uma tendência de resistência a este fármaco por bactérias Gram-positivas [34], o que possivelmente pode ter contribuído para o resultado encontrado neste estudo, uma vez que a maioria das bactérias isoladas das orelhas são *Staphylococcus* coagulase e gram positivas. Em contraste, outros estudos observaram 100% de sensibilidade das cepas de *Staphylococcus* spp a polimixina B [29] e descreveram baixos índices de resistência para este antimicrobiano no controle tópico de otites em cães [35]. As diferenças observadas entre os estudos podem ser atribuídas às variações geográficas e aos hábitos de vida dos animais no tocante ao maior ou menor acesso ao arsenal de antimicrobianos. Outro fator é o período temporal entre a realização dos estudos (uma diferença de oito anos). Mudanças globais de perfil de circulação de cepas e de pressão de seleção são prováveis ao longo tempo, e por isso, podem dificultar a comparação entre estudos.

Por outro lado, diversos estudos apontam índices preocupantes de cepas resistentes à enrofloxacina [5,27,36,37], o que também foi observado nesse estudo. A enrofloxacina é um fármaco de segunda escolha para este tipo de infecção e o aumento da resistência tem, provavelmente, relação com sua ampla utilização em medicina veterinária, por mostrar-se eficiente para parte dos tratamentos realizados de forma empírica e por possuírem um amplo espectro de ação [38].

Estafilococos coagulase positivos

Diversos estudos descrevem as bactérias do gênero *Staphylococcus* como as mais isoladas da pele e orelhas por constituírem parte da microbiota residente destes locais [31]. O gênero tem sido identificado como o mais importante nos casos de ITUs nos cães [5,29,39-45], fato este observado também no presente estudo.

Dentre as bactérias do gênero *Staphylococcus*, *S. pseudintermedius* é a espécie mais comumente isolada nos cães [14,53-58]. Estudos de aderência e colonização bacteriana têm indicado que esta bactéria coloniza preferencialmente a pele dos cães, enquanto *S. aureus* e *S. intermedius* se instalam preferencialmente na pele de humanos [59].

Em contrapartida, a identificação de *S. aureus* em cães, incluindo isolados resistentes à meticilina (MRSA), vem sendo descrita ao longo dos anos, tanto em animais de companhia como em profissionais da área veterinária [46,47,48]. *S. aureus* é uma bactéria zoonótica com potencial para transmissão bidirecional entre animais e humanos [49,50]. Trabalhos prévios demonstram uma prevalência de isolamento de *S. aureus* em cães variando entre 7 a 12,7% [20,51,52].

*S. pseudintermedius* e *S. aureus* apresentam características bioquímicas e morfológicas muito semelhantes, tornando difícil a diferenciação fenotípica, sendo necessário o emprego de técnicas moleculares específicas [60]. Entretanto, o diagnóstico molecular de *S. pseudintermedius* na rotina clínica é caro, e por isso, a diferenciação dessas espécies encontra-se apenas no campo da pesquisa científica [17,61]. Assim, acreditamos que a maior parte das cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva sejam *S. pseudintermedius*, e também, exista número representativo de cepas de *S. aureus*.

O elevado percentual de cepas *Staphylococcus* coagulase positiva multirresistentes encontrados nesse estudo é similar ao percentual encontrado em isolados de otites de cães em estudo prévio [62]. Esses dados reforçam a proposta [27] de que a realização de testes de identificação bacteriana e sensibilidade aos antimicrobianos são essenciais na rotina veterinária para auxiliar na seleção apropriada do agente antimicrobiano devido às altas taxas de multirresistência bacteriana.

*Aumento do número de isolados de Staphylococcus coagulase positivo resistentes às (Fluoro)quinolonas ao longo do tempo*

A recomendação de que os antimicrobianos da classe das (fluoro)quinolonas não sejam usados como primeira escolha é de longa data, já que há 20 anos a resistência de bactérias do gênero *Staphylococcus* a estes fármacos já havia sido demonstrada [64]. Essa resistência vem progredindo consideravelmente, ocorrendo tanto por mecanismos de mutação como por transferência de plasmídeos, o que se acreditava não ocorrer com as (fluoro)quinolonas [5,38].

Já foi demonstrado que o emprego de doses subletais de enrofloxacin, ciprofloxacina e marbofloxacina têm contribuído para a seleção de cepas resistentes [65]. Observamos aumento significativo ( $p < 0.05$ ), ao longo dos 3 anos, no número de isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva resistentes a marbofloxacina, ciprofloxacina e enrofloxacin, pertencentes a classe das (fluoro)quinolonas. Também observamos um padrão de resistência simultânea à ciprofloxacina e à enrofloxacin em 94/277 (33,94%) cepas. Outro estudo também demonstrou a alta prevalência de resistência de *Staphylococcus* spp a enrofloxacin (53,8%), ciprofloxacina (42,8%) e norfloxacina (41,3%) [5], bem como padrões de resistência simultânea para enrofloxacin e norfloxacina [27].

Normalmente ocorre um padrão de resistência cruzada quando um isolado se torna resistente a uma droga da classe das (fluoro)quinolonas, tornando-o mais propenso a tornar-se resistente a outros antimicrobianos da mesma classe [63]. Portanto, reforçamos a recomendação de que qualquer antimicrobiano da classe das (fluoro)quinolonas seja apenas utilizado mediante testes de sensibilidade prévios [45].

*Aumento do número de isolados Staphylococcus coagulase positivo resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos ao longo do tempo*

As cefalosporinas de primeira e terceira geração são historicamente consideradas fármacos de primeira escolha para diversas infecções, em especial de pele e otites [25]. Para o tratamento dos casos de ITUs, a amoxicilina em

associação ou não ao clavulanato de potássio e a cefalexina são também consideradas drogas de eleição [24]. Por esta razão, estes antimicrobianos acabam sendo utilizados de forma empírica, prática que deve ser avaliada racionalmente, em virtude do número crescente de cepas resistentes.

Alta suscetibilidade à amoxicilina-clavulanato em cepas de *Staphylococcus* coagulase positivas isoladas de feridas de cães tem sido observada [62,66], assim como à cefalexina em cepas de *Staphylococcus* spp também isoladas de cães [67]. Contudo, percentual elevado de resistência ao ceftiofur (91,6%), a cefalexina (74,7%), a associação amoxicilina-clavulanato (68%) e a ampicilina (63%) tem sido observado em isolados de lesões de pele, otites e ITUs [5]. Outro estudo também determinou que mais de 50% das amostras de *Staphylococcus* spp apresentaram resistência à cefalexina e à ceftriaxona, ambas pertencentes a classe dos  $\beta$ -lactâmicos e muito utilizados na medicina humana e veterinária [27]. Em nosso estudo, outros fármacos da mesma classe foram testados e o desempenho foi ainda mais preocupante. Quando avaliamos ao longo dos anos o desempenho da penicilina e da ampicilina, os índices de amostras resistentes variaram entre 87,5% e 95%, fato que indica a ineficiência do uso desses antimicrobianos.

Tal cenário de resistência não é diferente do encontrado em cepas isoladas de pacientes humanos [71], já que há relato de alta resistência a ceftriaxona em *S. aureus* isolados de pessoas com diferentes tipos de infecção. Também em isolados de humanos com pneumonia internados em UTIs observou-se prevalência de bactérias na forma de cocos gram positivos, em especial *S. aureus*, com alta resistência a ceftriaxona [72]. Em nosso estudo observamos concordância com os estudos citados, onde antimicrobianos classicamente utilizados como de primeira escolha e de forma empírica, apresentaram percentual importante de cepas resistentes.

Houve tendência temporal para o aumento ( $p < 0.05$ ) de cepas resistentes ao ceftiofur, a ceftriaxona e para a associação amoxicilina-clavulanato, dados estes preocupantes em virtude de sua larga utilização no tratamento das mais diversas infecções em cães, e no caso dos dois últimos, também em humanos. Assim, concluímos ser altamente recomendável a utilização de testes de



suscetibilidade para a escolha de algumas drogas da classe dos  $\beta$ -lactâmicos, tais como a penicilina e a ampicilina, recomendação essa já sugerida anteriormente [45]. Esta recomendação deve ser especialmente observada se os animais já tiverem recebido tratamentos anteriores com fármacos dessa classe, além do uso mais prudente e apenas quando estritamente necessário, para os outros fármacos da classe dos  $\beta$ -lactâmicos.

#### *Susceptibilidade de *Staphylococcus coagulase positiva* aos aminoglicosídeos*

Os aminoglicosídeos são considerados fármacos de eleição no tratamento de infecções por bactérias do gênero *Staphylococcus* [73], sendo amplamente utilizados em otites e infecções de pele. De modo geral, a gentamicina, neomicina e tobramicina são os antimicrobianos dessa classe mais testados ao longo dos anos por diferentes autores. Em vários estudos *in vitro*, a gentamicina tem mostrado melhor eficácia no controle de *Staphylococcus* [27,62,67,70,74]. Em contraste, maior eficiência da tobramicina, seguida pela gentamicina já foi determinada [5], enquanto a neomicina apresentou maior percentual de insucesso [67]. Estes estudos corroboram, na maior parte, com os resultados de susceptibilidade dos isolados à gentamicina, tobramicina e neomicina encontrados em nosso estudo.

Observamos que mais de 50% dos isolados *Staphylococcus coagulase positiva* foram sensíveis a pelo menos um desses três fármacos, gentamicina, neomicina ou tobramicina, havendo, tendência de diminuição ( $p < 0,05$ ) no número de isolados resistentes à tobramicina ao longo dos três anos avaliados. Esta diminuição no número de isolados resistente à tobramicina foi um resultado inesperado, pois este é um fármaco presente em algumas formulações otológicas veterinárias e usado com frequência de forma empírica. Outros trabalhos realizados ao longo dos anos também demonstraram um bom perfil de sensibilidade *in vitro* de bactérias Gram-positivas e negativas à tobramicina [5,28,29]. Uma hipótese para este resultado é a possibilidade deste fármaco ter sido pouco administrado pelos médicos veterinários aos animais que tiveram suas amostras enviadas para análise durante o período de estudo.

## CONCLUSÃO

Durante os anos de 2016 a 2018 *Staphylococcus* coagulase positiva foi o agente etiológico mais envolvido em infecções de pele e otites e a segunda mais prevalente em ITUs. Este micro-organismo apresentou tendência de aumento temporal de resistência para os antimicrobianos ceftiofur, ceftriaxona, enrofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin, marbofloxacin, amoxicilina-clavulanato e polimixina B e tendência oposta para azitromicina e tobramicina. A multirresistência foi constatada em 69,29% dos isolados e considerando-se apenas as cepas de *Staphylococcus* coagulase positiva, 63,89% foram multirresistentes. Para que se faça uso dos antimicrobianos da classe das (fluoro)quinolonas, bem como para a ampicilina, penicilina e polimixina B, recomendamos exames prévios de sensibilidade. Recomendamos também, uso criterioso e apenas quando estritamente necessário de todos os antimicrobianos da classe dos  $\beta$ -lactâmicos. Pesquisas como esta devem ser repetidas periodicamente a fim de se entender as tendências temporais de resistência antimicrobiana em bactérias isoladas de infecções de cães.

## Contribuições

**Desenho experimental:** CRM, NMV, DAR, ALG

**Coleta dos dados:** CRM, TKS, EDM

**Análise estatística:** NMV, ALG

**Escrita do manuscrito:** CRM, ALG

**Supervisão:** DAR, ALG

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Siqueira AK, Ribeiro MG, Salerno T, Takahira RK, Lopes MD, Prestes NC, Silva AV. Perfil de sensibilidade e multirresistencia em linhagens de *Escherichia coli* isoladas de infeccao do trato urinario, de piometra e de fezes de caes. Arq Bras Med Vet Zootec. 2008; 60 (5):1263-1266.

2. Guardabassi L, Schwarz S, Lloyd DH. Pets animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2004; 54 (2): 331-332.
3. Mendes C, Oplustil C, Sakagami E, Turner P, Kiffer C. Antimicrobial susceptibility in Intensive Care Units: MYSTIC Program Brazil 2002. *Braz. J. Infect. Dis.* 2005; 9(1):44-51.
4. Hoekstra KA, Paultron RJL. Clinical prevalence and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius* in dogs. *J Appl Microbiol.* 2002; 93:406-413.
5. Ishii JB, Freitas JC, Arias MVB. Resistencia de bacterias isoladas de caes e gatos no Hospital Veterinario da Universidade Estadual de Londrina (2008-2009). *Pesq Vet Bras.* 2011; 31(6):533-537.
6. Cooke CL, Singer RS, Jang SS, Hirsh DC. Enrofloxacin resistance in *Escherichia coli* isolated from dogs with urinary tract infections. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2002; 220:190-192.
7. Prescott JF, Hanna WJB, Reid-Smith R, Drost K. Antimicrobial drug use and resistance in dogs. *Can Vet J.* 2002; 43:107-116.
8. Van Duijkeren E, Kamphuis M, Mije ICM, Laarhoven LM, Duim B, Wagenaar JA, Houwers DJ. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* between infected dogs and cats and contact pets, humans and the environment in households and veterinary clinics. *Vet Microb.* 2011;150: 338–343.
9. Soedarmanto I, Kanbar T, Ulbegi-Mohyla H, Hijazin M, Alber J, Lammler C, Akineden O, Weiss R, Moritz A, Zschock M. Genetic relatedness of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) isolated from a dog and the dog owner. *Res Vet Sci.* 2011; 91: e25–e27.

10. Somayaji R, Priyantha MAR, Rubin JE, Chrurch D. Human infections due to *Staphylococcus pseudintermedius*, an emerging zoonosis of canine origin: report of 24 cases. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2016; 85: 471–476.
11. Song SJ, Lauber C, Costello EK, Lozupone CA, Humphrey G, Berg-Lyons D et al. Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. *Elife*. 2013; 2: e00458.
12. Misic AM, Davis MF, Tyldsley AS, Hodgkinson BP, Tolomeo P, Hu B, et al. The Shared microbiota of humans and companion animals as evaluated from *Staphylococcus* carriage sites. *Microbiome* 2015; 3: 2.
13. Hoffmann AR. The cutaneous ecosystem: the roles of the skin microbiome in health and its association with inflammatory skin conditions in humans and animals. *Vet Dermatol*. 2017; 28: 60–e15.
14. Yang C, Wan MT, Lauderdale TL, Yeh KS, Chen C, Hsiao YH, et al. Molecular characteristics of clinical methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* harboring arginine catabolic mobile element (ACME) from dogs and cats. *Vet J*. 2017; 224:46–49.
15. RStudio Team (2015). RStudio; Integrated Development for R. RStudio, Inc, MA URL <http://www.rstudio.com>
16. Fitzgerald JR. The *Staphylococcus intermedius* group of bacterial pathogens: species re classification, pathogenesis and the emergence of meticillin resistance. *Vet Dermatol*. 2009; 20:490–495.
17. Bannoehr J, Guardabassi, L. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Vet. Dermatol*. 2012; 23: 253–266.
18. Kadlec K, Schwarz S. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius*. *Vet Dermatol*. 2012; 23: 276–e55.

19. Beever L, Graham PA, Jackson B, Lloyd DH, Loeffler A. Increasing antimicrobial resistance in clinical isolates of *Staphylococcus intermedius* group bacteria and emergence of MRSP in the UK. *Vet Rec.* 2015; 176:172.
20. Aklilu E, Zakaria Z, Hassan L, Cheng CH. Molecular Relatedness of Methicillin-Resistant *S. aureus* Isolates from Staff, Environment and Pets at University Veterinary Hospital in Malaysia. *Plos One.* 2012;7(8):e43329.
21. Carvalho VM, Spinola T, Tavolari F, Irino K, Oliveira RM, Ramos MCC. Infecções do trato urinário (ITU) de cães e gatos: etiologia e resistência aos antimicrobianos. *Pesq Vet Bras.* 2014; 34(1):62-70.
22. Saputra S, Jordan D, Worthing KA, Norris JM, Wong HS, Abraham R, et al. Antimicrobial resistance in coagulase-positive staphylococci isolated from companion animals in Australia: A one year study. *Plos One.* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176379> April 21, 2017.
23. Schwarz S, Loeffler A, Kadlec K. Bacterial resistance to antimicrobial agents and its impact on veterinary and human medicine. *Vet Dermatol.* 2017; 28: 82–e19.
24. Barsanti JA. Genitourinary infections, p.626-646. In: Greene C.E. (Ed.), *Infectious Diseases of the Dog and Cat.* 2nd ed. W.B. Saunders, Philadelphia. 2006. 1387p.
25. Hillier A, Lloyd DH, Weese JS et al. Guidelines for the diagnosis and antimicrobial therapy of canine superficial bacterial folliculitis (Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases). *Vet Dermatol.* 2014; 25: 163–175, e42–43.
26. Pereira IA, Soares LC, Coelho SMO, Pribul BR, de Souza MMS. Suscetibilidade a azitromicina de isolados bacterianos de processos infecciosos em cães e gatos. *Pesq. Vet. Bras.* 2009; 29(2):153-156.

27. Sfaciotte RA, Vignoto VKC, Wosiacki SR. Antimicrobial resistance profile of bacterial isolates from clinical disorders of the Veterinary Hospital of Maringa State University. Rev. Cien. Vet. Saude Publ. 2014; 1 (1):29-38.
28. Mateu E, Martin M. Why is anti-microbial resistance a veterinary problem as well? J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health. 2001; 48(8): 569-581.
29. Oliveira LC, Brilhante RSN, Cunha MAS, Carvalho CBM. Perfil de isolamento microbiano em caes com otite media e externa associadas. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 2006; 58(6):1009-1017.
30. McMeekin CH, Hill KE, Gibson IR, Bridges JP, Benschop J. Antimicrobial resistance patterns of bacteria isolated from canine urinary samples submitted to a New Zealand veterinary diagnostic laboratory between 2005–2012. N Z Vet J. 2017; 65(2): 99-104. DOI: 10.1080/00480169.2016.1259594
31. Larsson CE, Lucas R. Tratado de Medicina externa: Dermatologia Veterinaria – Sao Caetano do Sul, SP: Interbook, 2016. 853p.
32. Rantala M, Lahti E, Kuhalampi J, Pesonen S, Jarvinen AK, Koulumies LJ, Buzalski TH. Antimicrobial resistance in *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. in dogs given antibiotics for chronic dermatological disorders, compared with non-treated control dogs. Acta vet. Scand. 2004; (45):1-2.
33. Storm DR, Rosenthal KS, Swanson PE. Polymyxin and related peptide antibiotics. Annu Rev Biochem. 1977; 46: 723–763.
34. Spinoza HS, Goniak SL, Bernardi MM. Farmacologia aplicada a Medicina Veterinaria. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 897p.
35. Boyen F, Verstappen KMHW, De Bock M, Duim B, Weese JS, Schwarz S, et al. In vitro antimicrobial activity of miconazole and polymyxin B against canine

meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* and meticillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolates. Vet Dermatol. 2012; 23: 381–e70.

36. Mekic S, Matanovic K, Seol B, Mekic S. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs with otitis externa. Vet Rec. 2011;169(5):125-125.

37. Vingopoulou EI, Delis GA, Batzias GC, Kaltsogianni F, Koutinas A, Kristo I, Pournaras S, Saridomichelakis MN, Siarkou VI. Prevalence and mechanisms of Resistance to fluoroquinolones in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* isolates recovered from dogs suffering from otitis in Greece. Vet Microbio. 2018;213:102-108.

38. Pallo-Zimmerman LM, Byron JK, Graves TK. 2010. Fluoro-quinolonas: Then and now. Comp. Cont. Educ. Pract. Vet. 2010; 32: E1-E8.

39. Blue JL, Wooley RE. Antibacterial sensitivity patterns of bacteria isolated from dogs with otitis externa. J Am Vet Med Assoc. 1977;171(4):362-363.

40. Dieckmann AM, Torres HM, Ferreira T, Aquino MHC. Aspectos clinicos e avaliacao antibacteriana terapeutica da otite externa em caes. Ver Bras Med Vet. 1996;18(6):242-245.

41. Mota RA, Farias JKO, Silva LBG, Lima ET, Oliveira AAF, Moura RTD. Eficacia do Otomax no tratamento da otite bacteriana e fungica em cães. Hora Vet. 2000;19: 13-16.

42. Yamashita K, Shimizu A, Kawano J, Uchida E, Haruna A, Igimi S. Isolation and characterization of Staphylococci from externa auditory meatus of dogs with or without otitis externa with special reference to *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolates. J Vet Med Sci. 2005;67(3):263-268.

43. Rougier S, Borell D, Pheulpin S, Woehrle F, Boisrame B. A comparative study of two antimicrobial/anti-inflammatory formulations in the treatment of canine otitis externa. *Vet Dermatol.* 2005; 5(16):299-307.
44. Metiner K, Bagcigil Af, Ilgaz A. Determination of the diversity and antibiotic resistance profiles of *Staphylococcus* species from dogs with otitis externa and examination of *mecA* gene occurrence. *Vet Medic.* 2015;60(5):261-267.
45. Zur G, Gurevich B, Elad D. Prior antimicrobial use as a risk factor for resistance in selected *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from the skin and ears of dogs. *Vet Dermatol.* 2016; 27: 468–e125.
46. van Duijkeren E, Wolfhagen MJHM, Box AT, Wannet WJ, Fluit AC. Humanto-dog transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10: 2235–2237.
47. Jones RD, Kania SA, Rohrbach BW, Frank LA, Bermis DA. Prevalence of oxacillin-and multidrug-resistant staphylococci in clinical samples from dogs:1,772 samples (2001–2005). *J Am Vet Med Assoc.* 2007; 230: 221–227.
48. Anderson MEC, Lefebvre SL, Weese JS. Evaluation of prevalence and risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in veterinary personnel attending an international equine veterinary conference. *Vet Microbiol.* 2008; 129: 410–417.
49. Jordan D, Simon J, Fury S, Moss S, Giffard P, Maiwald M, et al. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by veterinarians in Australia. *Aust Vet Jo.* 2011; 89(5):152–159.
50. Smith TC. Livestock-associated *Staphylococcus aureus*: the United States experience. *PLoS Pathog.* 2015; 11(2):e1004564. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat>.
51. Tarazi YH, Almajali AM, Ababneh MMK, Ahmed HS, Jaran AS. Molecular study on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from dogs



and associated personnel in Jordan. Asian Pac J Trop Biomed. 2015; 5(11): 902–908.

52. Kaspar U, von Lutzau A, Schlattmann A, Poesler U, Köck R, Becker K. Zoonotic multidrug-resistant microorganisms among small companion animals in Germany. PLOS ONE | <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208364> December 7, 2018.

53. Fazakerley J, Nuttall T, Sales D, Schmidt V, Carter SD, Hart CA et al. Staphylococcal colonization of mucosal and lesional skin sites in atopic and healthy dogs. Vet Dermatol 2009; 20: 179–184.

54. Hanselman BA, Kruth SA, Rousseau J, Low DE, Willey BM, Mc Geer A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in veterinary personnel. Emerg Infect Dis. 2006; 12: 1933–1938.

55. Lucia M, Moodley A, Latronico F, Giordano A, Caldin M, Findati A, et al. Prevalence of canine methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary diagnostic laboratory in Italy. Research in Veterinary Science. 2001; 91: 346-348.

56. Kadlec K, Wendlandt S, Fesler AT, Stefan S. Methods for the detection of antimicrobial resistance and the characterization of *Staphylococcus aureus* Isolates from food-producing animals and food of animal origin. In: Chen C-Y, Yan X, Jackson C, eds. Antimicrobial Resistance and Food Safety, Amsterdam: Elsevier, 2015; 207–232.

57. Botoni LS, Scherer CB, Silva RO, Coura FM, Heinemann MB, Paes-Leme FO, Costa -Val AP. Prevalence and *in vitro* susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) from skin and nostrils of dogs with superficial pyoderma. Pesq. Vet. Bras. 2016; 36(12):1178-1180. DOI: 10.1590/S0100-736X20160012000061178.

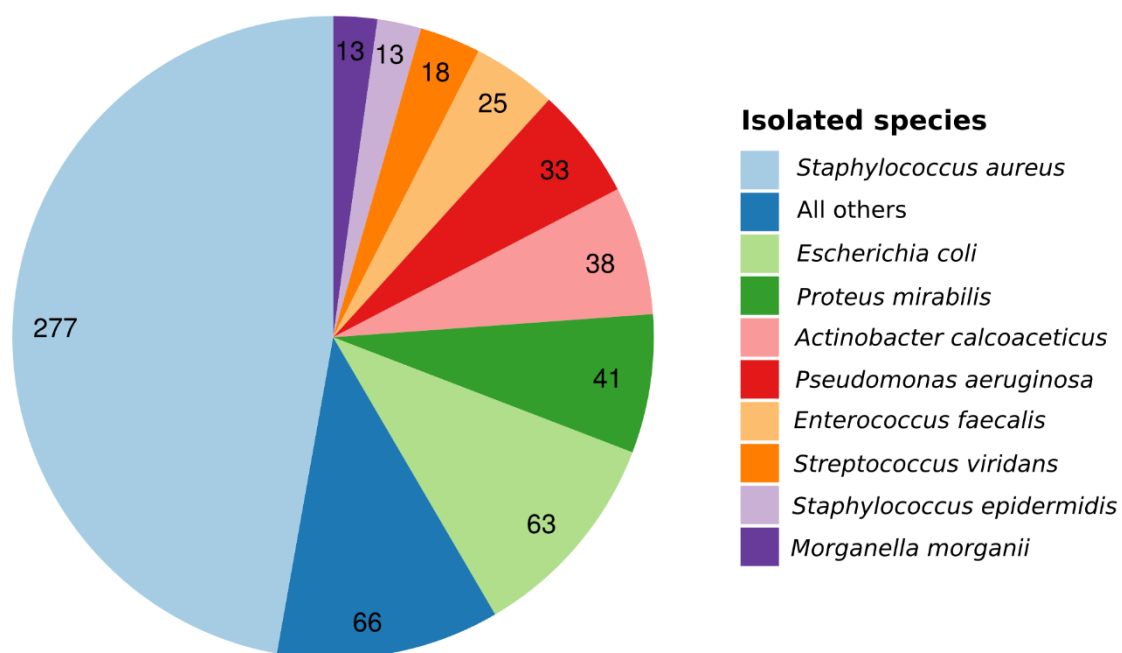
58. Banovic F, Linder K, Olivry T. Clinical, microscopic and microbial characterization of exfoliative superficial pyoderma associated epidermal collarettes in dogs. *Vet Dermatol* 2017; 28: 107–e23.
59. Peacock SJ, de Silva I, Lowy FD. What determines nasal carriage of *Staphylococcus aureus*? *Trends Microbiol* 2001; 9: 605–610.
60. Sasaki T, Kikuchi K, Tanaka Y, Takahashi N, Kamata S, Hiramitsu K. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *JCM* 2007; 45:2770–8.
61. Borjesson S, Gomez-Sanz E, Ekstrom K, Torres C, Gronlund U. *Staphylococcus pseudintermedius* can be misdiagnosed as *Staphylococcus aureus* in humans with dog bite wounds. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015; 34: 839–844.
62. Scherer CB, Botoni LS, Coura FM, Silva RO, dos Santos RD, Heinemann MB, Costa – Val AP. Frequency and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus pseudintermedius* in dogs with otitis externa. *Cienc. Rural.* 2018, 48:4, e20170738.
63. CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals: Approved Standard, CLSI document M31-A3, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pa, USA, 3rd edition, 2008.
64. Ihrke, PJ; Papich, MG; Demanuelle, TC. The use of fluoroquinolones in veterinary dermatology. *Vet Dermatol.* 1999; 10:193-204.
65. Awji EG, Damte D, Lee SJ, Kim YH, Park SC, “The in vitro activity of 15 antimicrobial agents against bacterial isolates from dogs”, *J Vet Med Scien.* 2012; 74(8): 1091–1094.

66. Meyers B, Schoeman JP, Goddard A, Picard J. The bacteriology and antimicrobial susceptibility of infected and non-infected dog bite wounds: Fifty cases. *Vet. Microbiol.* 2007; 127:360-368.
67. Tunon GIL, Silva EP, Faienstein CC. Isolamento de estafilococos multirresistentes de otites em caes e sua importancia para saude publica. *Bepa.* 2008; 5:4-7.
68. Barelli C, Minto ECN, Martinez R, Darini ARC. Evaluation of the antimicrobial susceptibilities of coagulase negative staphylococci by E-test. *Rv. Lat. Microbiol.* 1999;41 (2):67-72.
69. Tenssay ZW. Staphylococci: frequency of isolation and antibiotic susceptibility pattern in Jimma Hospital South West Ethiopia. *J. Ethiopia Med.* 2000; 38(3): 175-184.
70. Soares LC, Pereira IA, Coelho SMO, Cunha CMM, Oliveira DFB, Miranda AN, Souza MMS. Caracterizacao fenotipica da resistencia a antimicrobianos e detecção do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. Coagulase-negativos isolados de amostras animais e humanas. *Cienc. Rural.* 2008;38(5): 1346-50.
71. Gashe F, Mulisa E, Mekonnen M, Zeleke G. Antimicrobial Resistance Profile of Different Clinical Isolates against Third-Generation Cephalosporins. *J Pharm.* Volume 2018, Article ID 5070742, 7 pages.
72. Calcagnotto L, Nespolo CR, Stedile NLR. Antimicrobial resistance in microorganisms isolated from respiratory tract of patients admitted in intensive therapy unit. *ACM.* 2011; 40(3).
73. Farias MF. Terapeutica otologica. In: FARIAS, M.F et al. Manual de terapêutica veterinaria. 2.ed. São Paulo: Roca, 2002. p.198-204.

74. Lilenbaum W, Veras M, Blum E, Souza GN. Antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from otitis externa in dogs. *Lett. Appl. Microbiol.* 2000; 31:42-45.

## FIGURA E TABELAS

**Figura 1.** Bactérias identificadas em análises de 698 amostras clínicas de cães coletadas entre os anos de 2016 a 2018.



Legend: All others: *Pseudomonas oryzihabitans*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella oxytoca*, *Arizonae*, *Kluyvera ascorbata*, *Pasteurella*, *Rodhococcus*, *Streptococcus beta hemolítico*, *Streptococcus pneumoniae*, *Yersinia enterocolítica*, *Citrobacter amaloniticus*, *Neisseria sp*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella ozaenae*, *Citrobacter braakii*, *Edwardsiella hoshinae*, *Enterobacter sakazakii*, *Escherichia fergusonii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia liquefaciens*, *Staphylococcus intermedius*, *Pseudomonas oryzihabitans*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*.

**Tabela 1.** Análise de variação temporal da resistência antimicrobiana de 586 isolados de amostras clínicas de cães entre os anos de 2016 a 2018.

<b>Antimicrobianos</b>	<b>Aumento<sup>1</sup></b>	<b>Diminuição<sup>2</sup></b>
Penicilina	0,3369	0,6631
Oxicilina	0,1103	0,8897
Ampicilina	0,1903	0,8097
Cefadroxil	<b>0,02635 †</b>	0,9736
Ceftiofur	<b>0,009655 †</b>	0,9903
Cefalexina	0,3136	0,6864
Ceftriaxona	<b>0,001176 †</b>	0,9988
Amicacina	0,1425	0,8575
Gentamicina	0,1951	0,8049
Neomicina	0,4323	0,5677
Tobramicina	0,9848	<b>0,01521 †</b>
Florfenicol	0,5026	0,4974
Tetraciclina	0,5399	0,4601
Doxiciclina	0,06112	0,9389
Enrofloxacino	<b>1,688E-07 †</b>	1
Norfloxacino	0,1524	0,8476
Ciprofloxacino	<b>0,001194 †</b>	0,9988
Ofloxacino	0,6266	0,3734
Marbofloxacino	<b>0,001156 †</b>	0,9988
Amoxicilina-Clavulanato	<b>0,02197 †</b>	0,978
Sulfametoxazol-Trimetropim	0,351	0,649
Eritromicina	0,6859	0,3141
Azitromicina	0,9536	<b>0,0464 †</b>
Clindamicina	0,2919	0,7081
Polimixina B	<b>0,01905 †</b>	0,981

Legenda: <sup>1</sup>**Aumento** – Tendência temporal para o aumento do número de isolados resistentes a um antibiótico; <sup>2</sup>**Diminuição** – Tendência temporal para a diminuição do número de isolados resistentes a um antibiótico. Teste de Cochran-Armitage, valores foram considerados significativos se  $p < 0.05$  †

**Tabela 2.** Análise de variação temporal da resistência antimicrobiana de 169 isolados de amostras do trato urinário inferior de cães entre os anos de 2016 a 2018.

<b>Antimicrobianos</b>	<b>Aumento<sup>1</sup></b>	<b>Diminuição<sup>2</sup></b>
Oxacilina	0,6515152	0,6082251
Cefalexina	0,05182398	0,9746632
Tetraciclina	0,7231661	0,3705661
Doxiciclina	0,07164868	0,9528996
Enrofloxacino	<b>0,04068154 †</b>	0,9744668
Norfloxacino	0,4471067	0,6383493
Ciprofloxacino	0,1605078	0,8860431
Marbofloxacino	0,1151614	0,9267101
Amoxicilina-Clavulanato	0,1188579	0,9187346

Legenda: <sup>1</sup>**Aumento** – Tendência temporal para o aumento do número de isolados resistentes a um antibiótico; <sup>2</sup>**Diminuição** – Tendência temporal para a diminuição do número de isolados resistentes a um antibiótico. Teste de Cochran-Armitage, valores foram considerados significativos se  $p < 0.05$  †

**Tabela 3.** Análise de variação temporal da resistência antimicrobiana de 238 isolados de amostras de orelha de cães entre os anos de 2016 a 2018.

Antimicrobianos	Aumento <sup>1</sup>	Diminuição <sup>2</sup>
Oxacilina	0,5801078	0,5663154
Cefalexina	0,6202165	0,4479976
Tetraciclina	0,8100126	0,2628443
Doxiciclina	0,3402761	0,7516427
Enrofloxacino	0,06109696	0,9576445
Marbofloxacino	0,6979338	0,4128508
Amoxicilina-Clavulanato	0,3046969	0,7590551
Polimixina B	<b>0,04704548 †</b>	0,9736294
Gentamicina	0,4015375	0,6654892
Tobramicina	0,9369188	0,08963117

Legenda: <sup>1</sup>**Aumento** – Tendência temporal para o aumento do número de isolados resistentes a um antibiótico; <sup>2</sup>**Diminuição** – Tendência temporal para a diminuição do número de isolados resistentes a um antibiótico. Teste de Cochran-Armitage, valores foram considerados significativos se  $p < 0.05$  †



**Tabela 4.** Análise de variação temporal da resistência antimicrobiana de 76 isolados de amostras de pele de cães entre os anos de 2016 a 2018.

<b>Antimicrobianos</b>	<b>Aumento<sup>1</sup></b>	<b>Diminuição<sup>2</sup></b>
Oxacilina	0,1554054	0,899047
Cefalexina	0,197991	0,8773256
Cefovecina	0,2486128	0,8916799
Tetraciclina	0,5923796	0,5401962
Doxiciclina	0,2638546	0,8618494
Enrofloxacino	<b>0,001507532 †</b>	0,9995118
Marbofloxacino	0,2027547	0,8858488
Amoxicilina-Clavulanato	0,2027547	0,8858488
Gentamicina	0,2848887	0,8101309
Neomicina	0,3455976	0,7940593

Legenda: <sup>1</sup>**Aumento** – Tendência temporal para o aumento do número de isolados resistentes a um antibiótico; <sup>2</sup>**Diminuição** – Tendência temporal para a diminuição do número de isolados resistentes a um antibiótico. Teste de Cochran-Armitage, valores foram considerados significativos se  $p < 0.05$  †

**Tabela 5.** Análise de variação temporal da resistência antimicrobiana de 277 *Staphylococcus coagulase positiva* isolados de cães entre os anos de 2016 a 2018.

<b>Antimicrobianos</b>	<b>Aumento<sup>1</sup></b>	<b>Diminuição<sup>2</sup></b>
PenicilinaG	0,321143	0,7572314
Oxacilina	0,07824317	0,9507839
Ampicilina	0,1254153	0,9208848
Cefadroxil	0,07423033	0,961438
Ceftiofur	<b>0,005954138 †</b>	0,9988765
Cefalexina	0,1739125	0,8701905
Ceftriaxona	<b>0,03950036 †</b>	0,9793133
Cefalotina	0,1759587	0,9112839
Cefazolina	0,8188917	0,3446799
Cefovecina	0,1057839	0,9416646
Amicacina	0,6865836	0,672654
Gentamicina	0,1227095	0,9072554
Estreptomicina	0,4125353	0,8546584
Neomicina	0,6805981	0,3849587
Tobramicina	0,9679247	<b>0,04972571 †</b>
Florfenicol	0,5568572	0,7645449
Cloranfenicol	0,1759218	0,9135773
Tetraciclina	0,6940336	0,3768969
Doxiciclina	0,08905793	0,9424227
Enrofloxacin	<b>0,001456296 †</b>	0,9991547
Norfloxacin	<b>0,02472462 †</b>	0,9879688
Ciprofloxacin	<b>0,02171824 †</b>	0,9863992
Levofloxacin	0,1376978	0,9355322
Ofloxacin	0,5085804	0,5979181
Marbofloxacin	<b>0,01097203 †</b>	0,9934019
Amoxicilina-clavulanato	<b>0,005452382 †</b>	0,9974688
Sulfametoxazol-		
Trimetropim	0,4890094	0,668551
Clindamicina	0,8826682	0,8826682
Eritromicina	0,7690935	0,3452075
Azitromicina	0,9804981	<b>0,02955626 †</b>
PolimixinaB	<b>0,04088377 †</b>	0,9811007

Legenda: <sup>1</sup>**Aumento** – Tendência temporal para o aumento do número de isolados resistentes a um antibiótico; <sup>2</sup>**Diminuição** – Tendência temporal para a diminuição do número de isolados resistentes a um antibiótico. Teste de Cochran-Armitage, valores foram considerados significativos se  $p < 0.05$  †

**CAPÍTULO III – Ocorrência, fatores de patogenicidade e riscos associados  
a infecção por *Staphylococcus pseudintermedius* em cães e seus tutores**

Artigo a ser publicado na revista

**Journal of Clinical Microbiology**

## Ocorrência, fatores de patogenicidade e riscos associados a infecção por *Staphylococcus pseudintermedius* em cães e seus tutores

Christina Resende Martins<sup>1</sup>, Roberta Torres de Melo<sup>2</sup>, Clara Mariano Bastos<sup>3</sup>, Rafaela Oliveira Rosa<sup>3</sup>, Amanda Gubert Pereira<sup>3</sup>, Raquelline Figueiredo Braz<sup>4</sup>, Marcos Bryan Heinemann<sup>5</sup>, Belchiolina Beatriz Fonseca<sup>2</sup>, Daise Aparecida Rossi<sup>2</sup>

1. Médica Veterinária, doutoranda do Programa Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) da Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU)
2. PPGCV-FAMEV-UFU
3. Graduandas UFU
4. Médica Veterinária, mestrande do Programa Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) da Faculdade de Medicina Veterinária (FAMEV) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU)
5. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), Universidade de São Paulo (USP)

### ABSTRACT

The aim of this study was to isolate *S. pseudintermedius* (SP) in 50 dogs with superficial pyoderma and / or recurrent otitis and their tutors to determine: resistance to oxacillin, cefovecin and gentamicin by two diagnostic methods, presence of genes (*mecA*, *mecA1*, *mecA2* and *msrA*, PVL and *fnbB*) and associate risk factors for infection. The prevalence in dogs was 38 / 50(76%) and in guardians 28 / 50(56%), with concomitant identification in 24 / 50(48%). Oxacillin resistance occurred in 5 / 47(10.64%) dog strains and in 5 / 44(11.36%) guardians. There was a low correlation between oxacillin resistance in the diffusion test and the presence of *mecA*, which was insignificant with the MIC. Previous use of  $\beta$ -lactam antimicrobial showed a moderate correlation with resistance to oxacillin. No dog SP was resistant to gentamicin in the diffusion test, but 1 / 47(2.12%) was in the MIC. In 2 / 47(4.25%) strains of dogs and 2 / 47(4.54%) of guardians, *msrA* was identified. For cefovecin, from dog isolates, 4 / 47(8.15%) demonstrated resistance in the disk diffusion test and 11 / 47(23.40%) in the MIC. In guardian isolates, there were 3 / 44(6.81%) and 16 / 44(36.36%) resistant strains, in the diffusion test and MIC, respectively. Gene *fnbB* was identified in 4 / 91(4.39%) strains, with a weak correlation between isolates from the dog and guardian; PVL was not identified. Dogs that sleep with positive humans are six times more likely to become positive and dogs that go “bathing

and grooming” are four times more likely to be positive for SP. The diffusion method is not a good option for determining strains resistant to oxacillin and cefovacin.

**Keywords:** *mecA*, diffusion discs, MIC, *msrA*, *fnbB*, PVL, resistance, antimicrobials.

## RESUMO

Objetivou-se isolar *S. pseudintermedius* (SP) em 50 cães com piodermite superficial e/ou otite recidivante e de seus tutores para determinar: resistência a oxacilina, cefovecina e gentamicina por dois métodos diagnósticos, presença de genes (*mecA*, *mecA1*, *mecA2* e *msrA*, PVL e *fnbB*) e associar fatores de risco para a infecção. A prevalência nos cães foi de 38/50(76%) e nos tutores de 28/50(56%), com identificação concomitante em 24/50(48%). Resistência a oxacilina ocorreu em 5/47(10,64%) cepas de cães e 5/44(11,36%) de tutores. Houve baixa correlação entre a resistência a oxacilina no teste de difusão e a presença de *mecA*, que foi insignificante com o MIC. Uso prévio de antimicrobiano  $\beta$ -lactâmico mostrou correlação moderada com resistência à oxacilina. Nenhum SP de cão foi resistente a gentamicina no teste de difusão, mas 1/47(2,12%) foram na MIC. Em 2/47(4,25%) cepas de cães e 2/47(4,54%) de tutores identificou-se *msrA*. Para a cefovecina, dos isolados de cães, 4/47(8,15%) demonstraram resistência no teste de difusão em discos e 11/47(23,40%) no MIC. Nos isolados de tutores, houve 3/44(6,81%) e 16/44(36,36%) cepas resistentes, no teste de difusão e MIC, respectivamente. O gene *fnbB* foi identificado em 4/91(4,39%) cepas, com fraca correlação entre isolados do cão e tutor; PVL não foi identificado. Cães que dormem com humanos positivos tem seis vezes mais chance de se tornar positivo e cães que frequentam “banho e tosa” tem quatro vezes mais chance de positividade para SP. O método de difusão não é uma boa opção para determinar cepas resistentes a oxacilina e cefovicina.

**Palavras-chave:** *mecA*, discos de difusão, MIC, *msrA*, *fnbB*, PVL, resistência, antimicrobianos

*S. pseudintermedius* forma junto com outras duas espécies, *S. intermedius* e *S. delphini*, também coagulase positivas, o grupo conhecido como

SIG (*Staphylococcus intermedius* group) (1). Essa espécie, assim como *S. aureus*, é capaz de produzir uma variedade de fatores de virulência, incluindo a capacidade de produzir coagulase, termonuclease, proteases, proteínas de superfície como fatores de fragmentação e proteína A, além de citotoxinas, toxinas esfoliativas e enterotoxinas (2, 3).

É a espécie mais isolada nos casos de piodermite nos cães, sendo frequentemente identificada nas orelhas e feridas infeccionadas, podendo ser um complicador na resposta imunomoduladora (4,5). Outro ponto importante com relação a *S. pseudintermedius* é a sua capacidade de desenvolver resistência a várias drogas. Nesse contexto, *Staphylococcus pseudintermedius* meticilina resistente – MRSP, que se caracteriza pela presença do gene *mecA*, emergiu como um grande desafio para veterinários de pequenos animais, em especial veterinários dermatologistas, devido a sua extensa resistência às drogas e a sua capacidade de causar infecções nosocomiais (6), sendo isolada de cães com frequência cada vez maior e também apontado como causador de infecções em humanos (7, 8, 9, 10).

No que diz respeito ao potencial zoonótico, os relatos de infecções em humanos por MRSP vêm aumentando em todo o mundo, com relatos de isolamentos em feridas causadas por mordidas ou outras infecções de pele, além de otite externa, sinusite, bacteremia relacionada ao uso de cateter, pneumonia e abscesso cerebral (11, 12, 13). Além disso, estudo (14) já demonstrou que proprietários de cães que apresentaram piodermite profunda, frequentemente são carreadores de *S. pseudintermedius*, e outros estudos sugerem fortemente que ocorra a transmissão de MRSP de cães para seus proprietários (15, 16) e para equipe de hospitais veterinários (17).

Objetivou-se isolar *S. pseudintermedius* em cães com piodermite superficial e/ou otite recidivante e nas narinas de seus tutores, e determinar nessas cepas, a susceptibilidade a oxacilina, cefovicina e gentamicina por dois métodos diagnósticos, os genes de resistência aos antimicrobianos (*mecA*, *mecA1*, *mecA2* e *msrA*) e de virulência (PVL e *fnbB*). Também buscou correlacionar fatores de risco para a infecção e verificar a associação entre os métodos diagnósticos que identificam a resistência antimicrobiana.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Amostras dos cães e seus tutores

Foi realizado um estudo transversal, que envolve a seleção de amostras de indivíduos de uma grande população. Foram avaliadas amostras clínicas de 50 animais com otite e ou piodermite atendidos em hospitais veterinários públicos e privados e de seus tutores, para determinar a presença simultânea de positividade, fator de risco hipotético para transmissão entre cães e tutores e prevalência.

Como critério de inclusão, considerou-se cães que apresentavam otite e/ou piodermite superficial com caráter recidivante, podendo ter feito ou não uso de drogas antimicrobianas tópicas e/ou sistêmicos anteriormente. Também havia necessidade de seus tutores permitirem a participação no estudo e fornecessem material de suas narinas. Foram excluídos animais e/ou tutores que estivessem fazendo uso de antimicrobianos no ato da avaliação clínica.

Para identificação das lesões de piodermite superficial foi considerada a presença de alopecia circular, pápulas, pústulas, eritema e colarinhos epidérmicos. Para caracterizar a otite, considerou-se o histórico de prurido ou dor otológica, além de eritema, edema e secreção otológica de qualquer aspecto.

Foram coletadas amostras de 50 cães e de seus tutores, que também respondiam a um questionário sobre os hábitos de vida do cão e de convívio com humanos, curso da doença do animal e tratamentos já realizados (anexo 1).

A coleta das orelhas externas foi realizada com auxílio de otoscópio veterinário e *swab* estéril, que depois era armazenado em meio de Stuart (Absorve®). As amostras da pele foram coletadas da mesma forma, preferencialmente de pústulas intactas (previamente rompidas com agulha hipodérmica) ou de colaretes epidérmicos na porção inferior dos retalhos vesicobolhosos, pustulares epidérmicos. As amostras das narinas foram coletadas pelos próprios tutores com auxílio de *swabs*, sob supervisão da pesquisadora.

Após a coleta, as amostras eram imediatamente transportadas ao laboratório para cultivo e identificação.



Este estudo foi aprovado pela Comissão de ética na utilização de animais (CEUA) sob o protocolo n° 055/18, e pelo Comitê de ética em pesquisas com seres humanos (CEP) sob o número de parecer 2.980.894.

### **Cultivo e identificação de *S. pseudintermedius***

As amostras foram enriquecidas em caldo BHI (Oxoid®) por 12 horas a 37°C e após semeadas em ágar Baird-Parker (Oxoid®) com incubação a 37°C por 24 horas.

Três colônias de aspecto típico, negras rodeadas ou não por halo de lecitinase, foram ressemeadas em ágar Baird-Parker (Oxoid®) e incubadas a 37°C por 24 horas. As colônias puras foram testadas fenotipicamente para produção das enzimas coagulase e catalase e identificadas morfológicamente pela coloração de Gram. Colônias que apresentaram características fenotípicas de estafilococos coagulase positiva eram analisadas genotipicamente pela técnica de PCR para identificação de *S. pseudintermedius* e paralelamente congeladas em leite UHT (Ninho®, Nestlé) em ultrafreezer a -80°C. O descongelamento posterior, para extração de DNA, identificações por PCR e testes de sensibilidade aos antimicrobianos, foi realizado em temperatura ambiente.

Foi utilizada a termo-extração para a obtenção do DNA. Uma alçada de colônias crescidas em ágar Baird-Parker (Oxoid®) foi transferida para 100 µL de TE (10mM Tris HCl, 5mM EDTA, pH 8,0) em microtubo de 1,5mL, que era em seguida, aquecido a 90°C por 15 minutos para liberação do DNA no meio. O material era congelado totalmente por aproximadamente 30 minutos e depois de descongelado em temperatura ambiente, era homogeneizado em vórtex e centrifugado a 14000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante que continha o DNA era coletado com pipeta de 20µL e estocado a -20°C.

Para a identificação de *S. pseudintermedius* foram utilizados primers previamente descritos por Sasaki et al. (2010) (18), que utiliza a identificação do gene *nuc* (F2 TRGGCAGTAGGATTCGTAA; R5 CTTTTGTGCTYCMTTTTGG). As reações foram preparadas utilizando-se 12,5µL de GoTaq® Green Master Mix, 2,5µL do *primer* (10 pmol/µL), 7 µL de água da GoTaq® Green e 3µL de DNA total. A amplificação aconteceu nas seguintes condições: um ciclo de desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos; seguido de 35 ciclos (desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 56°C por 35 segundos e extensão a 72°C

por 1 minuto) e extensão final a 72°C por 2 minutos. Em seguida realizou-se a eletroforese em gel de agarose 1,5% com marcador molecular de 100 bp em 80V, 80 mA, 100 W por 120 minutos (Thermo Scientific®). Após resolução do gel utilizou-se o transluminador (L-PIX EX®) para a captura da imagem sob luz UV em câmara escura. A presença de uma banda de peso molecular de 926 pares de bases (926 pb) identificava a amostra como *S. pseudintermedius*.

Como controle positivo foi utilizada a cepa MRSP 3279 de *S. pseudintermedius* e como controle negativo uma reação de amplificação sem acréscimo de DNA.

### **Genes *mecA*, *mecA1*, *mecA2*, *msrA*, *fnbB* e leucotoxina PVL**

Os genes foram determinados apenas nas amostras onde *S. pseudintermedius* foi indentificado nos cães e em seus tutores.

Utilizou-se o mesmo DNA previamente extraído e as amplificações foram realizadas utilizando-se 12,5µL de GoTaq® Green Master Mix, 2,5µL de *primer* de cada um dos genes (10 pmol/µL) (tabela 1), 7µL de Água da GoTaq® Green e 3µL de DNA total.

A amplificação aconteceu nas seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de amplificação (desnaturação a 94°C por 2 minutos, anelamento a 53°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1 minuto) e extensão final a 72°C por 7 minutos.

Após resolução do gel utilizou-se o transluminador (L-PIX EX®) para a captura da imagem sob luz UV em câmara escura e a presença de cada gene determinada pelo tamanho das bandas em pb conforme a tabela 1.

### **Sensibilidade aos antimicrobianos**

#### *Teste de difusão em discos*

*S. pseudintermedius* (cães e tutores) foram descongeladas e reativadas em caldo BHI (Oxoid®) por 12 horas a 37°C. Após, foram semeadas em agar TSA (BD®) e incubadas por 24 horas a 37°C. Três colônias foram coletadas com alça estéril e homogeneizadas em solução de NaCl 0,9% estéril até turvação equivalente a 0,5 na escala de MacFarland (19) e posteriormente semeadas em ágar Mueller-Hinton (Oxoid®) (MH). Após secagem foram adicionados os discos

dos antimicrobianos: oxacilina (1µg-Cefar®), gentamicina (10µg-Cefar®) e cefovecina (30µg- Oxoid®). Após 18 horas de incubação a 35°C, os halos foram medidos e os resultados comparados aos valores de referência indicados pelo CLSI (2019) (19) e classificadas como sensíveis, resistência intermediária ou resistente.

### *Concentração Inibitória Mínima (CIM)*

O mesmo cultivo reativado e ajustado utilizado para o teste de disco difusão foi utilizado para a realização do MIC, que foi determinado para os antimicrobianos Aminoglicosídeo gentamicina (Novafarma®) e os β- lactâmicos oxacilina (Novafarma®) e cefovecina (Convenia®, Zoetis).

Utilizou-se o método de microdiluição em caldo Mueller- Hinton (Oxoid®)(MH) cátion ajustado com 0,37g/100ml de Ca<sup>2+</sup> e 0,835g/100ml de Mg<sup>2+</sup>. As concentrações testadas foram 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 µg.mL<sup>-1</sup> para os diferentes antimicrobianos. Os pontos de corte de resistência para *S. pseudintermedius* foram: gentamicina ≥16, oxacilina ≥ 0,5 e cefovecina ≥2 (CLSI, 2019).

Para análise foram adicionados 180 µL de caldo MH (Oxoid®) ajustado em placas de microdiluição de 96 poços contendo os antimicrobianos alvos nas concentrações previamente estabelecidas. Após foi adicionado 20 µL da suspensão bacteriana ajustada (CLSI, 2019).

As placas foram incubadas a 35°C por 18 horas para as amostras de gentamicina e cefovecina e por 24 horas para a oxacilina (19). Após esse período foi realizada a leitura visual, sendo definido como a CIM a menor concentração do antimicrobiano na qual não foi observado crescimento visível da bactéria, pela ausência de turvação do meio.

### **Análise dos resultados**

Os dados foram tabulados e submetidos a estatística descritiva.

Para avaliar a associação entre positividade em cães e tutores e a influência dos fatores de risco “local de banho” e “local onde o animal dorme” foi utilizado o teste do Q-quadrado ( $p < 0,05$ ) seguido pela avaliação da razão de Odds (RO) (20).

Para determinar se havia correlação entre a presença de genes de resistência e virulência em cães e tutores foi utilizado o Teste de Person ( $p < 0,05$ ). A classificação da associação foi estabelecida de acordo com o valor de  $r$  Mukaka (2012) (21): muito forte (0,9 a 1,0), forte (0,7 a 0,9), moderada, (0,5 e 0,7), fraca (0,3 a 0,5), insignificante ou inexistente (0,3 a 0,0).

A associação entre os resultados da susceptibilidade para oxacilina e cefovetina pelo método de difusão em discos e concentração inibitória mínima (padrão ouro) foi realizada pelo teste do Q-quadrado ( $p < 0,05$ ). Também foram calculadas a sensibilidade, especificidade, valor preditivo e negativo e likelihood odds (20).

Os cálculos foram realizados com o auxílio do programa Graphpad prism 8.3.

## RESULTADOS

### Identificação de *S. pseudintermedius* (SP)

As 100 amostras clínicas dos cães e seus tutores resultaram em um total de 289 colônias, que foram testadas para a presença de SP. Dentre colônias proveniente de cães e tutores, 96/153 (62,94%) e 96/136 (38,97%), respectivamente, foram positivas para SP.

A prevalência de isolamentos de SP nos cães foi de 38/50 (76%) e nos tutores de 28/50 (56%), já a identificação simultânea em amostras de cães e de seus tutores ocorreu em 24/50 (48%) dos casos.

Em 13/50 (6,5%) dos casos, SP foi identificado no cão, mas seu tutor foi negativo, e em 4/40 (8,0%) aconteceu o inverso, o tutor foi positivo e o cão negativo.

Houve associação positiva entre a presença de SP no cão e em seu tutor, havendo cinco vezes mais chance de um humano adquirir esta bactéria se estiver em contato com um cão positivo ( $p < 0,05$ , RO= 5).

### Susceptibilidade *in vitro* a oxacilina e cefovecina e presença do gene *mecA*

Dos 38 cães positivos para SP na pele ou orelha foram obtidas 47 cepas, onde 11 (23,40%) foram resistentes a oxacilina pelo teste de difusão em discos.

Dessas, em 4/11 (36,36%) o gene *mecA* foi identificado. Com o uso do MIC, 14/47 (29,78%) mostraram-se resistentes a oxacilina, e destas, 4/14 (28,57%) cepas foram positivas para o gene *mecA*.

Sete dentre as 11 cepas (63,63%) que apresentaram resistência a oxacilina no teste com discos e 10/14 (71,42%) no CIM não carregavam o gene *mecA*. Em contrapartida, 2/36 (5,56%) amostras sensíveis a oxacilina no teste de discos e 1/33 (3,03%) no MIC foram positivas para o gene *mecA*.

Das 44 cepas isoladas de 28 tutores, 7 (15,90%) foram resistentes a oxacilina no teste de difusão em disco, sendo 3/7 (42,85%) positivas para o gene *mecA*. No CIM, 23/44 (52,27%) foram resistentes, e em 5/23 (21,74%) detectada a presença do gene *mecA*. Já 2/44 (4,5%) isolados sensíveis a oxacilina em ambos os testes *in vitro* foram positivos para o gene *mecA*.

Apenas 5/47 (10,64%) cepas de SP isoladas de cães foram positivas para algum gene *mecA*, havendo duas cepas positivas para os genes *mecA* e *mecA1*, duas para os genes *mecA*, *mecA1* e *mecA2* e uma positiva para o gene *mecA2*. Das cepas isoladas dos tutores, 5/44 (11,36%) foram positivas para algum gene *mecA*, e dessas, três foram positivas para os genes *mecA* e *mecA1*, uma para *mecA*, *mecA1* e *mecA2* e uma para o gene *mecA1*. Em duas cepas, sensíveis no teste de difusão e resistentes no MIC o gene *mecA* foi identificado.

Dos SP isolados de cães, 4/47 (8,15%) demonstraram resistência a cefovecina no teste de difusão em discos e 11/47 (23,40%) no MIC. Já nos 44 isolados de tutores, a resistência foi de (3/44) 6,81% e (16/44) 36,36% no teste de difusão em discos e CIM, respectivamente.

Para as cepas resistentes a oxacilina em testes fenotípicos (conjunto de isolados dos cães e tutores) houve fraca correlação entre resistência para oxacilina no teste de difusão em disco e a presença do gene *mecA* ( $p < 0,05$ ;  $r=0,430$ ), e essa correlação foi insignificante para o CIM ( $p < 0,05$ ;  $r=0,294$ ). Ou seja, a resistência para a oxacilina *in vitro*, não foi parâmetro importante ou único de identificação para o gene *mecA*.

Em 42/47 (89,36%) isolados de cães foi relatado o uso anterior de algum antimicrobiano, sendo 29/42 (69,04%) da classe dos  $\beta$ -lactâmicos. Houve correlação moderada entre o uso prévio de algum antimicrobiano da classe dos  $\beta$ -lactâmicos e a resistência, tanto no teste de sensibilidade com discos ( $p < 0,05$ ;  $r=0,682$ ) como no CIM ( $p < 0,05$ ,  $r=0,694$ ) para a oxacilina.

### **Susceptibilidade *in vitro* a gentamicina e presença do gene *msrA***

Nenhum SP isolado de cão foi resistente a gentamicina no teste de difusão com discos, já no CIM, 1/47 (2,12%) demonstrou resistência.

Dentre os isolados de tutores 2/44 (4,55%) foram resistentes a gentamicina no teste de difusão em discos e 4/44 (9,09%) no MIC.

Não houve correlação entre os valores de MIC de SP isoladas dos cães e de seus tutores para a gentamicina ( $p < 0,05$ ).

O gene *msrA* foi identificado em 2/47 (4,25%) dos isolados dos cães e em 2/44 (4,54%) dos tutores. Não houve correlação entre a presença dos genes *mrsA* em cães e em seus tutores ( $p < 0,05$ ).

### **Gene *fnbB* e produtor de PVL (Panton–Valentine leucocidin)**

O gene *fnbB* foi identificado em apenas 4/91 (4,39%) isolados, destes, 3 (75%) foram de cães e 1 (25%) de tutor, havendo fraca correlação entre a presença deste gene em isolados do cão e do tutor ( $p < 0,05$ ,  $r = 0,563$ ).

O gene produtor de PVL não foi identificado em nenhum SP isolado de amostras do cão ou de seu tutor.

### **Associação entre hábitos de vida e presença de SP nos cães e tutores**

A associação entre o local onde o cão dorme (se com o tutor ou cama própria) e o isolamento de SP nos cães e tutores não representou fator de risco para a colonização em humanos ( $p = 0,3869$ ,  $RO = 1,857$ ). No entanto, observamos que cães que dormem com humanos positivos para SP tem seis vezes mais chance de se tornar positivo para SP do que aqueles que dormem em cama própria ( $p = 0,0264$ ,  $RO = 6$ ).

Quanto ao local de banho do cão, observamos que este não é um fator que interfere na positividade do tutor para SP ( $p = 0,7734$ ,  $RO = 0,7618$ ), entretanto cães que tomam banho em banho e tosa, apesar da associação não significativa, ( $p = 0,0519$ ) tem quatro vezes mais chance ( $RO = 4,091$ ) de serem colonizados por SP do que os que tomam banho em casa.

## **Testes fenotípicos *in vitro* para determinar a susceptibilidade de SP a oxacilina, cefovetina e gentamicina**

Os índices obtidos para o teste de difusão em discos quando comparado ao padrão-ouro (CIM) estão descritos na tabela 2.

## **DISCUSSÃO**

### **Identificação de *S. pseudintermedius***

A prevalência de SP em amostras de cães é variável, contudo a maior parte dos estudos mostra percentuais entre 80 e 91% de positividade para esta bactéria (22, 23, 24, 25, 26). Estes autores consideram que SP é a bactéria mais prevalente na pele de cães hígidos e também naqueles com infecções.

Nossos resultados mostram prevalência de 76% em amostras clínicas de cães, maior que a descrita por Ruzauskas et al. (2016) (27) e por Scherer et al. (2018) (28) que foi de 26,6% e 59,6%, respectivamente. Porém, todos os animais em nosso estudo apresentavam infecção na pele ou na orelha, o que pode ter determinado a maior prevalência.

Um resultado que chamou atenção nesse estudo foi a alta prevalência desta bactéria nos tutores. Apesar de com o passar dos anos muitos casos de infecção em humanos por SP terem sido reportados (13, 29, 17, 9), a condição de portador atribuída aos humanos é considerada como eventual, já que essa bactéria não faz parte da microbiota nasofaríngea natural do homem. Assim como em nosso estudo, na maioria dos casos reportados houve contato prévio com cães (30, 24, 9).

Hanselman et al. (2009) (24) avaliaram a colonização de veterinários por SP e verificaram que 50% desses profissionais carregavam essa bactéria em suas narinas, sugerindo que o contato mais estreito com cães resultaria nessa condição. Em contrapartida, van Duijkeren et al. (2011) (9) demonstraram que apenas 4% dos 45 tutores de animais com infecção clínica causada por SP também apresentavam essa bactéria em suas narinas. Nossos resultados corroboram com a maior parte dos autores (30, 24, 9), que também observaram que a chance de um tutor adquirir esta bactéria é maior se estiver em contato com um cão positivo para SP.

### **Susceptibilidade *in vitro* a oxacilina e cefovecina e presença do gene *mecA***

A resistência de *Staphylococcus* a meticilina (oxacilina) em testes *in vitro* é um forte indício da presença do gene *mecA*, que está localizado no elemento genético móvel *SCCmec* (31, 32, 33).

*S. pseudintermedius* resistente a meticilina é conhecido como MRSP, (34, 35, 36) e ganhou notoriedade a partir de sua alta prevalência como agente etiológico de infecções graves em várias espécies, como cães, gatos, cavalos, pombos, jumentos e homem (5, 37, 17, 38, 39). É também considerada uma bactéria complicadora em hospitais veterinários (40).

Em nosso estudo, MRSP foi identificado em menos de 50% das amostras dos cães e de seus tutores, concordando com estudos prévios. Em cães com infecções clínicas, a prevalência de MRSP foi bastante diversa, com relatos variando entre 2% e 94,28% (42, 42, 25, 43, 28).

Parte dos isolados de cães (7/11-63,63%) e de tutores (10/14-71,42%) que foram resistentes a oxacilina não carregavam o gene *mecA* e a correlação entre resistência a oxacilina determinada nos dois testes de susceptibilidade *in vitro* e a presença desse gene foi baixa ou insignificante. Acreditamos que essa resistência possa ter ocorrido por outro(s) mecanismo(s), como por exemplo, pela produção de  $\beta$ -lactamases, mecanismo já descrito como importante em SP por outros autores (44, 45, 8).

A cefovecina é um antimicrobiano  $\beta$ -lactâmico, cefalosporina de terceira geração e de longa ação, especialmente criado para uso em cães e gatos (46). Os relatos na literatura apontam para uma boa sensibilidade das cepas de *S. pseudintermedius* a este antimicrobiano (47, 48), assim como o observado em nosso estudo.

A resistência a cefovecina determinada por CIM nas cepas de SP isoladas de humanos foi superior a observada nas cepas isoladas dos cães. Este resultado não era esperado, já que a cefovecina não é um antimicrobiano utilizado em humanos. Acreditamos que a resistência nas cepas isoladas de tutores possa ter ocorrido pela condição dessas serem originalmente adquiridas de cães.

A associação entre a resistência a cefovecina mediada pelo gene *mecA* e testes *in vitro*, como as técnicas de difusão em discos e CIM, tem sido



investigada. Iyori et al. (2013) (47) demonstraram haver correlação positiva entre essas variáveis, ou seja, a resistência *in vitro* para a cefovecina é forte indicativo da presença do gene *mecA* nos testes genéticos; porém, no presente estudo observamos baixa correlação entre esses eventos para o teste de difusão com disco e nenhuma correlação com o CIM.

Investigação de infecções humanas por MRSP demonstrou que em 21/22 (95,4%) dos casos havia a presença de cão na residência e concluiu que a transmissão ao homem aconteceu pelo contato com o cão (10). Porém, poucos estudos comparam a colonização de tutores por MRSP simultaneamente com sua presença em cães. Nesse estudo, determinamos que cães e seus tutores apresentaram percentuais de MRSP mais próximos, assim como descrito por Findik et al (2018) (26), sugerindo também, que o contato com os cães é mesmo um fator de risco para que o homem se torne carreador desta bactéria. Contudo, para a presença dos genes *mecA*, *mecA1*, *mecA2*, essa relação não foi importante, já que a correlação entre a presença concomitante desses genes em cepa isolada do cão e no seu tutor foi fraca ou insignificante, assim como, a correlação entre a resistência das cepas dos cães e dos tutores à oxacilina e a cefovecina determinada pelo CIM. Acreditamos que algumas situações possam ter ocorrido para justificar esses resultados: i) a troca de informação genética entre as cepas não aconteceu de forma ativa; ii) houve perda de genes de resistência pelas bactérias no processo de transmissão do cão para o tutor ou vice-versa; iii) diferenças genotípicas nos isolados de *S. pseudintermedius* de cães e tutores persistentemente colonizados refletiram na susceptibilidade antimicrobiana (49).

O uso de antimicrobianos é considerado fator de risco para o aumento de resistência de SP (50, 51, 52,53, 54), sendo esse fato também observado por nós para os antimicrobianos da classe dos  $\beta$ -lactâmicos. Contudo, a correlação entre o uso de antimicrobianos e resistência foi moderada, sugerindo mais uma vez, que outros fatores podem estar influenciando nessa relação.

### **Susceptibilidade *in vitro* a gentamicina e presença do gene *msrA***

A boa sensibilidade *in vitro* de *S. pseudintermedius* a gentamicina, apesar de ser uma droga muito utilizada tanto no tratamento das otites como em uso tópico nas piodermites, vem sendo demonstrada por outros estudos ao longo

dos anos (55, 56, 57, 28), inclusive por CIM (58). Em contraste, Nienhoff et al. (2011) (59) dectaram mais de 70% de cepas de SP resistentes, também por análises de CIM e Proetti et al. (2012) (60) encontraram 100% de resistência em 70 cepas de SP em testes de difusão por discos. Nosso estudo está de acordo com a maioria dos autores citados, já que foi observado baixo percentual de resistência tanto nos isolados de cães como de tutores. Não houve correlação entre os valores de CIM entre SP isolados de cães e de seus tutores para este antimicrobiano, assim como observado para oxacilina e cefovecina. É provável que cepas de humanos e cães sofram pressão de seleção diferentes, resultando em características de resistência também diversas.

O gene *msr(A)* decodifica o “transportador ABC” e metilase de rRNA que podem conferir resistência aos antimicrobianos estreptogramina B e macrolídeos (61, 62). Poucos são os estudos que demonstraram a presença de genes que conferem resistência para cepas de SP aos macrolídeos (63, 40), e no geral outros genes são mais estudados (*ermA* e *ermB*, por exemplo) (60). Nesse estudo encontramos um pequeno número de cepas que possuíam esse gene e não foi encontrado na literatura consultada trabalhos que mencionem a prevalência do gene *msrA* em SP de cães com piodermite ou otite.

### **Genes que decodificam fatores de virulência (PVL e *fnbB*)**

*S. pseudintermedius* produz uma leucotoxina conhecida como *Luk-I*, semelhante ao PVL (Panton–Valentine leucocidin) produzida por *S. aureus*. Essa leucotoxina é bastante citotóxica, principalmente aos polimorfonucleares, causando destruição desses leucócitos (2). A importância do PVL em *S. pseudintermedius* já foi demonstrada, sendo identificada em mais de 95% das cepas avaliadas por outros autores (64, 65, 66). Gomez-Sanza et al (2011) (67) demonstraram a presença desta leucotoxina em 100% dos isolados de cães sem infecção clínica, contudo, em estudos conduzidos na Suíça e Bélgica foi observado 100% de cepas negativas para o PVL (68, 69). Assim como estes autores, não identificamos nenhuma amostra positiva para o PVL, mostrando baixa capacidade de produzir esta leucotoxina.

As proteínas ligadoras de fibronectina expressas pelas bactérias são importantes fatores de adesão celular, pois promovem a interação entre o patógeno e a célula hospedeira, e sua ação é essencial como primeiro e decisivo

passo no estabelecimento de um biofilme bacteriano (70). Os genes *fnbA* e *fnbB* codificam proteínas de ligação à fibronectina (71, 72), sendo esses genes já identificados em várias espécies de bactérias do gênero *Staphylococcus* (73).

No presente estudo avaliamos a prevalência do gene *fnbB*, gene que estimula a fagocitose bacteriana(74), porém não encontramos na literatura estudos prévios que descrevessem a prevalência do gene *fnbB* em SP isolados de cães com infecção clínica, apenas em bovinos com mastite. Assim como para os demais genes avaliados nesse estudo, observamos uma fraca correlação entre a presença desse gene em cães e em tutores.

A baixa prevalência do gene *fnbB* e a ausência de PVL nos isolados de cães não era esperada, já que as amostras analisadas eram provenientes de cães com histórico de doença reicidivante. Dessa forma, esperava-se que as cepas, apresentassem altos percentuais de resistência, além de genes que conferem maior virulência.

### **Associação entre hábitos de vida e presença de SP nos cães e tutores**

Apesar de demonstrarmos que o contato do homem com um cão positivo para SP o torna cinco vezes mais susceptível a tornar-se carreador desta bactéria, o fato de dormir com o cão não foi um fator que aumentou a chance de colonização do tutor por SP. Contudo, dormir com um tutor colonizado por SP, aumenta em seis vezes a chance do cão se tornar positivo em comparação àqueles que dormem em cama própria. Acreditamos que a depender de condições específicas ligadas a imunidade do tutor e capacidade de adesão e colonização de algumas cepas, o tutor poderia estar exercendo o papel de reservatório desta bactéria para o cão. Hanselman et al. (2009) (24) avaliaram a colonização de veterinários por SP e observaram que 50% desses profissionais carreavam SP em suas narinas, sugerindo, portanto, que o contato contínuo com cães resultaria nessa condição de portador.

Determinamos que os cães que tomavam banho em “banho e tosa” tiveram quatro vezes mais chance de serem colonizados por SP do que os que tomavam banho em casa, acreditamos que o contato com outros cães, com o ambiente e com os profissionais que cuidavam desses cães possam ser fatores que favoreçam a manutenção da colonização desses cães por SP.

## **Testes fenotípicos *in vitro* para determinar a susceptibilidade de SP a oxacilina, cefovetina e gentamicina**

O teste de diagnóstico fornece os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo, que são indicadores da viabilidade de um método de análise. Comparar os resultados do teste de difusão em discos, que são popularmente utilizados na maioria dos laboratórios comerciais com os resultados da CIM, considerado o padrão-ouro, pode auxiliar a prática clínica de veterinários, principalmente os de pequenos animais.

Os resultados de sensibilidade e especificidade mostraram que o método de difusão em disco, apesar de simples, barato e de fácil execução, não é uma boa opção para determinar cepas resistentes a esses antimicrobianos. Esse método, apesar de possuir boa especificidade, ou seja, conseguir identificar as cepas verdadeiramente resistentes, pode resultar em um maior número de falsos negativos e classificar cepas resistentes como sensíveis (20).

A comparação dos testes para identificar resistência à gentamicina só permitiu o cálculo da especificidade, já que a sensibilidade foi igual a zero, devido ao número muito baixo (5/91) de cepas resistentes no padrão ouro. Desta forma, este resultado deve ser interpretado com ressalvas e deve ser avaliado em um número maior de cepas. Além disso, a probabilidade ( $p > 0,999$ ) indicou que não houve nenhuma associação entre os resultados dos dois testes.

Na avaliação da resistência antimicrobiana, é ideal que os testes tenham alta sensibilidade, para que o número de cepas falsamente classificadas como sensíveis seja também baixo. Utilizar um antimicrobiano a que a bactéria é resistente levará a uma maior pressão de seleção para essas cepas resistentes, além de resultar em insucesso no tratamento ou recidivas (75, 76).

## **CONCLUSÕES**

Houve alta prevalência de isolamentos de SP em amostras de cães, de tutores e de ambos concomitante, sendo o contato com cães positivos fator de

risco para a colonização de humanos, o que demonstra seu potencial zoonótico. Os principais fatores de risco para infecção de cães por SP foi dormir com um tutor positivo e frequentar “banho e tosa”. Os riscos devem ser continuamente avaliados, pois houve baixa correlação entre a presença dos genes *mecA*, *mecA1*, *mrsA* e *fnbB* nos isolados dos cães e seus tutores.

Os isolados demonstraram baixos índices de resistência a oxacilina e cefovecina, e a presença do gene *mecA* não foi o mecanismo mais importante. O uso prévio de  $\beta$ -lactâmicos influenciou moderadamente a resistência das cepas. A resistência dos isolados a gentamicina foi baixo, mostrando-se um antimicrobiano com bom desempenho para casos de otites e piodermites em cães.

O método diagnóstico de difusão em discos não foi um bom método para identificar cepas resistentes à oxacilina e cefovecina.

## REFERÊNCIAS

1. Drevriese LA, Vancanneyt M, Baele M, Vaneechoutte M, De Graef E, Snauwaert C, Cleenwerck I, Dawyndt P, Swings J, Decostere A, Haesebrouck F. 2005. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. Int J Syst Evol Microbiol 55: 1569–1573. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16014483>
2. Futagawa-Saito K, Makino S, Sunaga F, Kato Y, Sakurai-Komada N, Ba-Thein W, Fukuyasu T. 2009. Identification of first exfoliative toxin in *Staphylococcus pseudintermedius*. FEMS Microbiol Lett 301: 176–80. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01823.x>
3. Wladyka B, Bista M, Sabat AJ, Bonar E, Grzeszczuk S, Hryniewicz W, Dubin A. 2008. A novel member of the thermolysin family, cloning and biochemical characterization of metalloprotease from *Staphylococcus pseudintermedius*. Acta Biochim Pol, 55: 525–536. DOI: [10.18388/abp.2008\\_3059](https://doi.org/10.18388/abp.2008_3059)
4. Breathnach RM, Baker KP, Quinn PJ, McGeady TA, Aherne CM, Jones BR. 2005. Clinical, immunological and histopathological findings in a subpopulation of dogs with pododermatitis. Vet Dermatol 16: 364–372. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16359303>

5. Ruscher C, Lübke-Becker A, Wleklinski CG, Soba A, Wieler LH, Walther B. 2009. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from clinical samples of companion animals and equidae. Vet Microbiol 136: 197–201. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19097710>
  
6. Frank LA, Loeffler A. 2012. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*: clinical challenge and treatment options Vet Microbiol 23: 283–e56. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19097710>
  
7. Fitzgerald J. 2009. The *Staphylococcus intermedius* group of bacterial pathogens: species reclassification, pathogenesis and the emergence of methicillin resistance. Vet Dermatol 5–6: 490–5. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00828.x>
  
8. Kadlec K, Schwarz S, Perreten V, Andersson UG, Finn M, Greko C, Moodley A, Kania SA, Frank LA, Bemis DA, Franco A, Iurescia M, Battisti A, Duim B, Jaap AW, van Duijkeren E, Weese JS, Fitzgerald JR, Rossano A, Guardabassi L. 2010. Molecular analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* of feline origin from different European countries and North America. J Antimicrob Chemother 65: 1826–1828. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq203>
  
9. van Duijkeren E, Kamphuis M, van der Mije IC, Laarhoven LM, Duim B, Wagenaar JA, Houwers DJ. 2011. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* between infected dogs and cats and contact pets, humans and the environment in households and veterinary clinics. Vet Microbiol 150: 338–343. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21420256>
  
10. Somayaji R, Priyantha MAR, Rubin JE, Church D. 2016. Human infections due to *Staphylococcus pseudintermedius*, an emerging zoonosis of canine origin: report of 24 cases. Diagn Microbiol Infect Dis 85: 471–476. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0732889316301304>
  
11. Talan DA, Goldstein E, Staats D, Doores G. 1989. *Staphylococcus intermedius*: clinical presentation of a new human dog bite pathogen. Ann Emerg Med 18: 410–413. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0196064489805827>

12. Barnham M, Holmes B. 1992. Isolation of CDC group M-5 and *Staphylococcus intermedius* from infected dog bites. J Infect 25:332–334. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1474272>
13. Kempker R, Mangalat D, Kongphet-Tran T, Molly E. 2009. Beware of the pet dog: a case of *Staphylococcus intermedius* infection. Am J Med Sci 338: 425–427. DOI: [10.1097/MAJ.0b013e3181b0baa9](https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e3181b0baa9)
14. Guardabassi L, Loeber ME, Jacobson A. 2004. Transmission of multiple antimicrobial-resistant *Staphylococcus intermedius* between dogs affected by deep pyoderma and their owners. Vet Microbiol 98: 23–27. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14738778>
15. Vincze S, Paasch A, Walther B, Ruscher, Becker A, Wieler L, Kohn B. 2010. Multidrug- and methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* as a cause of canine pyoderma: a case report. Berl Much Tierarztl Wochenschr 123: 353–358. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21038805>
16. Soedarmanto I, Kanbar T, Ulbegi-Mohyla H, Hijazin M, Alber J, Lammler C, Akineden O, Weiss R, Moritz A, Zschock M. 2011. Genetic relatedness of methicillin- resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) isolated from a dog and the dog owner. Res Vet Sci 91: e25–e27. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21353270>
17. Paul NC, Moodley A, Ghibaud G, Guardabassi L. 2011. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in small animal veterinarians: indirect evidence of zoonotic transmission. Zoonoses Public Health 58: 533–539. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1863-2378.2011.01398.x>
18. Sasaki T, Tsubakishita S, Tanaka Y, Sakusabe A, Ohtsuka M, Hirota S, Kawakami T, Fukata T, Hiramatsu K. 2010. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. J. Clin. Microbiol 48 3:765-769. <https://jcm.asm.org/content/48/3/765.short>
19. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty nine Informational Supplement. CLSI document CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty nine Informational Supplement. CLSI document M100-S29. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2019.
20. Thrusfield M. Veterinary epidemiology. 3ed. Blackwell Science Ltda. 2007.626p.

21. Mukaka M. 2012. Statistics corner: A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. *Malawi Med J* 24 3: 69-71. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23638278>
22. Griffeth GC, Morris DO, Abraham JL, Shofer FS, Rankin SC. 2008. Screening for skin carriage of methicillin-resistant coagulase-positive staphylococci and *Staphylococcus schleiferi* in dogs with healthy and inflamed skin. *Vet Dermatol* 19: 142–149. doi: [10.1111/j.1365-3164.2008.00663.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2008.00663.x).
23. Fazakerley J, Nuttall T, Sales D, Schmidt V, Carter SD, Hart CA, McEwan, NA. 2009. Staphylococcal colonization of mucosal and lesional skin sites in atopic and healthy dogs. *Vet Dermatol* 20: 179–184. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00745.x>
24. Hanselman BA, Kruth SA, Rousseau J, Weese JS. 2009. Coagulase positive staphylococcal colonization of humans and their household pets. *Can Vet J* 50: 954–958. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19949556>
25. Botoni LS, Scherer CB, Silva RO, Coura FM, Heinemann MB, Paes-Leme FO, Costa-Val AP. 2016. Prevalence and *in vitro* susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) from skin and nostrils of dogs with superficial pyoderma. *Pesq. Vet. Bras.* 36 12:1178-1180. DOI: [10.1590/S0100-736X2016001200006](https://doi.org/10.1590/S0100-736X2016001200006)
26. Findik A, Çiftci A, Önyay T, Sezener MG, Koçak Y, Gülhan T. 2018. Determination of methicillin resistance and some genotypic characteristics of staphylococci isolated from dogs and their owners. *Turk J Vet Anim Sci* 42: 549-555. DOI: [10.3906/vet-1611-50](https://doi.org/10.3906/vet-1611-50)
27. Ruzauskas M, Couto N, Pavilonis A, Klimiene I, Siugzdiniene R, Virgailis M, Vaskeviciute L, Anskiene L, Pomba C. 2016. Characterization of *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from diseased dogs in Lithuania. *Pol J Vet Sci* 19 1: 7-14. <https://doi.org/10.1515/pjvs-2016-0002>
28. Scherer CB, Botoni LS, Coura FM, Silva RO, dos Santos RD, Heinemann MB, Costa-Val AP. 2018. Frequency and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus pseudintermedius* in dogs with otitis externa *Cienc Rural* 48:04. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170738>
29. Stegmann R, Burnens A, Maranta CA, Perreten V. 2010. Human infection associated with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71. *J Antimicrob Chemother* 65:2047–2048. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq241>



30. Frank LA, Kania SA, Kirzeder EM, Eberlein LC, Bemis DA. 2009. Risk of colonization or gene transfer to owners of dogs with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Vet Dermatol* 20: 496–501.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20178487>
31. Zhang K, McClure JA, Elsayed S, Louie T, Conly JM. 2005. Novel multiplex PCR assay for characterization and concomitant subtyping of staphylococcal cassette chromosome *mec* types I to V in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol* 43: 5026–33.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16207957>
32. Kwon N, Park KT, Jung WK, Youn HY, Lee Y, Kim SH, Bae Y, Lim JY, Kim JY, Kim JM, Hong SK, Park YH. 2006. Characteristics of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolated from chicken meat and hospitalized dogs in Korea and their epidemiological relatedness. *Vet Microbiol* 117:304–312.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16806746>
33. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty Second Informational Supplement. CLSI document M100-S22. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
34. Sasaki T, Kikuchi K, Tanaka Y, Takahashi N, Kamata S, Hiramatsu K. 2007. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a veterinary teaching hospital. *J Clin Microbiol* 45: 1118–1125.  
<https://jcm.asm.org/content/45/4/1118.short>
35. Hnilica KA. 2012. Doenças de pele bacterianas. *In: Dermatologia de pequenos animais: Atlas colorido e Guia Terapêutico – 3ed.* – Rio de Janeiro: Elsevier, Cap. 3, p. 41-47.
36. Miller WH, Griffin CE, Campbell KL. 2013. Muller and Kirk's Small Animal Dermatology. Elsevier, 7ed. p. 184-223.
37. Haenni M, Targant H, Forest K, Haenni M, Targant H, Forest K, Sévin C, Tapprest J, Laugier C, Madec JY. 2010. Retrospective study of necropsy-associated coagulase-positive staphylococci in horses. *J Vet Diagn Invest* 22:953–956.  
<https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/104063871002200617>
38. Bannoehr J, Guardabassi L. 2012. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Vet Dermatol* 23:253–66.  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-3164.2012.01046.x>

39. Beever L, Graham PA, Jackson B, Lloyd DH, Loeffler A. 2015. Increasing antimicrobial resistance in clinical isolates of *Staphylococcus intermedius* group bacteria and emergence of MRSP in the UK. *Vet Rec* 176:172. <https://veterinaryrecord.bmj.com/content/176/7/172>
40. Perreten V, Kadlec K, Schwarz S, Andersson UG, Finn M, Greko C, Moodley A, Kania SA, Frank LA, Bemis DA, Franco A, Lurescia M, Battisti A, Duim B, Wagenaar JA, van Duijkeren E, Weese JS, Fitzgerald JR, Rossano A, Guardabassi L. 2010. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. *J Antimicrob Chemother* 65: 6:1145-1154. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq078>
41. De Lucia M, Moodley A, Latronico F, Giordano A, Caldin M, Fondati A, Guardabassi L. 2011. Prevalence of canine methicillin resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a veterinary diagnostic laboratory in Italy. *Research in Veterinary Science* 91: 346–348. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0034528810003218>
42. Bourguignon E, Viçosa GN, Corsini CMM, Moreira MAS, Nero LA, Conceição LG. 2016. Description of Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from canine pyoderma in Minas Gerais state, Brazil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec* 68 2: 299-306. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-8150>
43. Somayaji R, Priyantha MAR, Rubin JE, Church D. 2016. Human infections due to *Staphylococcus pseudintermedius*, an emerging zoonosis of canine origin: report of 24 cases. *Diagn Microbiol Infect Dis* 85: 471 – 476. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0732889316301304>
44. Kania SA, Williamson NL, Frank LA, Wilkes RP, Jones RD, Bemis DA. 2004. Methicillin resistance of staphylococci isolated from the skin of dogs with pyoderma. *Am J Vet Res* 65: 1265–1268. <https://avmajournals.avma.org/doi/abs/10.2460/ajvr.2004.65.1265>
45. Epstein CR, Yam WC, Peiris JS, Epstein RJ. 2009. Methicillin-resistant commensal staphylococci in healthy dogs as a potential zoonotic reservoir for community-acquired antibiotic resistance. *Infect Genet Evol* 9: 283–285. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1567134808002281>
46. EMEA. 2006. EMEA/CVMP/215997/2006. Convenia: Scientific discussion; Accessible under [www.ema.europa.eu](http://www.ema.europa.eu)
47. Iyori K, Toyoda Y, Ide K, Iwasaki T, Nishifuji K. 2013. Usefulness of cefovecin disk-diffusion test for predicting *mecA* gene-containing strains of *Staphylococcus*

- pseudintermedius and clinical efficacy of cefovecin in dogs with superficial pyoderma. Adv. Vet. Dermatol 24 1:162-7.e35-6.  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-3164.2012.01100.x>
48. Hariharan H, Gibson K, Peterson R, Matthew Frankie M, Matthew V, Daniels J, Martin NA, Andrews L, Paterson T, Sharma RN. 2014. *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* Subspecies *coagulans* from Canine Pyoderma Cases in Grenada, West Indies, and Their Susceptibility to Beta-Lactam Drugs. Vet Med Int 14, 7 pages.  
<https://doi.org/10.1155/2014/850126>
  49. Hartmann FA, White DG, West SE, Walker RD, Deboer DJ. 2005. Molecular characterization of *Staphylococcus intermedius* carriage by healthy dogs and comparison of antimicrobial susceptibility patterns to isolates from dogs with pyoderma. Vet Microbiol 108: 119–131.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15917140>
  50. Schwarz S, Noble WC. 1999. Aspects of bacterial resistance to antimicrobial agents used in veterinary dermatological practice. Vet Dermatol 10: 163–176.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-3164.1999.00170.x>
  51. Schwarz S, Chaslus-Dancla E. 2001. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. Vet Res 32: 201–225.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11432414>
  52. Schwarz S, Kehrenberg C, Walsh TR. 2001. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. Int J Antimicrob Agents 17: 431–437. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11397611>
  53. Schwarz S, Cloeckaert A, Roberts MC. 2006. Mechanisms and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents. In: Aarestrup FM, ed. Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. Washington, DC: ASM Press 73-98.  
<https://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555817534.chap6?crawler=true>
  54. Holzbauer S, Chiller T. 2006. Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin. Emerg Infect Dis 12 7: 1180–1181. doi: [10.3201/eid1207.060503](https://doi.org/10.3201/eid1207.060503)
  55. Osland AM, Vestby LK, Fanuelson H, Slettemea°s JS, Sunde M. 2012. Clonal diversity and biofilm-forming ability of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. J Antimicrob Chemother 67: 841–848.  
<https://academic.oup.com/jac/article/67/4/841/860745>
  56. Metiner K, Bagcigil AF, Ilgaz A. 2015. Determination of the diversity and antibiotic resistance profiles of *Staphylococcus* species from dogs with otitis externa and

examination of *mecA* gene occurrence. Vet Med (Praha) 60 5: 261-267. DOI: [10.17221/8178-VETMED](https://doi.org/10.17221/8178-VETMED)

57. Neto SA, Lopes CM. 2015. Estudo retrospectivo da ocorrência, sensibilidade e resistência antimicrobiana in vitro em otopatias caninas na região da Grande Florianópolis – SC, resumo p. 37. Congresso Brasileiro de Dermatologia Veterinária.
58. Rubin JE, Ball KR, Chirino-Trejo M. 2011. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from various animals Can Vet J 52 2: 153-157. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3022451/>
59. Nienhoff U, Kadlec K, Chaberny IF, Verspohl J, Gerlach GF, Kreienbrock L, Schwarz S, Simon D, Nolte I. 2011. Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* among dogs admitted to a small animal hospital. Vet Microbiol 150: 191-197. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113510005912>
60. Proietti PC, Bietta A, Coletti M, Marenzoni ML, Scorza AV, Passamonti F. 2012. Insertion sequence IS256 in canine pyoderma isolates of *Staphylococcus pseudintermedius* associated with antibiotic resistance. Vet Microbiol 157 3-4: 376-382. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113511006687>
61. Boerlin P, Burners AP, Frey J, Kuhnert P, Nicolet J. 2001. Molecular epidemiology and genetic linkage of macrolide and aminoglycoside resistance in *Staphylococcus intermedius* of canine origin. Vet Microbiol 79:155–169. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113500003473>
62. Luthje P, Schwarz S. 2007. Molecular basis of resistance to macrolides and lincosamides among staphylococci and streptococci from various animal sources collected in the resistance monitoring program BfT-GermVet. Int J Antimicrob Agents 29: 528–535. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17307339>
63. Schwarz S, Kadlec K, Strommenger B. 2008. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* detected in the BfT - GermVet monitoring programme 2004 – 2006 in Germany. J Antimicrob Chemother 61 2: 282–285. <https://doi.org/10.1093/jac/dkm487>

64. Gharsa H, Slama KB, Gómez-Sanz E, Lozano C, Klibi N, Jouini A, Messadi L, Boudabous A, Torres C. 2013. Antimicrobial resistance, virulence genes, and genetic lineages of *Staphylococcus pseudintermedius* in healthy dogs in Tunisia. *Microbial Ecology* 66: 363–368. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23686400>
65. Chitra MA, Jayanthi C, Nagarajan B. 2018. Virulence Genes Detection and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus pseudintermedius* Isolates from Canine Skin Infection in Chennai, India. *Proc Natl Acad Sci, Sect. B Biol. Sci* 88 1:355–361. <https://link.springer.com/article/10.1007/s40011-016-0760-9>
66. Meroni G, Martino PA. 2018. Biofilm-forming ability and virulence factors of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* from canine pyoderma. *Proceeding of Veterinary and Animal Science Day 6 th - 8 th June, Milan, Italy*. <https://doi.org/10.13130/2283-3927/10035>
67. Gómez-Sanza E, Torresa C, Lozano C, Sáenz Y, Zarazaga M. 2011. Detection and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in healthy dogs in La Rioja, Spain. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 34: 447–453. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2011.08.002>
68. Descloux S, Rossano A, Perreten V. 2008. Characterization of new staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) and topoisomerase genes in fluoroquinolone- and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *J Clin Microbiol* 46 5:1818–1823. DOI: 10.1128/JCM.02255-07
69. Bardiau M, Yamazaki K, Ote I, Misawa N, Mainil JG. 2013. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs and cats. *Microbiol Immuno* 57 7:496–501. doi: 10.1111/1348-0421.12059
70. Costerton J, Stewart P, Greenberg E. Bacterial Biofilms: a common cause of persistent infection. *Science*, v.284, p.1318- 1322, 1999. <https://science.sciencemag.org/content/284/5418/1318>
71. Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D, Götz F. 1996. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol Microbiol* 20: 1083-1091. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02548.x>
72. Arciola C, Campoccia D, Ravaioli S, Montanaro L. 2015. Polysaccharide intercellular adhesin in biofilm: structural and regulatory aspects. *Front Cell Infect Microbiol* 5: 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00007>

73. Vengadesan K, Sthanam N. 2011. Structural biology of Gram- positive bacterial adhesins. Protein Sci 20:759-772.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21404359>
74. Dowd S, Sun Y, Secor PR, Rhoads DD, Wolcott BM, James GA, Wolcott RD. 2008. Survey of bacterial diversity in chronic wounds using pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. BMC Microbiol 8 1:43.  
<https://link.springer.com/article/10.1186/1471-2180-8-43>
75. Sanchez S, Stevenson MAM, Hudson CR, Maier M, Buffington T, Dam Q, Maurer MM. 2002. Characterization of multidrug- resistant *Escherichia coli* isolates associated with nosocomial infections in dogs. J. Clin. Microbiol 40:3586-3595.  
<https://jcm.asm.org/content/40/10/3586.short>
76. Guardabassi L, Houser GA, Frank LA, Papich MG. 2008. Orientações para o uso de antimicrobianos em cães e gatos, p.224-249. In: Guardabassi L., Jesen L.B. & Kruse H. (Eds), Guia de Antimicrobianos em Veterinária. Artmed, Porto Alegre.  
<http://www.ufrgs.br/bibicbs/livros-novos/guardabassi-guia-de-antimicrobianos-em-veterinaria>

**Anexo 1-** Questionário respondido pelos tutores dos cães com piodermite superficial e/ou otites

**Questionário**

Nome do animal:

Sexo:

Raça:

Idade:

Pelagem:

Nome do proprietário:

Bairro onde reside:

**Sobre a doença**

1- Qual a queixa principal?

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

3- Como era quando começou?

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

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

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

**Sobre hábitos do animal:**

1- Em que ambiente vive? Casa (dentro fora) Apto Outros:

2- Sobe: sofá cama

3- Onde dorme: c/ o dono sofá cama própria área de serviço canil  
quintal

4- Tem acesso a rua: sim não

5- Tem contato com o sol: pouco muito nenhum

6- Convive com outros animais: não sim qual?

6.1. Tempo de contato com eles: vivem juntos eventual

7- Alguém mais afetado: humano cão gato outros

8- Frequência de banho:

9- Produto usado:

10- Onde toma banho: casa pet shop outros

11- Tosa: não sim com que frequência

12- Arranca os pêlos das orelhas: sim não

**Tabela 1.** Sequência e pares de bases dos genes pesquisados nos isolados de *Staphylococcus pseudintermedius* de cães e tutores.

Gene	Sequência (5' → 3')	Peso molecular (pb)	Referência
<i>mecA</i>	F (5'- F ACTGCTATCCACCCTCAAC-3') R (5'- CTGGTGAAGTTGTAATCTGG- 3')	100	Botoni et al, 2016
<i>mecA1</i>	F (5'-TCCAGATTACAACCTTCACCAGG-3') R (5'-CCACTTCATATCTTGTAACG-3')	162	Merotha et al, 2000
<i>mecA2</i>	F (5'-ATCGATGGTAAAGTTGGC-3') R (5'-AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-3')	540	Merotha et al, 2000
<i>msrA</i>	F (5'-TCCAATCATTGCACAAAATC-3') R (5'-AATTCCCTCTATTTGGTGGT-3')	163	Ross et al, 1990
<i>fnbB</i>	F (5'-GGAGCGGCCTCAGTATTCTT-3') R (5"-AGTTGATGTCGCGCTGTATG-3")	201	Jönsson et al., 1991
PVL	F (5' – GCTGGACAAAACCTTCTTGAATAT – 3') R (5' – GATAGGACACCAATAAATTCTGGATTG – 3')	85	Stegger et al., 2012

**Tabela 2.** Índices obtidos para o teste de difusão em discos em comparação ao padrão-ouro (CIM).

	Oxacilina	Cefovecina	Gentamicina
Sensibilidade	0,3784	0,2222	0,000
Especificidade	0,9259	0,9844	0,9623
Valor preditivo positivo	0,7778	0,8571	0,000
Valor preditivo negativo	0,6849	0,7500	0,9273
Likelihood Ratio	5,108	14,220	0,000
P valor	0,0009	0,0025	0,9999